

Vliv vybraných faktorů na produkci biogenních aminů u enterokoků izolovaných z masa králíků

Iveta Mahovská

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: **Iveta MAHOVSKÁ**
Osobní číslo: **T10065**
Studijní program: **B2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Chemie a technologie potravin**
Forma studia: **prezenční**

Téma práce: **Vliv vybraných faktorů na produkci biogenních aminů u enterokoků izolovaných z masa králíků**

Zásady pro vypracování:

I. Teoretická část

1. Charakterizujte **biogenní aminy**.
2. Popište vliv **biogenních aminů na zdravotní stav člověka**.
3. Charakterizujte rod **Enterococcus**.

II. Praktická část

1. Popište **metodiku stanovení produkce biogenních aminů**.
2. Stanovte **produkci biogenních aminů u Enterococcus species metodou RP-HPLC v závislosti na vybraných vnějších faktorech**.
3. **Výsledky vyhodnotte a formulujte**.

Rozsah bakalářské práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

[1] SILLA SANTOS, M.H.: Biogenic amines: their importance in foods, *International Journal of Food Microbiology*, 1996, 29, 2-3, 213-231

[2] JUNEJA, V.K., SOFOS, J.N. *Pathogens and Toxins in Food: Challenges and Interventions*. 1. vydání. Washington, DC: ASM Press, 2010. 512 s. ISBN 978-1-55581-459-5, Chapter 16. Biogenic Amines in Foods. 248- 274.

[3] GARDINI, F., MARTUSCELLI, M., CARUSO, M.C., GALGANO, F., CRUDELE, M.A., FAVATI, F., GUERZONI, M.E., SUZZI, G.: Effects of pH, temperature and NaCl concentration on the growth kinetics, proteolytic activity and biogenic amine production of *Enterococcus faecalis*, *International Journal of Food Microbiology*, 2001, 64, 1-2, 105-117

[4] BANDOUNAS, L., BALLERSTEDT, H., WINDE, J.H., RUIJSSENAARS, H.J.: Redundancy in putrescine catabolism in solvent tolerant *Pseudomonas putida* S12, *Journal of Biotechnology*, 2011, 154, 1, 1-10

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

Va Zlíně dne 4. února 2013


doc. Ing. Roman Čerňák, Ph.D.
děkan




doc. Ing. František Buřka, 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 užit 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

.....
Mahovská

¹⁾ zákon č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, § 47 Zveřejňování závěrečných prací:

(1) Vysoká škola nevýdělečně 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 přihlídí k výši výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

ABSTRAKT

Cílem této bakalářské práce bylo pozorovat vliv vybraných vnějších faktorů na produkci biogenních aminů u mikroorganismů rodu *Enterococcus*. Produkce byla sledována u *Enterococcus* sp. izolovaného z masa králíků. Celkem bylo analyzováno 1320 vzorků. Při inokulaci byl použit Brain Heart Infusion Broth bujón. Během kultivace byly odebírány v různých časových intervalech vzorky, u kterých byla následně měřena optická denzita. Množství vyprodukovaných biogenních aminů bylo stanovováno pomocí RP-HPLC. Nejvíce produkovaným biogenním aminem testovanými bakteriemi byl tyramin (< 1470 mg/l). Produkce biogenních aminů byla nejvýznamněji snižována v médiu při pH5 a koncentraci NaCl 6%.

Klíčová slova: Biogenní aminy, *Enterococcus* sp., tyramin, dekarboxylace, bezpečnost potravin, optická denzita

ABSTRACT

The aim of this work was to observe the influence of selected environmental factors on the production of biogenic amines by microorganisms of the genus *Enterococcus*. Production was observed in *Enterococcus* sp. isolated from rabbit meat. 1320 samples were analyzed in total. Brain Heart Infusion Broth was used for inoculation. The samples were taken at various time intervals during cultivation and then their optical density was measured. The amount of biogenic amines produced was determined by RP – HPLC. Tyramine was the most produced biogenic amine (< 1470 mg/l). Biogenic amines production was decreased significantly in medium with pH5 and with NaCl concentration of 6%.

Keywords: Biogenic amines, *Enterococcus* sp., tyramine, decarboxylation, food safety, optical density

Ráda bych touto cestou poděkovala svému vedoucímu mé bakalářské práce ing. Pavlu Plevovi za odborné vedení, spolupráci, trpělivost a udělování cenných rad během zpracování bakalářské práce. Dále bych chtěla poděkovat doc. RNDr. Leoně Buňkové, Ph.D. za to, že mi umožnila pracovat na této bakalářské práci. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat paní laborantce ing. Ludmile Zálešákové za ochotu a pomoc při zpracování praktické části bakalářské práce.

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

OBSAH

ÚVOD	10
I TEORETICKÁ ČÁST	11
1 BIOGENNÍ AMINY	12
1.1 CHARAKTERISTIKA A VÝZNAM BIOGENNÍCH AMINŮ	12
1.1.1 Histamin	13
1.1.2 Tyramin	14
1.1.3 Fenylethylamin.....	15
1.1.4 Tryptamin.....	16
1.1.5 Putrescin, spermidin, spermin	17
1.1.6 Kadaverin	18
1.2 VZNIK BIOGENNÍCH AMINŮ	18
1.3 FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ TVORBU BIOGENNÍCH AMINŮ	19
1.3.1 Teplota.....	20
1.3.2 pH.....	21
1.3.3 Aktivita vody.....	21
1.3.4 Aerobní a anaerobní prostředí	22
2 VLIV BIOGENNÍCH AMINŮ NA ZDRAVOTNÍ STAV ČLOVĚKA	23
2.1 OCHRANA PŘED BIOGENNÍMI AMINY	24
3 ENTEROKOKY	26
3.1 TAXONOMIE	26
3.2 FYLOGENETICKÉ ZAŘAZENÍ RODU <i>ENTEROCOCCUS</i>	26
3.3 CHARAKTERISTIKA ENTEROKOKŮ	26
3.4 ZÁSTUPCI RODU <i>ENTEROCOCCUS</i>	27
4 OPTICKÁ DENZITA	28
II PRAKTICKÁ ČÁST	29
5 CÍL PRÁCE	30
6 POUŽITÉ PŘÍSTROJE A MATERIÁL	31
6.1 ZAŘÍZENÍ, PŘÍSTROJE A POMŮCKY	31
6.2 POUŽITÉ MIKROORGANIZMY.....	31
6.3 KULTIVAČNÍ MÉDIA.....	32
6.4 CHEMIKÁLIE A POMOCNÉ LÁTKY	32
7 METODIKA	33
7.1 PŘÍPRAVA INOKULA.....	33
7.2 PŘÍPRAVA RŮZNÝCH KULTIVAČNÍCH PODMÍNEK	33
7.3 ODBĚR VZORKŮ.....	34
7.4 MĚŘENÍ OPTICKÉ DENZITY	35
7.5 MĚŘENÍ PH KULTIVAČNÍHO MÉDIA.....	35
7.6 STANOVENÍ BIOGENNÍCH AMINŮ	35
8 VÝSLEDKY A DISKUZE	37
ZÁVĚR	46
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	47

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....	52
SEZNAM OBRÁZKŮ	53
SEZNAM TABULEK.....	55
SEZNAM PŘÍLOH.....	56

ÚVOD

Prakticky ve všech potravinách, které obsahují proteiny, nebo volné aminokyseliny a mohou umožnit mikrobiální a biochemickou činnost, lze předpokládat výskyt biogenních aminů (Silla Santos, 1996, s. 214). Biogenní aminy (BA) jsou přírodní antinutriční činitelé, důležití z hygienického hlediska, protože se podílí jako původci v řadě případů otravy potravinami, a jsou schopny zahajovat rozmanité farmakologické reakce (Shalaby, 1996, s. 675). Jejich stanovení v potravinách je důležité, kvůli jejich potenciální toxicitě a kvůli znakům kvality potravin (Yassoralipour et al., 2012, s. 142).

Biogenní aminy se často nacházejí v masě a masných výrobcích, včetně rybího masa, v menší míře v masě králičím a zvěřině, a také sýrech a jiných fermentovaných potravinách rostlinného a živočišného původu. Králičí a rybí maso má dobré nutriční vlastnosti, jako je vysoký obsah železa, zinku nebo selenu a nízký obsah sodíku. Navíc je v dnešní době králičí a rybí maso používáno v široké škále různých kuchyní (Pleva et al., 2012a, s. 438-439). U masa a masných výrobků patří mezi významné bakterie produkující BA (histamin, kadaverin a putrescin) zejména rody: *Pediococcus*, *Lactobacillus*, *Pseudomonas*, *Streptococcus*, *Micrococcus* a zástupci čeledi *Enterobacteriaceae*. Zároveň se tyto bakterie mohou lišit v produkci BA i o několik řádů (Pleva et al., 2012b, s. 46).

Měření biogenních aminů v masě a masných výrobcích bylo provedeno několika technikami, jako je například fluorimetrie, UV absorpce, detektor diodového pole a hmotnostní spektrometrie. Z uvedených extrakčních metod pro biogenní aminy jsou pro maso a masné výrobky nejpoužívanější, jak lze vyvodit z literatury, metody zahrnující kyselou extrakci těchto látek, po níž následuje buď předkolumnová derivatizace danzylchloridem, s následnou reverzní fází vysokoúčinné kapalinové chromatografie (RP-HPLC), při které dochází k separaci ve spojení s UV detekcí, nebo následuje detekce pomocí iontových párů reverzní fáze HPLC s kolonou či předkolumnou, s následnou derivatizací spolu s fluorescenční detekcí. (Leo, Toldrá a Toldrá, 2010, s. 409-409)

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 BIOGENNÍ AMINY

1.1 Charakteristika a význam biogenních aminů

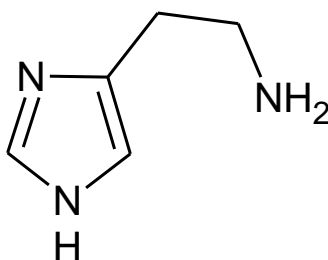
Biogenní aminy jsou základní dusíkaté sloučeniny, které jsou tvořeny dekarboxylací aminokyselin, anebo aminací a transaminací aldehydů a ketonů. Jedná se o organické báze s nízkou molekulovou hmotností, které jsou syntetizovány mikrobiálním, rostlinným a živočišným metabolismem. (Silla Santos, 1996, s. 213)

Většina biogenních aminů může být přirozeně přítomna v řadě rostlinných tkání a může být také tvořena během zpracování nebo skladování potravinových produktů, díky tepelné či enzymatické dekarboxylaci volných aminokyselin (Oliviera et al., 2005, s. 287). K nejvýznamnějším biogenním aminům vyskytující se v potravinách patří fenyletylamin, histamin, kadaverin, putrescin, spermidin, spermin, tryptamin a tyramin (Shalaby, 1996, s. 675).

U nefermentovaných výrobků se přítomnost biogenních aminů nad určitou míru považuje za známku nežádoucí mikrobiální aktivity. Nicméně, přítomnost biogenních aminů v potravinách nemusí nutně souviset s růstem mikroorganismů způsobujících kažení, protože nejsou všechny dekarboxyláza-pozitivní. Při výrobě fermentovaných výrobků je předpokládána přítomnost mnoha druhů mikroorganismů, z nichž některé jsou schopny produkovat biogenní aminy. Většina výrobků, ve kterých rostou bakterie mléčného kvašení, obsahují značné množství putrescinu, kadaverinu, histaminu a tyraminu. (Silla Santos, 1996, s. 214-216)

Biogenní aminy jsou označovány jako indikátory kvality a čerstvosti potravin (Jenuja a Sofos, 2010, s. 248). Jenuja a Sofos (2010, s. 248) uvedli, že koncentrace se zvyšují v průběhu skladování v důsledku mikrobiální metabolické aktivity.

1.1.1 Histamin



Obr. 1: Histamin

(převzato a upraveno

dle Juneja a Sofos, 2010, s. 249)

Histamin (β -imidazolyletylamin) je jedním z nejdůležitějších prostředníků zapojených do různých fyziologických a patologických stavů, například: neurotransmise a četné mozkové funkce, sekrece hypofyzárních hormonů, regulace gastrointestinálního traktu, funkce krevního oběhu a zánětlivých reakcí. (Jutel et al., 2002, s. 735)

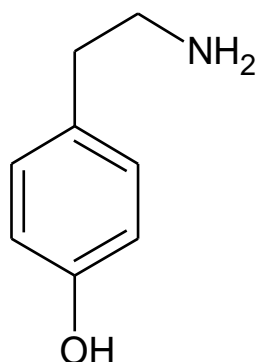
Jeho biologické účinky jsou obvykle vidět pouze tehdy, když se uvolní ve velkém množství v průběhu alergických a jiných reakcí (Landete et al., 2011, s. 697). Jutel et al. (2002, s. 738) prokázali, že histamin silně ovlivňuje imunitní odpověď organismu. Toxicita histaminu je patrně zesílena při přítomnosti dalších aminů, jako je kadaverin, putrescin a tyramin (Shalaby, 1996, s. 675).

Histamin účinkuje vazbou jeho 4 receptorů na cílové buňky v různých tkáních. To způsobí kontrakci hladkých svalových buněk, vazodilataci, zvýšení vaskulární permeability a sekreci hlenu, tachykardii, změny krevního tlaku a arytmií, stimulaci sekrece žaludeční kyseliny a nociceptivních nervových vláken. (Maintz a Novák, 2007, s. 1185-1186)

Histidin může být metabolizován dvěma způsoby- oxidativní deaminací diaminoxidázou (DAO) nebo kruhovou metylací histamin-N-metyltransferázou (HNMT). Zda je histamin metabolizován DAO nebo HNMT závisí na lokalizaci histaminu. Protein DAO je uložen v plazmě membrány- spojené vezikulární struktury v epiteliálních buňkách, které jsou vylučovány do oběhu pro stimulaci. Naopak HNMT, druhý nejdůležitější enzym inaktivující histamin je cytozolový protein, který umí převést histamin pouze v intracelulárním prostoru buňek. (Maintz a Novák, 2007, s. 1186)

Mezi mikroorganismy produkující histamin patří celá řada kmenů, izolovaných z různých potravinářských výrobků. Mezi bakterie izolované z ryb, tvořící histamin, patří: *Morganella morganii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Hafnia alvei*, *Proteus vulgaris*, *Proteus mirabilis*, *Clostridium perfringens*, *Enterobacter aerogenes*, *Acinetobacter lwoffii*, *Pseudomonas putrefaciens*, *Aeromonas hydrophila*, *Plesiomonas shigelloides* a *Vibrio* spp. (Jejuna a Sofos, 2010, s. 250)

1.1.2 Tyramin



Obr. 2: Tyramin

(převzato a upraveno

dle Juneja a Sofos, 2010, s. 249)

Tyramin je monoamin se sympatomimetickými účinky a nachází se v mnoha potravinách (Bryant a Knights, 2010, s. 361). Je přítomen pouze ve stopovém množství v nervové soustavě savců, u hmyzu je obsažen ve větším množství. Tyramin slouží jako prekurzor pro důležitý neuromodulátor oktopamin (Davis et al., 2002, s. 271).

Dekarboxylázová aktivita tyrozinu u mikroorganismů získala zvláštní pozornost, protože tyramin patří k nejhojnějším biogenním aminům obsažených ve fermentovaných výrobcích. Vzhledem k tomu, že je silný vazokonstriktor, může tyramin při vysokých koncentracích v organismu vyvolat hypertenzi, migrény, krvácení do mozku a selhání srdce. (Kuley a Özogul, 2011, s. 1163)

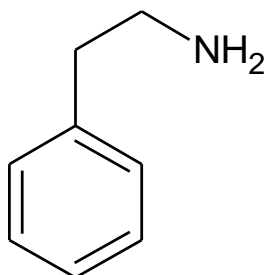
Tyrozin-dekarboxylační dráha je přítomna pouze u některých druhů bakterií mléčného kvašení a je považována spíše za kmenově specifickou než druhově specifickou. Vzhledem k tomu, že dekarboxylační enzymy jsou aktivovány při kyselém pH, je obecně přijímáno, že dekarboxylační dráhy jsou aktivovány kvůli zvýšení odolnosti buněk vůči

kyselinám a udržení buněčné homeostáze, pokud jsou buňky vystaveny okyselení. (Pereira et al., 2010, s. 345)

Různé koncentrace tyraminu byly nalezeny v mnoha potravinách, včetně sýrů, masných a rybích výrobků. Dávka pouze 6mg celkového příjmu tyraminu může být nebezpečná pro pacienty pod antidepresní léčbou, kteří jsou léčeni inhibitory monoaminoxidáz (Kuley a Özogul, 2011, s. 1163).

V laboratorním prostředí byl tyramin produkován rody *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Proteus* a *Pseudomonas*, nebyl však produkován rody *Acinetobacter* a *Bacillus*, *Escherichia coli*, *Hafnia*, *Salmonella arizonae*, *Serratia marcescens*, *Shigella* nebo *Yersinia enterocolitica*, ani zkoumanými kvasinkovými druhy s výjimkou *Candida krusei*. (Jejuna a Sofos, 2010, s. 251)

1.1.3 Fenyletylamin



Obr. 3: Fenyletylamin

(převzato a upraveno dle

Juneja a Sofos, 2010, s. 249)

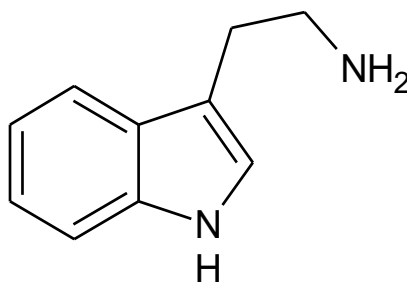
Fenyletylaminy patří do souhrnné třídy arylalkylaminů, které obsahují alespoň jednu arylovou skupinu a jednu alkylovou skupinu, tedy deriváty nasyceného uhlovodíku. Když je alkylovou skupinou etyl, jsou tyto skupiny označovány jako aryletylaminy a aryletanaminy. (Newton, 2007, s. 94)

Fenyletylamin má významné biologické funkce, včetně vaskulárních účinků nebo jeho zásahu do aminergických drah (Zamora, Delgado a Hidalgo, 2012, s. 321). Fenyletylamin je také přírodní složka kakaových bobů a vyskytuje se tedy v čokoládě, čokoládových výrobcích a cukrovinkách obsahujících čokoládu. Některé druhy hub

obsahují také vysoké hladiny fenyletylamínu. Fenyletylamin je inhibítozem diaminooxidázy a histamin N-metyltransferázy (Silla Santos, 1996, s. 215-224).

Dva biogenní aminy se jeví jako druhově specifické, a to fenyletylamin a etanolamin, ty jsou ve značném množství produkovány *Brettanomyces bruxellensis* a *Sacharomyces cerevisiae* (Rai a Chikindas, 2011, s. 176).

1.1.4 Tryptamin



Obr. 4: Tryptamin

(převzato a upraveno

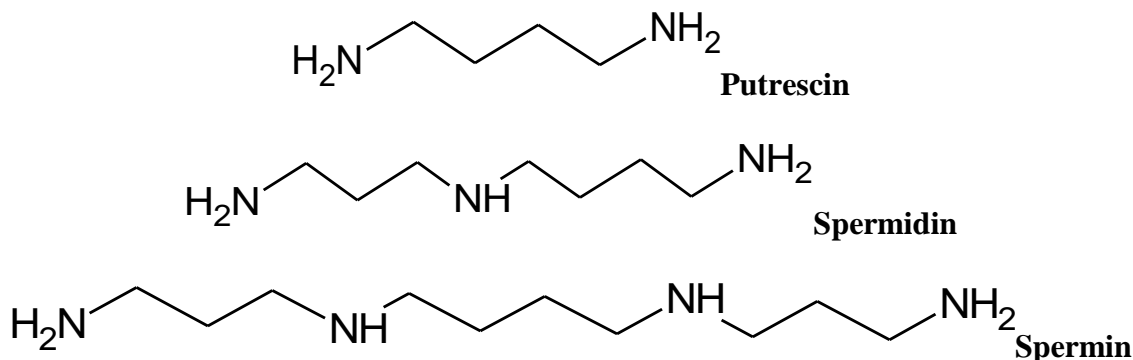
dle Juneja a Sofos, 2010, s. 249)

Tryptamin je monoamin, přirozeně se vyskytující nazelenalý alkaloid u rostlin a hub. Je chemicky příbuzný aminokyselině tryptofanu, to se zakládá na indolové kruhové struktuře. Chemické varianty přirozeně se vyskytujících tryptaminů byly získány modifikací postranního řetězce nebo funkční skupiny. (Corkery et al., 2012, s. 259)

Dráha vedoucí k bioaktivnímu auxinu, indol-3-octová kyselina, je známa jako tryptaminová dráha, která postupuje v pořadí: tryptofan, tryptamin, N-hydroxytryptamin, indol-3-acetaldoxim, indol-3-acetaldehyd a indol-3-octová kyselina (Quittenden et al., 2009, s. 1130).

Aktivita tyrozin dekarboxylázy byla zjištěna u *Lactobacillus brevis* a u nesýrové příbuzné kultury *Lactobacillus lactis* subsp. *cremoris* (Konings, Kuipers a Huis in 't Veld, 1999, s. 235).

1.1.5 Putrescin, spermidin, spermin



Obr. 5: Putrescin, spermidin a spermin

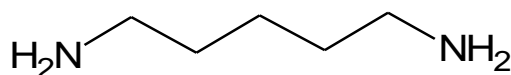
(převzato a upraveno dle Juneja a Sofos, 2010, s. 249)

Putrescin, spermidin, spermin a kadaverin jsou obecně nejčastěji produkované mobilní polyaminy a jsou nezbytné pro normální buněčný růst a množení prokaryotických a eukaryotických buněk. Polyaminy jsou malé alifatické uhlovodíky s kvarterními skupinami dusíku, které mají čistě kladný náboj při fyziologickém pH. Intracelulární obsah spermidinu (1-3 mmol/l) je vyšší než u putrescinu (0,1-0,2 mmol/l) u téměř všech bakterií, ačkoliv putrescin (10-30 mmol/l) je převládajícím polyaminem u *Escherichia coli*, následovaný spermidinem (1-3 mmol/l). Přítomnost sperminu v bakteriálních buňkách není známa. (Shah a Swlatlo, 2008, s. 4-5)

U *Escherichia coli* a mnoho druhů rodu *Pseudomonas* je syntetizován putrescin prostřednictvím dvou drah: U první dráhy dochází k dekarboxylaci ornitinu na putrescin pomocí ornitin-dekarboxylázy a u druhé dráhy k dekarboxylaci argininu na agmatin pomocí arginin-dekarboxylázy, poté dochází k přeměně agmatinu na putrescin a močovinu díky agmatin-ureohydroláze (viz příloha P I) (Shah a Swlatlo, 2008, s. 5).

Polyaminy jako putrescin se nacházejí v mnoha organizmech, působí jako signální a regulační molekula v závislosti na podmínkách stresu způsobeného reaktivními formami kyslíku, teplem, UV zářením, kyselinou a osmotickým tlakem (Bandounas et al., 2011, s. 1). Spermidin a spermin se podílejí na vývoji střevní tkáně (Silla Santos, 1996, s. 222). Spermin je schopen regenerovat tokoferol z tokoferoxylového radikálu přes donora vodíků z aminoskupiny. Sperminový radikál následně váže lipidové nebo peroxidové radikály do lipidového komplexu (Karovičová a Kohajdová, 2005, s. 70).

1.1.6 Kadaverin



Obr.6: Kadaverin

(převzato a upraveno

dle Juneja a Sofos, 2010, s. 249)

Diamin kadaverin (1,5-diaminopentan) je tvořen dekarboxylací intracelulárního lyzinu enzymem lyzin dekarboxylázou (viz příloha P I). Tento enzym se nachází u prokaryot, jako jsou bakterie a mykoplazmata. Savčí buňky nedisponují za normálních podmínek unikátním enzymem lyzin dekarboxylázou a nesyntetizují kadaverin. Přítomnost intracelulárního kadaverinu v savčích buňkách byla obvykle v souvislosti s otravami mykoplazmaty. (Hawel et al., 1994, s. 7412)

Kadaverin je jedním z nejméně rozšířených přirozeně se vyskytujících bakteriálních polyaminů a běžně je přítomen u *Escherichia coli*. Nicméně, tato bakterie syntetizuje kadaverin během anaerobního růstu v přítomnosti jeho prekurzoru aminokyseliny lyzinu při nízkých hodnotách pH nebo při absenci biosyntézy putrescinu. (Shah a Swlatlo, 2008, s. 5)

1.2 Vznik biogenních aminů

Dekarboxylace aminokyselin je nejjednodušší způsob syntézy aminů v potravinách. Tyto aminy, které jsou tvořeny živými organismy prostřednictvím procesu dekarboxylace aminokyselin, se nazývají jako biogenní (Shalaby, 1996, s. 675).

Chemická struktura biogenních aminů může být: alifatická (putrescin, kadaverin, spermin, spermidin), aromatická (tyramin, fenyletylamin) a heterocyklická (histamin, tryptamin) (Silla Santos, 1996, s. 213-214).

Tab. 1: Prekurzory hlavních biogenních aminů, které se podílejí na otravě jídlem (převzato a upraveno dle Silla Santos, 1996, s. 214)

AMINOKYSELINA	ODVOZENÝ AMIN
Arginin	Spermin, spermidin
Histidin	Histamin
Hydroxytryptofan	Serotonin
Lyzin	Kadaverin
Ornitin	Putrescin
Tryptofan	Tryptamin
Tyrozín	Tyramin

Pro vytvoření biogenních aminů dekarboxylací aminokyselin byly identifikovány dva specifické mechanismy. První mechanismus je založen na pyridoxal-5-fosfátu, který může být považován za součást enzymu a katalyzuje reakci dekarboxylace. Aktivní místo dekarboxylačního enzymu je tvořeno pyridoxal fosfátem, který je připojen v Schiffově bázi na aminoskupinu lyzylového zbytku. Karbonylová skupina pyridoxalfosfátu reaguje s aminokyselinami za vzniku meziproductů s Schiffovou bází, ta je poté dekarboxylována, přičemž se získají odpovídající aminy. Druhý mechanismus zahrnuje pyruvoylový zbytek místo pyridoxalfosfátu. Pyruvoylová skupina je kovalentně vázána na aminoskupinu enzymu a funguje podobným způsobem jako pyridoxalfosfát při dekarboxylaci. (Jejuna a Sofos, 2010, s. 249)

1.3 Faktory ovlivňující tvorbu biogenních aminů

Mezi faktory, které mají vliv na vznik biogenních aminů v potravinách, patří dostupnost volné aminokyseliny a přítomnost mikroorganismů. Tyto mikroorganismy mohou dekarboxylovat aminokyseliny a vytvářet příznivé podmínky pro růst mikroorganismů a tvorbu jejich enzymů (Shalaby, 1996, s. 675-676). Důležitou roli při produkci aminů hraje také proteolytická aktivita v médiu, která poskytuje substráty pro dekarboxylázovou aktivitu (Gardini et al., 2001, s. 106).

1.3.1 Teplota

Teplota má významný vliv na produkci biogenních aminů v potravinách. Řada studií uvádí, že obsah aminů závisí na teplotě a narůstá s časem a skladovací teplotou. Teplotně nevhodné podmínky mají následující dvojí dopad na formaci aminů: účinkem proteolýzy v důsledku zvýšeného mikrobiálního růstu podporuje pronikání do svalů a zvyšování dostupnosti prekurzoru bez aminokyseliny, a také účinek na aktivitu aminodekarboxylázy. (Jejuna a Sofos, 2010, s. 252)

Ritchie a Mackie (1979, s. 489-494) sledovali tvorbu histaminu, putrescinu, kadaverinu, sperminu a spermidinu v čerstvě ulevení makrele obecné a sledi obecném, nevykuchaných na ledu po dobu 28 dní při teplotě 1 °C, v inkubátoru při teplotě 10°C a v izolovaném boxu při pokojové teplotě (25°C). V rybách byla koncentrace histaminu a dalších aminů docela nízká po delším skladování při 1 °C, i když ryby vykazovaly známky hniloby. Podle očekávání byly aminy produkovány v relativně větších koncentracích při dvou zvýšených teplotách. Autoři uvádějí, že histamin nebyl přítomen při skladovacích teplotách pod 10°C. Tyto výsledky byly v souladu s dalšími studiemi, které uvedly, že produkce histaminu se zpomalila při 10°C a byla téměř ukončena při teplotě 5°C v důsledku pomalého růstu bakterií produkujících histamin při nízkých teplotách.

Hladina biogenních aminů v potravinách je obecně ovlivněna tepelným zpracováním (vařením), s výjimkou sperminu, který klesá po tepelné úpravě vařeného mletého masa při 200°C po 2 hodinách (Jejuna a Sofos, 2010, s. 252). Luten a spol. (1992, s. 427-439), Wendakoo a Sakaguchi (1993, s. 410-413) uvedli, že histamin je teplotně stabilní v průběhu procesu pečení. Vzhledem k této skutečnosti je přítomnost aminů ve vařených výrobcích úzce spojena s kvalitou použitého surového materiálu.

Tvorba aminů bakteriemi je rozhodujícím způsobem ovlivněna teplotou. Teplota v rozmezí 20°C a 37°C je optimální pro růst většiny bakterií, které obsahují dekarboxylázy. Při snížení teploty dochází k zastavení růstu bakterií (Karovičová a Kohajdová, 2005, s. 71). Enterokoky mohou růst v širokém teplotním rozmezí, řada kmenů může růst při teplotách minimálně 1°C. Maximální uváděná teplota pro růst je 50°C, ale teplota optimální pro řadu druhů je 37°C. Enterokoky jsou rezistentní vůči zmrazení a přežívají skladování při teplotě -70°C po dobu několika let (Lawley, Curtis a Davis, 2012, s. 51).

1.3.2 pH

pH je jedním z klíčových faktorů ovlivňující aktivitu dekarboxylázy aminokyselin a tvorbu biogenních aminů v potravinách. Bylo prokázáno, že tvorba aminů bakteriemi je fyziologický mechanismus k potlačení kyselého prostředí, a proto je aktivita aminodekarboxylázy obvykle silnější v kyselých podmínkách s optimálním pH mezi 4,0-5,5 (Jejuna a Sofos, 2010, s. 253).

Optimální úroveň pro syntézu tyraminu v sýrech je pH 5,0, které se shoduje s optimem pro dekarboxylázní aktivitu histidinu, ale nebylo definováno jakými mikroorganismy, předpokládá se u *Escherichia coli*, *Pseudomonas* spp., *Proteuss* pp. Přidání glukono- δ -laktonu do suché klobásy vedlo k výraznému poklesu pH a produkce množství histaminu a putrescinu. Přídavek glukono- δ -laktonu měl vliv na růst fekálních streptokoků, aerobních mezofilních a koliformních bakterií, ale neovlivňoval růst bakterií mléčného kvašení. (Silla Santos, 1996, s.219)

1.3.3 Aktivita vody

Vysoké koncentrace rozpuštěných látek (např. chlorid sodný) nebo procesy, které mohou snižovat aktivitu vody (např. fermentace), údajně potlačují tvorbu aminů v potravinách pravděpodobně proto, že nízká aktivita vody zpomaluje růst bakterií. Například bylo zaznamenáno, že NaCl při koncentracích $3,5 \pm 5,5\%$ potlačuje produkci histaminu u *Klebsiella pneumoniae* a *Morganella morganii* (gramnegativní bakterie), zatímco při nižších úrovních byly neúčinné. (Silla Santos, 2010, s. 253)

Henry Chin a Koehler (1986, s. 423-427) dokázali, že koncentrace NaCl v rozmezí 3,5% do 5,5% může inhibovat tvorbu histaminu. Tento vliv lze připsat snížení buněčných výtěžků získaných v přítomnosti vysokých koncentrací NaCl a postupnému narušení membrány, kde se nacházejí mikrobiální dekarboxylační enzymy. Podobné vlivy NaCl na výtěžek buňky a produkci aminů byly zaznamenány u *Enterococcus faecalis*. Ze studie Leroie et al. (2000, s. 502-508) vyplynulo, že inhibice bakterií ve studeném uzeném lososovi, který byl uložen po dobu 5 týdnů při teplotě 5°C, obsahu soli (5%) a kouře, byl obsah přímo úměrný obsahu soli a kouře, čím vyšší koncentrace soli a kouře, tím větší inhibice bakterií.

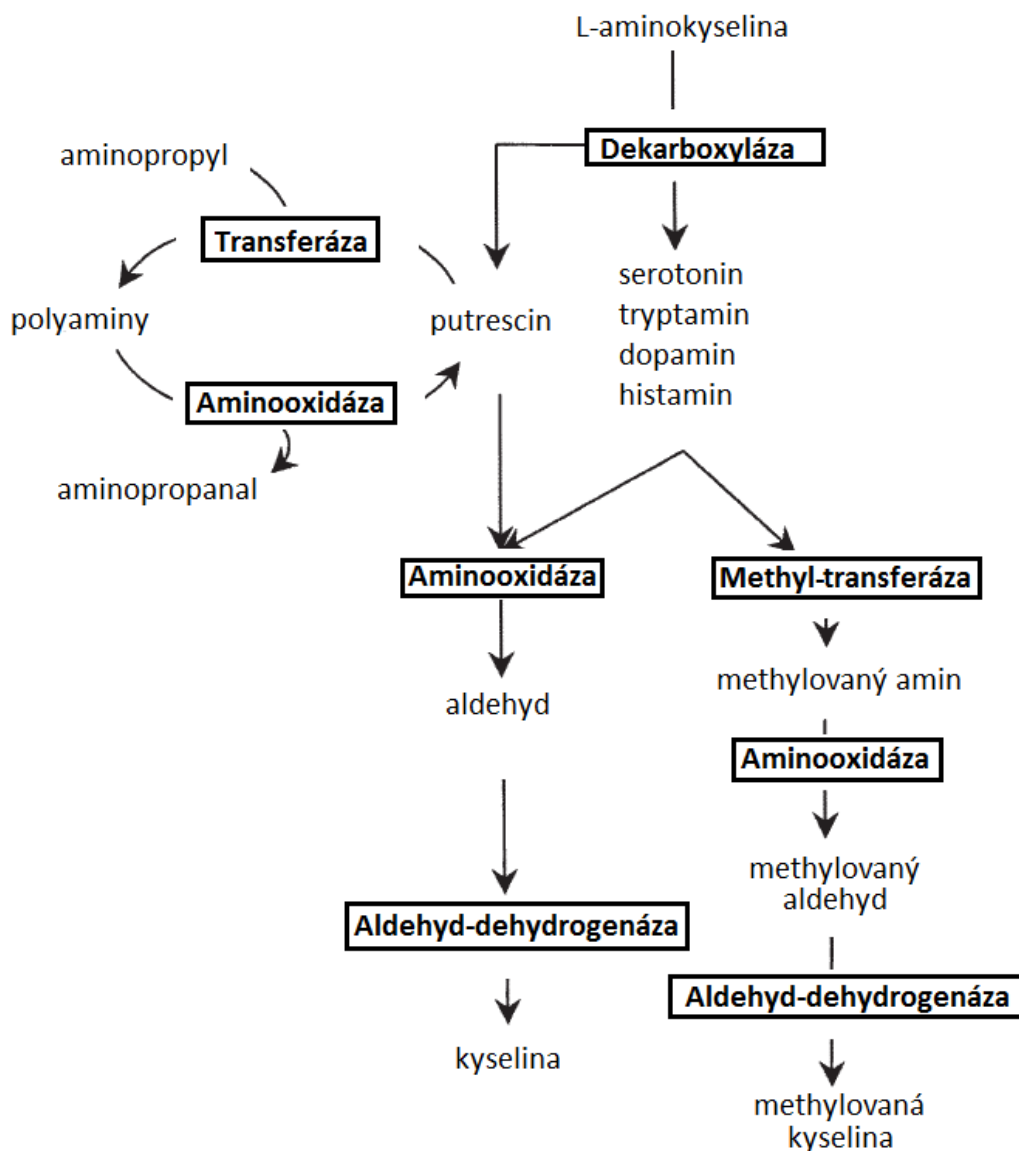
1.3.4 Aerobní a anaerobní prostředí

Zásobování kyslíkem má také významný vliv na biosyntézu aminů (Silla Santos, 1996, s. 221). *Enterobacter cloacae* produkuje přibližně poloviční množství putrescinu za anaerobních podmínek ve srovnání s aerobními podmínkami. *Klebsiella pneumoniae* za anaerobních podmínek syntetizuje podstatně méně kadaverinu, ale získává schopnost produkovat putrescin (Karovičová a Kohajdová, 2005, s. 71).

Redoxní potenciál média také ovlivňuje tvorbu biogenních aminů. Podmínky vedoucí ke snížení redoxního potenciálu stimulují produkci histaminu a činnost histidin-dekarboxylázy se jeví jako inaktivována nebo zničena v přítomnosti kyslíku (Karovičová a Kohajdová, 2005, s. 71).

2 VLIV BIOGENNÍCH AMINŮ NA ZDRAVOTNÍ STAV ČLOVĚKA

Za normálních podmínek u člověka jsou exogenní aminy vstřebávané z potravy rychle detoxikovány působením aminooxidáz nebo konjugací (obr. 7), ale v případě alergenních osob nebo pokud jsou uplatňovány inhibitory monoaminooxidáz, nebo konzumovány ve vysoké míře, je proces detoxikace narušen a histamin se hromadí v těle (Landete et al., 697-698).



Obr. 7: Metabolizmus biogenních aminů a polyaminů u savců (převzato a upraveno dle Medina et al., 2003, s. 30)

Vztah mezi těmito aminosloučeninami a lidskou patologií je znám více než 150 let. V současné době je ve skutečnosti známo, že jsou zapojeny do některých z nejrozšířenějších lidských onemocnění, včetně nádorů a nádorových invazí (jako například od ornitinu odvozené polyaminy a histamin), alergie a imunitní reakce obecně (histamin), a neurologické poruchy jako Parkinson, Alzheimerova choroba, deprese a anorexie (serotonin, dopamin, histamin). (Medina et al., 2003, s. 23-24)

Při požití potravy s vyšším obsahem histaminu může dojít až ke vzniku scombroid syndromu, tedy k příznakům vyvolaným toxickými účinky histaminu po jeho vstřebání trávicím traktem. Nejčastěji kontaminovanými potravinami jsou ryby z čeledi *Scombridae* a *Scorpaenidae*, mezi nimi zejména makrela, tuňák a treska, dále i jiné druhy ryb jako je delfín, herinek a sardinky, a vyšší obsah histaminu může být i ve špenátu, lilku, banánech, některých druzích sýrů a vínech. Kontaminace a výsledná koncentrace histaminu v rybě úzce souvisí s jejím zpracováním, skladováním a přípravou – při teplotách okolo 20 stupňů Celsia dochází k přemnožení enterobakterií a následně vysoké tvorbě histaminu. Enterobakterie jsou mrazem dočasně inaktivovány, ale po rozmrazení ryby se mohou množit a dále tvořit histamin. Varem jsou enterobakterie sice zničeny, ale již vytvořený histamin je termostabilní a odolává jak nízkým, tak i vysokým teplotám – tedy i varu (Bělohávková a Fuchs, 2005, 231).

Řada studií poskytla údaje o potenciální roli biogenních aminů jako prekurzorů karcinogenních sloučenin. U různých biogenních aminů, jako je spermidin, spermin, tyramin, putrescin a kadaverin, dochází při vystavení vysokým teplotám ke vzniku sekundárních aminů. Tyto sekundární aminy mohou v důsledku přítomnosti dusitanů vytvářet nitrosaminy. (Jejuna a Sofos, 2010, 263)

2.1 Ochrana před biogenními aminy

U nefermentovaných potravin jsou biogenní aminy produkovány především při kontaminaci bakteriemi, které způsobují jejich kažení. Z tohoto důvodu existuje mnoho kontrolních prvků používaných k zabránění mikrobiálního kažení a prodloužení trvanlivosti, jako je balení v ochranné atmosféře, ozařování a zpracování při vysokém tlaku. Tyto kontrolní prvky slouží ve vysoké míře také jako užitečná prevence jejich

produkce. Avšak klíčová je dobrá hygienická praxe a efektivní regulace teploty. Jedná se zejména o zabránění růstu. (Lawley, Curtis a Davis, 2012, s. 333)

Počáteční mikrobiologická jakost surovin má také významný vliv na tvorbu aminů v průběhu výroby a skladování. Dobrá hygiena je důležitá při prevenci kontaminace non-starterových druhů, které mohou produkovat velké množství aminů, zejména u výrobků s dlouhou dobou zrání. Tepelné ošetření při zpracování pomáhá také snižovat populaci non-starterových kultur. Syrové mléko, sýry a fermentované masné výrobky vyrobené bez pasterizace jsou náchylnější ke vzniku vysokých koncentrací aminů během zrání. (Lawley, Curtis a Davis, 2012, s. 333)

3 ENTEROKOKY

3.1 Taxonomie

Enterokoky jsou gram-pozitivní bakterie a zapadají do obecné definice bakterií mléčného kvašení (Franz, Holzapfel a Stiles, 1999, s. 1). Jsou to sferoidní buňky (1µm), vyskytující se v párech nebo tvořící řetízky, nepohyblivé, mezofilní, fakultativně anaerobní a některé kmeny přežívají krátký záhřev- např. pasteraci (Bibek, 2004, s. 27).

3.2 Fylogenetické zařazení rodu *Enterococcus*

Zařazení rodu *Enterococcus* (Sedláček, 2007, s. 248):

Doména: *Bacteria*

Kmen: *Firmicutes*

Třída: *Bacilli*

Řád: *Lactobacillales*

Čeleď: *Enterococcaceae*

Rod: *Enterococcus*

3.3 Charakteristika enterokoků

Enterokoky jsou „všudypřítomné“ bakterie, které se mohou vyskytovat jako součást mikroflóry osídlující trávicí trakt, stejně jako ve spoustě různých potravinářských výrobcích. Zájem o tento bakteriální rod se zvýšil v posledních desetiletích v důsledku jeho pozitivních a negativních vlastností ve vztahu k lidskému zdraví a potravinářské technologii (Gardini et al., 2008, s. 2740). Obecně platí, že jsou odolnější vůči zchlazení, zmrazení, sušení, snížení pH, množství NaCl a vody, než většina ostatních koliformních bakterií (Bibek, 2004, s. 436).

Bývají často izolovány z ekologických zdrojů, jako je půda, povrchové vody a syrové rostlinné a živočišné produkty, kde jim jejich přirozená odolnost umožňuje přetrvávat a šířit se do prostředí. Kdysi byly považovány za rody s minimálním klinickým dopadem, zejména *Enterococcus faecium* a *Enterococcus faecalis* se vynořily jako

organizmy, které mají význam vzhledem ke vzniku více rezistentních kmenů, které jsou odpovědné za přibližně 12% všech nozokomiálních infekcí ve Spojených státech. Kromě toho, jejich schopnost získat odolnost vůči antibiotikům prostřednictvím přenosu plazmidů a transpozonů, chromozomální výměny nebo mutace představuje významný problém pro léčebná opatření. (Johnston a Jaykus, 2004, s. 3133)

Enterokoky hrají velmi významnou roli během dozrávání sýrů, hlavně jsou součástí jejich metabolických procesů, které ovlivňují finální senzorycké vlastnosti sýrů. Ačkoliv byly enterokoky široce používány k produkci fermentovaných potravin a uvažuje se nad jejich použitím jako konzervační látky, nejsou v současné době všeobecně uznány jako bezpečné. Společně s jinými bakteriemi mléčného kvašení a enterobakteriemi mohou být enterokoky považovány za nejvýznamnější producenty biogenních aminů, hlavně tyraminu a histaminu. (Buňková et al., 2012, s. 973)

Nicméně, jejich výskyt v potravinách je sporný, protože enterokoky byly charakterizovány jako mikroorganizmy způsobující kažení a také jako indikátorové fekálního znečištění. Kromě toho jsou alimentární enterokoky známy svým přechováváním rezistence na různá antibiotika. (Gardini et al., 2008, s. 2740)

3.4 Zástupci rodu *Enterococcus*

Rod *Enterococcus* v současné době zahrnuje přibližně 26 druhů. Enterokoky a skupina D streptokoků mohou být považovány za nezbytnou součást autochtonní mikroflóry člověka a zvířat. Existuje i hostitelská specifita (Corry, Curtis a Baird, 2003, s. 111).

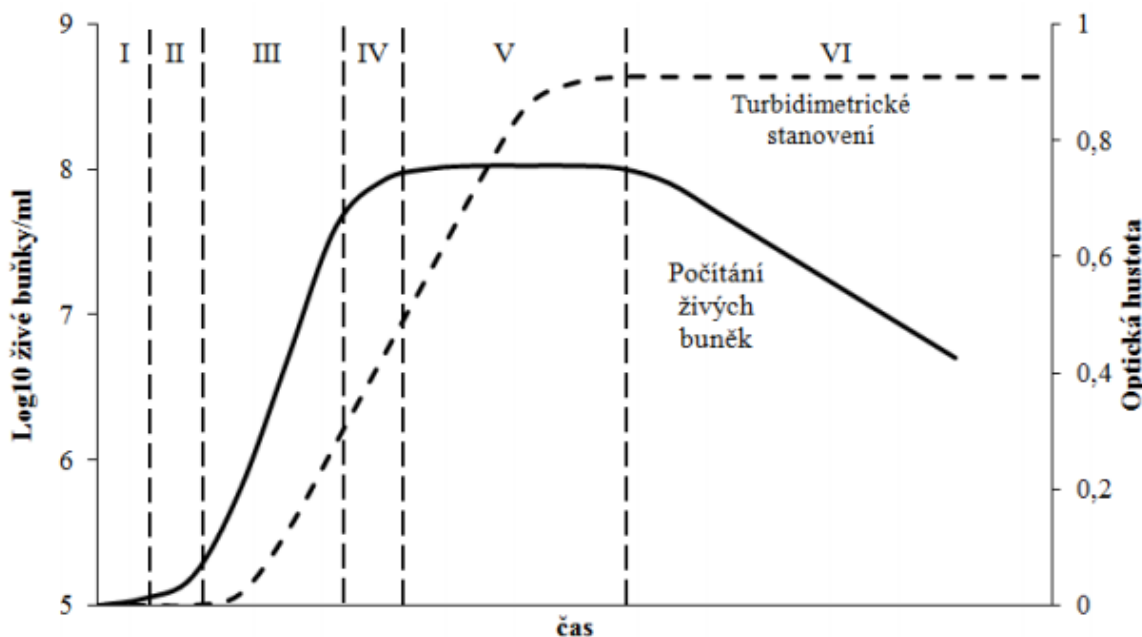
U lidí jsou častými druhy *Enterococcus faecalis* a *Enterococcus faecium*. U drůbeže, skotu, prasat je častý druh *Enterococcus faecium*, další druhy jako *Enterococcus faecalis* a *Enterococcus cecorum*. *Enterococcus cecorum*, jenž byl původně nalezen v drůbežích střevech, byl izolován také u prasat, koní, skotu, kanárek a kachen. *Enterococcus gallinarum* a *Enterococcus durans* se občas vyskytují ve střevech zvířat a *Enterococcus avium* se vyskytuje pouze vzácně. Některé druhy, jako *Enterococcus casseliflavus* (shodný s *Enterococcus flavescens*) a *Enterococcus mundtii* se většinou vyskytují v rostlinách. Přítomnost *Enterococcus faecalis* a *Enterococcus faecium* se často využívá jako indikátor fekální kontaminace potravin. (Corry, Curtis a Baird, 2003, s. 112)

4 OPTICKÁ DENZITA

Optická denzita je standardním ukazatelem pro růst buněk (Rao, 2010, s. 7). Při spektrofotometrickém měření optické denzity se využívá vlnových délek 420 nm nebo 650 nm (Fugelsang a Edwards, 2007, s. 239).

Jedná se o spolehlivou metodu k odhadu růstových vlastností z měření absorbance mikrobiálních populací při předpokladu nízkého obsahu živin. Problémy v odhadu růstových vlastností při těchto podmínkách vyplývají z nízké optické hustoty populace, kde experimentální šum (např. vzduchové bubliny a škrábance na dně jamek) může mít velký vliv na odhad parametrů. (Novak et al., 2009, s. 268)

Měření vlastností růstu mikroorganismů, jako je trvání lag fáze, výnos stacionární fáze a zejména tempo růstu jsou zásadní pro mnoho oblastí mikrobiologie, včetně experimentálního vývoje (obr. 8) (Novak et al., 2009, s. 267).



Obr. 8: Fáze růstové křivky- I - Lag-fáze, II - Fáze zrychlujícího se růstu, III - Exponenciální fáze, IV - Fáze zpomalujícího se růstu, V - Stacionární fáze, VI - Fáze postupného odumírání (Šupinová, 2009, s. 27)

II. PRAKTICKÁ ČÁST

5 CÍL PRÁCE

Cílem práce bylo sledovat tvorbu biogenních aminů rodem *Enterococcus sp.* při různých kultivačních podmínkách. Dále byla sledována růstová křivka pomocí optické denzity. Práce byla rozdělena na několik částí:

- Příprava médií, kultivace bakterií, odběr vzorků a jejich příprava na derivatizaci, měření optické denzity,
- derivatizace, detekce biogenních aminů pomocí reverzní fáze HPLC,
- vyhodnocení a zpracování výsledků, zjištění vlivu vnějších faktorů na produkci biogenních aminů.

6 POUŽITÉ PŘÍSTROJE A MATERIÁL

6.1 Zařízení, přístroje a pomůcky

Analytické váhy, Sartorius BA 110S

Autokláv, Systec 2540EL

Automatické mikropipety, Biohit a Nichyrio

Biologický termostat, Memert

Derivatizační nádoby (vialky)

Fotometr, Benchmark

Horkovzdušná sušárna, Memmert

Chladnička, Elektrolux

Laboratorní plast- špičky automatických pipet, ependorfkové mikrozkušky, mikrotitrační destička

Laboratorní sklo, Simax

Mikrovlnná trouba

Očkovací box- Biohazard

Odstředivka, Hettich

pH metr

Plynový kahan

Vortex Heidolph, Reax

6.2 Použité mikroorganismy

Při práci byl použit kmen *Enterococcus* sp. M5a, který byl izolován z masa králíka a byl získán z Ústavu fyziologie hospodářských zvířat, Slovenské akademie věd v Košicích.

6.3 Kultivační média

Bakterie byly kultivovány v Brain Heart Infusion Broth (BHI; HiMedia) s aminokyselinami (histidin, ornitin, arginin, lyzin, tyrozin; Sigma-Aldrich) jako prekurzory testovaných biogenních aminů v koncentraci 0,2 % (w/v) (Pleva et al., 2012b, s. 46). Tento bujón byl také použit při přípravě inokula. Bakterie byly uchovávány na Brain Heart Infusion agaru. Po rozmíchání daného množství média v deionizované vodě byla tato média sterilována v autoklávu při teplotě 121 °C po dobu 15 minut.

<u>BHI bujón</u>	BHI (Brain Heart Infusion Broth)	37,00 g
	Deionizovaná voda (Aqua osmotic)	1000,00 ml
<u>BHI agar</u>	BHI (Brain Heart Infusion Agar)	52,20 g
	Deionizovaná voda (Aqua osmotic)	1000,00 ml

6.4 Chemikálie a pomocné látky

1,7-heptandiamin, Sigma- Aldrich (v koncentraci 5g/l)

Aceton, (Sigma- Aldrich)

Acetonitril, (Sigma- Aldrich)

Aminokyseliny (histin, ornitin, arginin, lyzin, tyrozin, fenylamin; Sigma-Aldrich)

Dansylchlorid, (Merck) (v koncentraci 5g/l)

Denaturovaný etanol, (LachNer)

Dusík v tlakové nádobě, (Linde)

Heptan, (Sigma- Aldrich)

Hydrogenuhlíčan sodný a uhlíčan sodný bezvodý, (Merck)

Chlorid sodný NaCl, (LachNer)

Kyselina chloristá, (Merck) (v koncentraci 1,2 mol/l)

Kyselina chlorovodíková, (Merck) (v koncentraci 6 mol/l)

L-Prolin, (Merck)

Parafínový olej, (Pliva-Lachema)

7 METODIKA

7.1 Příprava inokula

Při přípravě inokula bylo použito 16,5 ml kultivačního média, do kterého byla zaočkována sledovaná bakterie. Kultivace probíhala v termostatu při teplotě 30 ± 1 °C po dobu 24 hodin. Připravená suspenze sledovaných bakterií byla použita k zaočkování do kultivačních médií.

Pro kontrolu čistoty kultury bylo provedeno barvení dle Grama. Druh *Enterococcus* sp. byl potvrzen pomocí ENTEROtest 16.

7.2 Příprava různých kultivačních podmínek

Produkce biogenních aminů byla zkoumána v závislosti na teplotě (6 ± 1 °C, 12 ± 1 °C a 30 ± 1 °C), dostupnosti kyslíku a koncentraci NaCl (0; 1; 2; 3 a 6 % w/v). Vliv dostupnosti kyslíku na produkci biogenních aminů byl sledován tak, že polovina zkumavek byla kultivována aerobně a druhá anaerobně, anaerobního prostředí bylo dosaženo zakápnutím média sterilním parafinovým olejem (1 ml; Pliva-Lachema) (Pleva et al., 2012b, s. 46). Celkem byla připravena 4 média s různými kultivačními podmínkami.

Tab. 2: Teplota, pH a koncentrace NaCl u jednotlivých médií

Měření	Teplota	pH	Koncentrace NaCl
1.	6°C	7	0; 1; 2; 3; 6
2.	6°C	6	0; 1; 2; 3; 6
3.	12°C	7	0; 1; 2; 3; 6
4.	30°C	5	0; 1; 2; 3; 6

U každého média byla hodnocena média o koncentraci 0; 1; 2; 3; 6 % (w/v) NaCl, s daným množstvím BHI, aminokyselin (histidin, ornitin, arginin, lyzin, tyrozin, fenylamin) v koncentraci 0,2 % (w/v) a požadovaným objem vody.

Tab. 3: Rozdíl navažovaného množství látek u médií s různou koncentrací NaCl

Koncentrace NaCl (%) v médiu	H ₂ O (ml)	BHI (g)	AMK (g)	NaCl (g)
0	216	7,992	0,432	0
1	216	7,992	0,432	2,2
2	216	7,992	0,432	4,4
3	216	7,992	0,432	6,6
6	216	7,992	0,432	13,2

Před sterilizací bylo pH u jednotlivých médií upraveno na požadované pH přidavkem HCl o koncentraci 6 mol/l. Připravená živná média byla podrobena sterilizaci v autoklávu při teplotě 121 °C po dobu 20 minut. Následně byly do zkumavek odebírány 3 ml daného média. Jedno písmeno představovalo 5 stojanů po 66 zkumavkách s různou koncentrací NaCl a požadovaným pH. Každá zkumavka byla očkována 50 µl suspenze bakterií. Sterilní živná média byla použita jako srovnávací vzorky (kontroly). Polovina zkumavek tzn. 33 zkumavek, byla kultivována aerobně a druhá anaerobně. Anaerobního prostředí bylo dosaženo přidáním 1ml média sterilního parafinového oleje (Pliva-Lachema). Každý izolát byl kultivován třikrát. Poté byly vzorky pro analýzu kultivovány po určitou dobu při dané kultivační teplotě.

7.3 Odběr vzorků

Bylo provedeno celkem 10 odběrů v daných časových intervalech v závislosti na kultivačních podmínkách. Časové období mezi jednotlivými odběry bylo 24 nebo 48 hodin při teplotě 6±1 °C a 12±1 °C, odběry probíhaly 1.; 3; 5.; 7.; 8.; 10.; 12.; 14.; 16. a 18. den. Při teplotě 30±1°C trval experiment 3 dny, kdy první den bylo celkem šest odběrů v časovém intervalu 2 hodiny, druhý den byly tři odběry v časovém intervalu 6 hodin a po 48 hodinách byl proveden poslední odběr. Tento experiment byl proveden při daných kultivačních podmínkách celkem pětkrát, bylo analyzováno celkem 1320 vzorků.

Při odběru vzorků bylo odebráno celkem 6 zkumavek z každého stojanu, kdy tři zkumavky byly kultivovány aerobně (bez parafínu) a tři zkumavky anaerobně (s parafínem). Živné médium po kultivaci testovaných bakterií bylo centrifugováno (4000 x g; 22±1 °C; 20 minut; EBA 20, Hettich) (Pleva et al., 2012b, s. 46). Z každé zkumavky bylo odebráno 750 µl média se suspenzí bakterií a 750 µl kyseliny chloristé o koncentraci 1,2 mol/l do ependorfkové mikrozkušavky. Zároveň byly připraveny kontroly, u kterých byly použity srovnávací vzorky bez suspenze bakterií. Takto připravené vzorky byly uchovávány při teplotě -18 °C a následně byly podrobeny derivatizaci.

7.4 Měření optické denzity

Po každém odběru byl sledován růst kmene *Enterococcus* sp. pomocí optické denzity ($\lambda = 655$ nm; Fotometr TECAN Sunrise TW/TC) proti živnému médiu bez suspenze bakterií (kontrola).

Měření bylo prováděno na mikrotitrační destičce. Do jednotlivých jamek bylo třikrát pipetováno 200 µl daného média se suspenzí bakterií a kontroly pro srovnání. Naměřené výsledky byly použity při vlastním stanovení produkce biogenních aminů.

7.5 Měření pH kultivačního média

Během každého odběru bylo měřeno pH u jednotlivých zkumavek pH-metrem s kombinovanou skleněnou elektrodou. Denně byl pH-metr kalibrován a u každé zkumavky bylo pH měřeno třikrát.

7.6 Stanovení biogenních aminů

Produkce sedmi biogenních aminů (kadaverin, CAD; histamin, HIS; fenyletylamin, PHE; putrescin, PUT; tyramin, TYR; spermidin, SPD; spermin, SPN) byla sledována předkolonovou derivatizací danzylchloridem, s následnou reverzní fází vysokoúčinné kapalinové chromatografie (RP-HPLC) vybavené binárním čerpadlem, autosamplerm (LabAlliance, USA), kolonou s termostatem, UV/VIS DAD detektorem ($\lambda = 254$ nm) a

degaserem (1260 Infinity, Agilent Technologies, USA) po předchozí derivatizaci danzylchloridem. (Pleva et al., 2012a, s. 439)

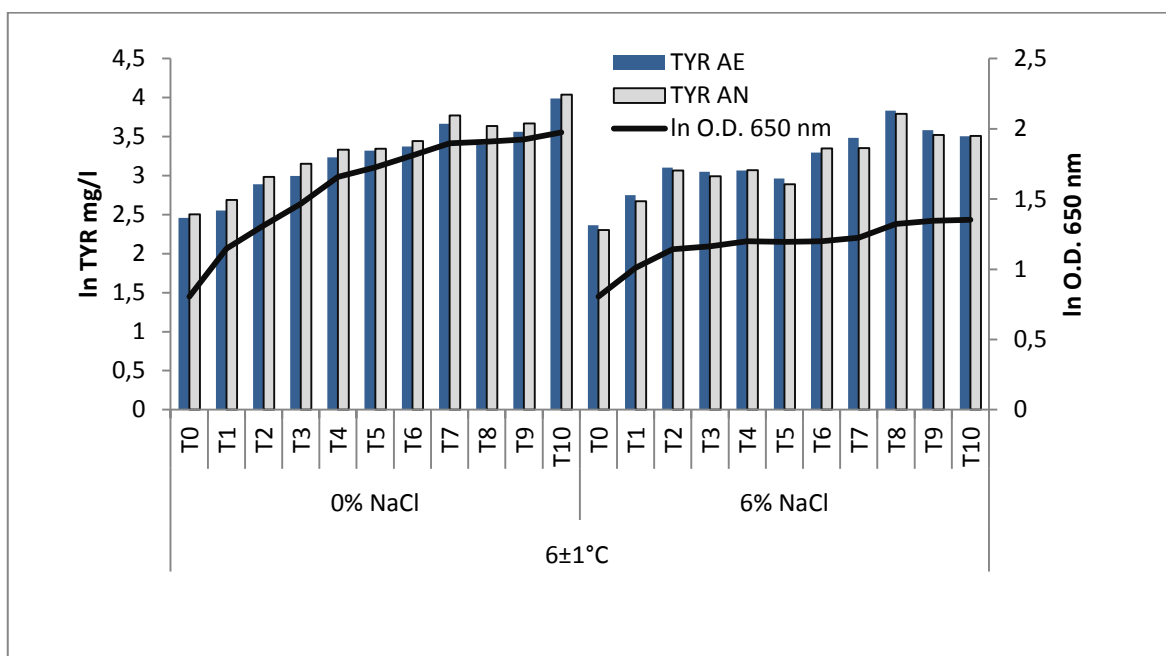
Postup derivatizace BA a polyaminů danzylchloridem byl proveden podle Dadákové et al. (2009, s. 367). Každý vzorek z ependorfkové mikrozkušavky byl pipetován po 1 ml do derivatizační nádob (vialek). Dále bylo přidáno 100 μ l vnitřního standardu, 1,5 ml karbonátového pufru s pH 11,1-11,2 a 2 ml čerstvě připraveného roztoku danzylchloridu o koncentraci 5g/l v acetonu. Jako interní standard byl použit 1,7-heptandiamin. Poté proběhlo dvacetihodinové třepání v temnu. Po uplynutí této doby bylo do každé derivatizační nádoby přidáno 200 μ l roztoku prolinu a proběhlo další hodinové třepání. Po hodině byly napipetovány 3 ml heptanu a vzorky byly 3 minuty intenzivně protřepávány. Po třepání byl odpipetován 1 ml vrchní heptanové vrstvy (supernant) do 1,5 ml vialky. Supernant bylo odpařen při teplotě 60 °C do sucha inertním plynem (dusíkem). Suchý odparek byl rozpuštěn v 1,5 ml acetonitrilu.

Derivatizované vzorky byly po danzylaci filtrovány (porozita filtru 0,22 μ m) a nanášeny na kolonu (Cogent HPLC Column HPS C18, 150 x 4,6 mm, 5 μ m) (Pleva, 2012b, s. 46-49).

8 VÝSLEDKY A DISKUZE

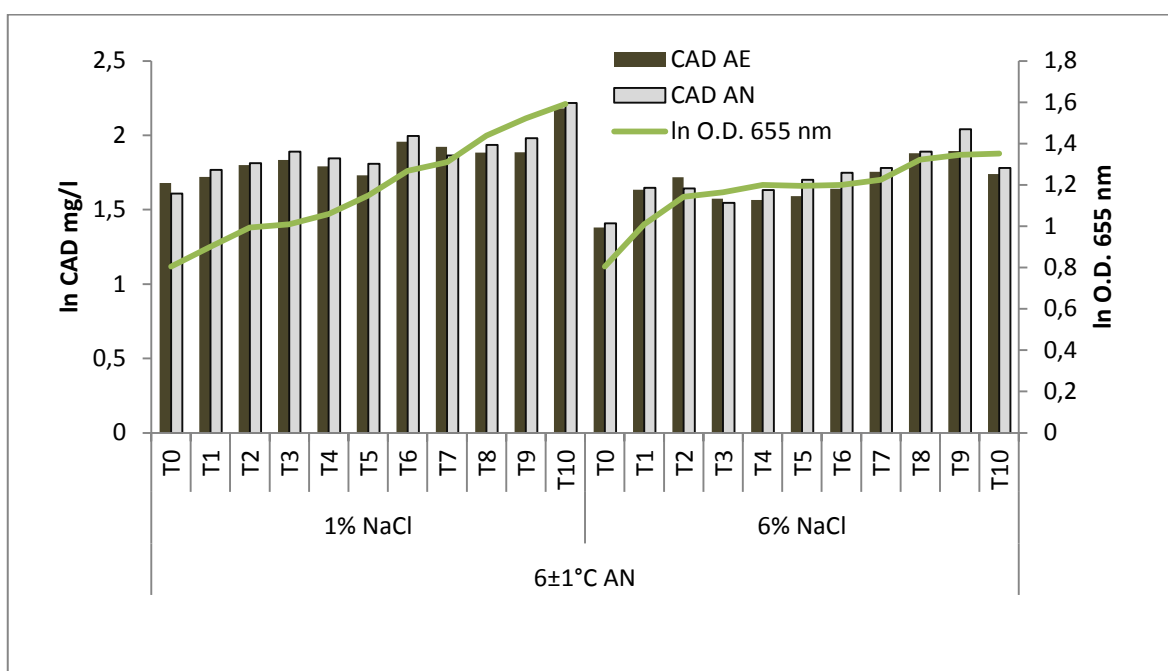
Schopnost tvorby biogenních aminů rodem *Enterococcus* potvrdil předcházející skrínig (Pleva et al., 2012a, s. 47). Na základě tohoto skrínigu byl pro další studie vybrán *Enterococcus* sp. M5a, který je schopen produkce fenyletylaminu, kadaverinu, putrescinu, sperminu a tyraminu. U tohoto kmene byly v modelových podmínkách sledovány vybrané faktory, u kterých existuje předpoklad, že jsou schopny ovlivňovat produkci biogenních aminů (NaCl 0 – 6% (w/v); aerobní/ anaerobní prostředí, kultivační teplota byla $6\pm 1^\circ\text{C}$, $12\pm 1^\circ\text{C}$ a $30\pm 1^\circ\text{C}$). Tyto faktory byly voleny tak, aby se přiblížily podmínkám zpracování a skladování masa a masných výrobků (Pleva et al., 2012a, s. 47). Jelikož měl přístroj odchylku měření, byla stanovena mez detekce 2 mg/l. Celkem bylo zpracováno a vyhodnoceno 1320 vzorků.

Tvorba biogenních aminů při aerobních a anaerobních podmínkách měla v čase rostoucí charakter. BA, které byly produkovány *Enterococcus* sp. při $6\pm 1^\circ\text{C}$ a pH 7 za aerobních podmínek po dobu 18 dní, dosahovaly následujících hodnot: TYR <54 mg/l; SPN <18 mg/l; CAD <10 mg/l; za anaerobních podmínek: TYR <57 mg/l; SPN <19 mg/l; CAD <9 mg/l. Hodnoty PHE a PUT byly pod mezí detekce. U hodnot pH nedocházelo během kultivace k výrazným změnám, pohybovaly se v rozmezí pH 6,9-7,1.



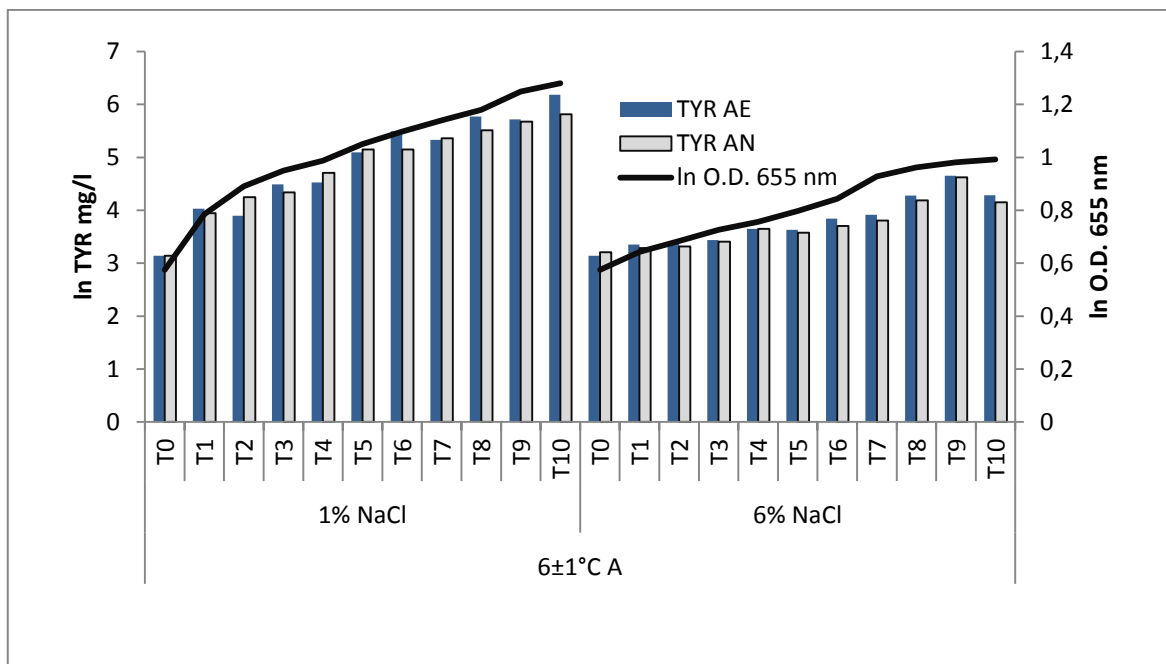
Obr. 9: Produkce tyraminu u *Enterococcus* sp. M5a. Při pH=7, $6\pm 1^\circ\text{C}$, 0 % a 6 % (w/v) NaCl. TYR AE – produkce v aerobním prostředí; TYR AN – produkce v anaerobním prostředí; O.D. (optická denzita) měřena při 655 nm za aerobních podmínek

Produkce tyraminu při 6 °C a pH 7 přibližně odpovídala růstovým křivkám kmene *Enterococcus* sp. při jednotlivých koncentracích NaCl (obr. 9). Produkce tyraminu při koncentraci 1 %, 2 % a 3% (w/v) NaCl byla obdobná jako při 0% (w/v) NaCl. Nejvyšší zaznamenaný růst produkce tyraminu byl při 0 % (w/v) NaCl za aerobních i anaerobních podmínek k 18. dnu kultivace. Produkce kadaverinu při 6 °C a pH 7 byla zpočátku zvýšená, přibližně v polovině doby kultivace došlo ke zpomalení růstu produkce a ke konci kultivace došlo opět ke zvýšení produkce kadaverinu (obr. 10). Koncentrace 0%, 2% a 3% (w/v) NaCl byly téměř shodné s hodnotami při 1% (w/v) NaCl.

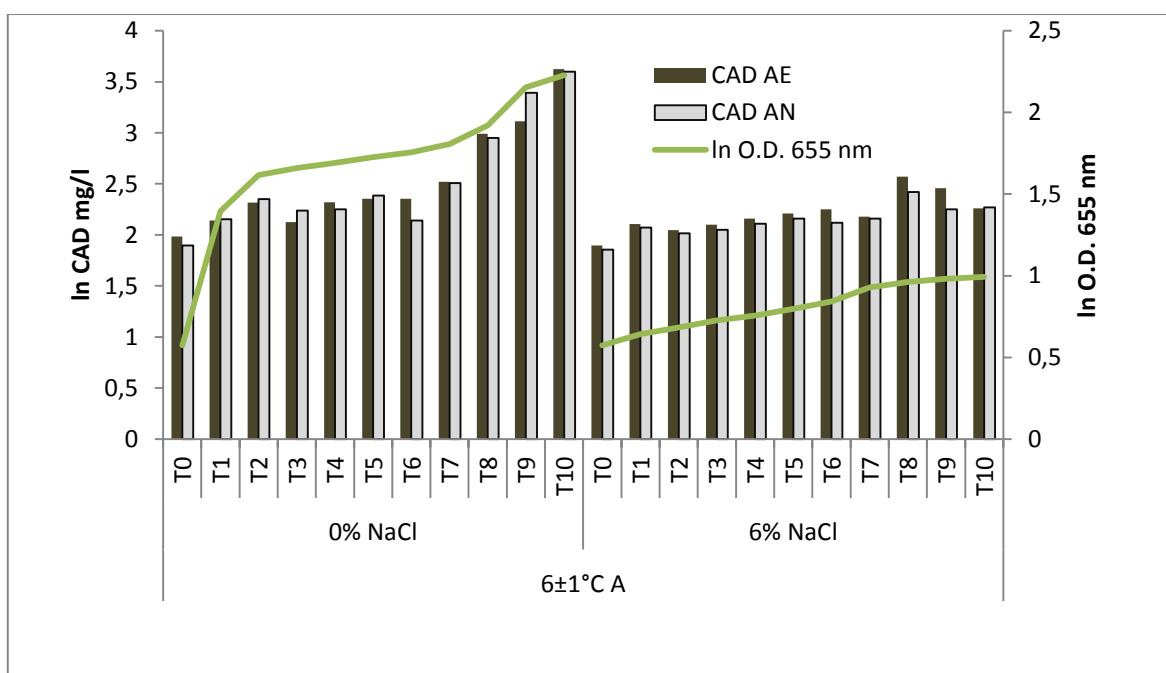


Obr. 10: Produkce kadaverinu u *Enterococcus* sp. M5a. Při pH=7, 6±1 °C, 1 % a 6 % (w/v) NaCl. CAD AE – produkce v aerobním prostředí; CAD AN – produkce v anaerobním prostředí; O.D. (optická densita) měřena při 655 nm za aerobních podmínek

Biogenní aminy po 18 dnech kultivace při 6±1 °C a pH 6 za aerobních podmínek nabývaly hodnot: TYR <480 mg/l; SPN <22 mg/l; CAD <13 mg/l; PHE <10 mg/l; PUT <6 mg/l. Za anaerobních podmínek dosahovaly hodnot: TYR <330 mg/l; SPN <20mg/l; CAD <10 mg/l; PUT <6 mg/l; PHE <5 mg/l. Hodnota pH se během kultivace výrazně neměnila, pohybovala se v rozmezí pH 5,9-6,1. Produkce tyraminu (obr. 11) při 0 %, 1 %, 2 % a 3 % (w/v) NaCl měla stejný charakter růstu (TYR <480 mg/l), při 6% (w/v) NaCl byl růst produkce nižší (TYR 72,39±2,38). Nejvyšších hodnot dosahoval tyramin při 1% (w/v) NaCl při aerobních i anaerobních podmínkách.



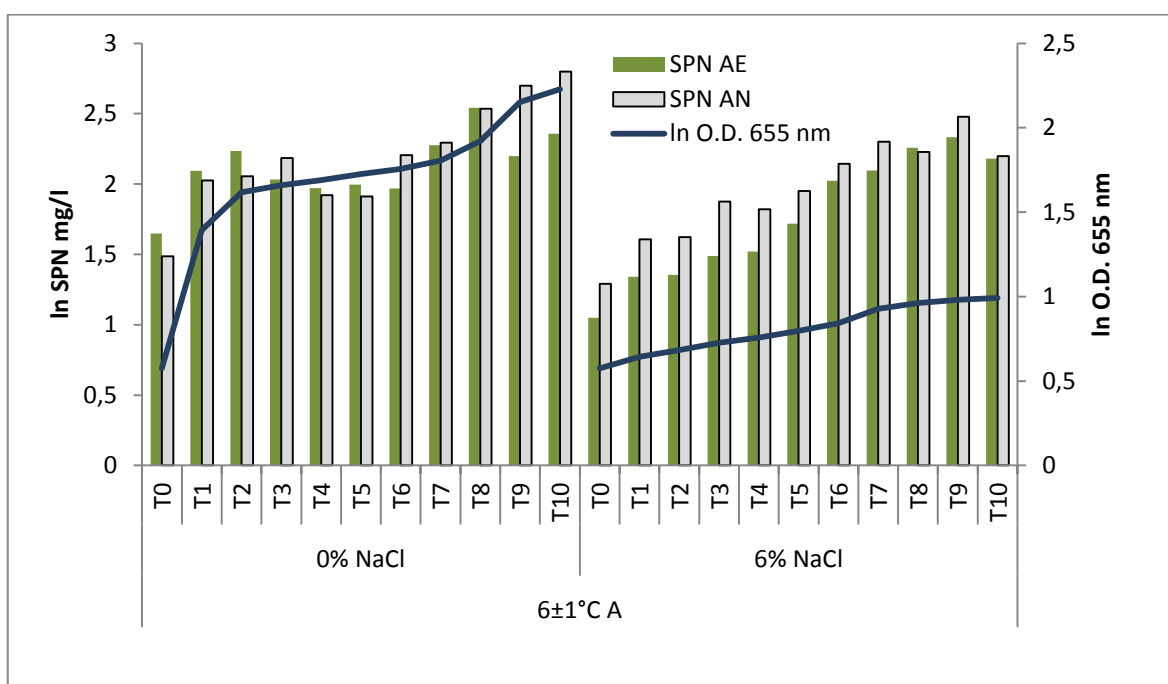
Obr. 11: Produkce tyraminu u *Enterococcus sp. M5a*. Při $pH=6$, 6 ± 1 °C, 1 % a 6 % (w/v) NaCl. TYR AE – produkce v aerobním prostředí; TYR AN – produkce v anaerobním prostředí; O.D. (optická densita) měřena při 655 nm za aerobních podmínek



Obr. 12: Produkce tyraminu u *Enterococcus sp. M5a*. Při $pH=6$, 6 ± 1 °C, 0 % a 6 % (w/v) NaCl. CAD AE – produkce v aerobním prostředí; CAD AN – produkce v anaerobním prostředí; O.D. (optická densita) měřena při 655 nm za aerobních podmínek

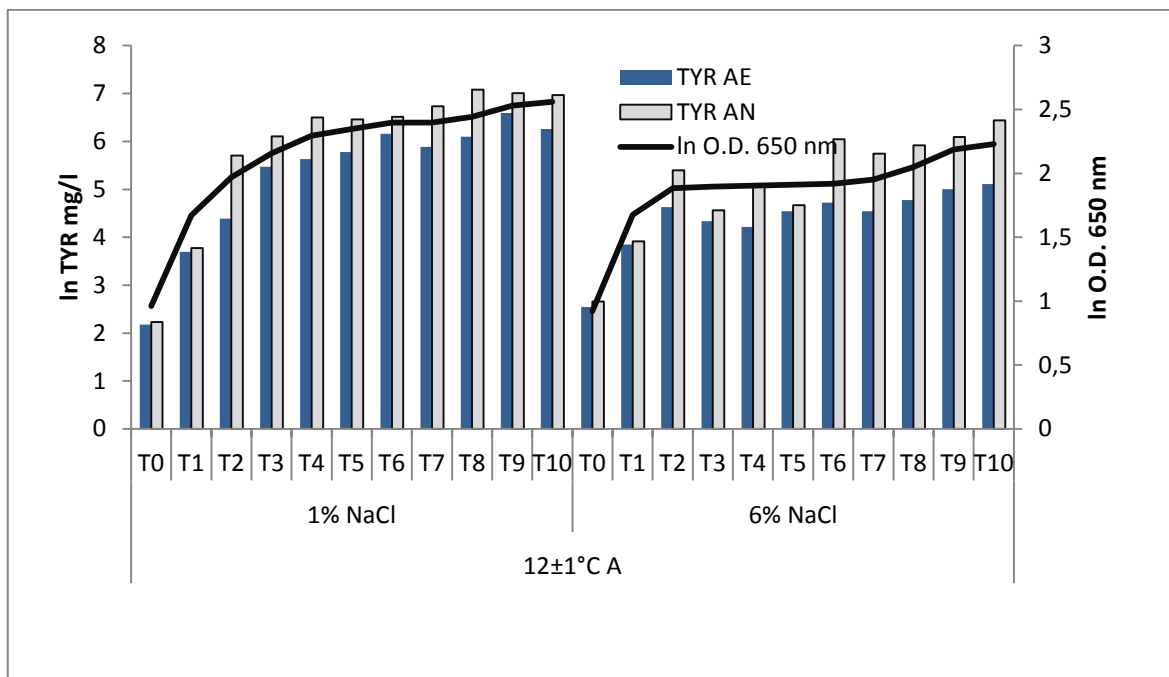
Produkce kadaverinu při 6 ± 1 °C a pH 6 byla při 0 % (w/v) NaCl výrazná od 10 dne kultivace, kdy došlo ke zvýšení produkce kadaverinu (AE CAD $10,93\pm 0,48$ mg/l; AN

CAD $10,04 \pm 0,24$ mg/l), které odpovídalo růstové křivce při měření O.D. 655 nm. Při koncentracích 1-6% (w/v) NaCl nebyla produkce kadaverinu výrazná (obr. 12). Nejvyšších hodnot dosahoval kadaverin při 0 % (w/v) NaCl (CAD $13,80 \pm 0,12$ mg/l). Produkce sperminu byla výrazná až od poloviny doby kultivace, kdy při koncentraci 3 % a 6 % (w/v) NaCl, při koncentracích 0-2 % (w/v) NaCl produkce plynule rostla (obr. 13). Nejvyšší množství vytvořeného sperminu *in vitro* bylo za aerobních i anaerobních podmínek při koncentraci 3 % (w/v) NaCl (max SPN $17,87 \pm 0,41$ mg/l). Produkce putrescinu a fenyletyaminu byla v čase téměř konstantní.

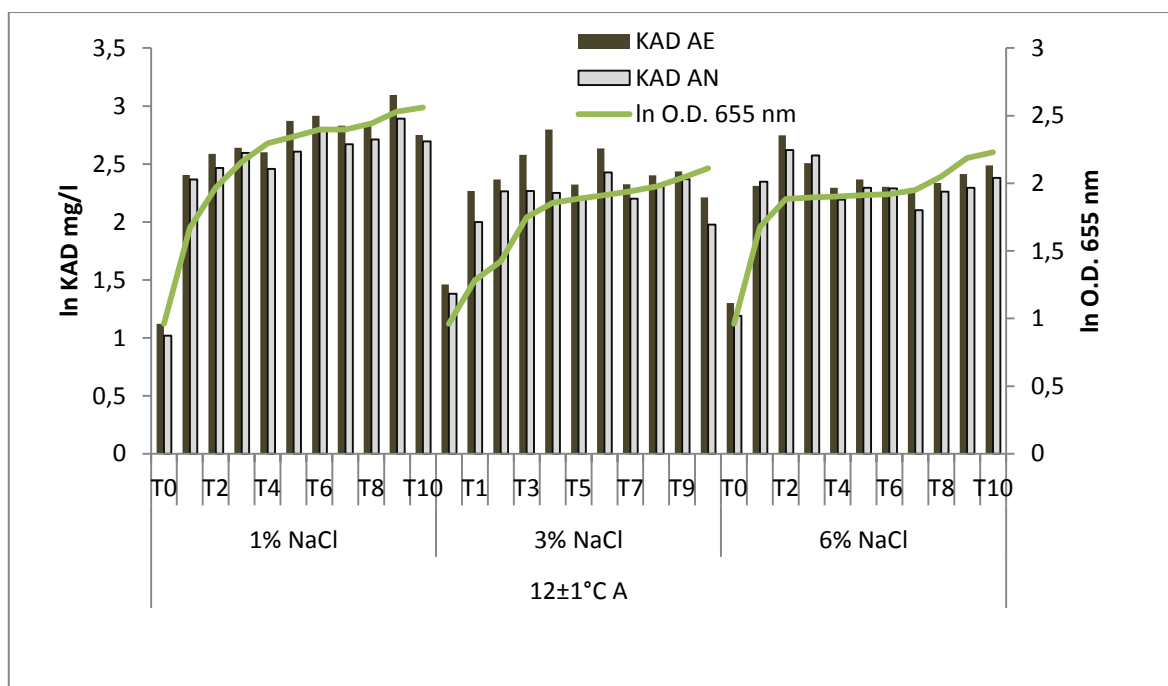


Obr. 13: Produkce sperminu u *Enterococcus sp. M5a*. Při $pH=6$, 6 ± 1 °C, 0 % a 6 % (w/v) NaCl. SPN AE – produkce v aerobním prostředí; SPN AN – produkce v anaerobním prostředí; O.D. (optická denzita) měřena při 655 nm za aerobních podmínek

Produkce biogenních aminů při 12 ± 1 °C a $pH 7$ po 18 dnech byla za aerobních podmínek následující: TYR <732 mg/l; SPN <23 mg/l; CAD <18mg/l; PHE <11 mg/l; PUT <8 mg/l. Při anaerobních podmínkách dosahovala hodnot: TYR <1189 mg/l; PHE <37 mg/l; SPN <33 mg/l; CAD <14 mg/l; PUT <7 mg/l. Hodnoty pH kolísaly v závislosti na obsahu NaCl a době kultivace v rozmezí $pH 6,6-7,3$ (vyšší pH při nižších koncentracích NaCl; nižší pH při vyšších koncentracích NaCl). Produkce tyraminu byla významně zvýšená od 4. dne kultivace (TYR <180 mg/l) u média s 0% (w/v) NaCl. Produkce tyraminu (obr. 14) při 0-3 % (w/v) NaCl byla téměř shodná (AE TYR <523 mg/l; AN TYR <1060 mg/l), při 6% (w/v) byla výrazně nižší (TYR <165 mg/l).

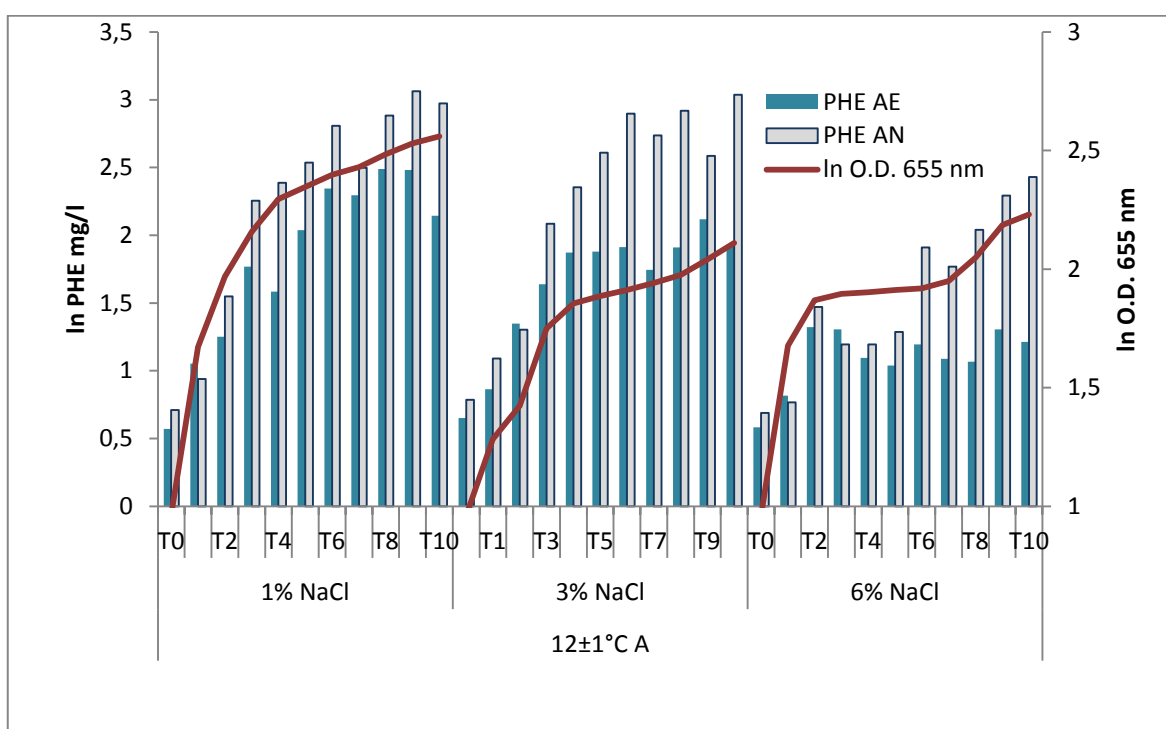


Obr. 14: Produkce tyraminu u *Enterococcus sp. M5a*. Při pH=7, 12±1 °C, 1 % a 6 % (w/v) NaCl. TYR AE – produkce v aerobním prostředí; TYR AN – produkce v anaerobním prostředí; O.D. (optická denzita) měřena při 655 nm za aerobních podmínek



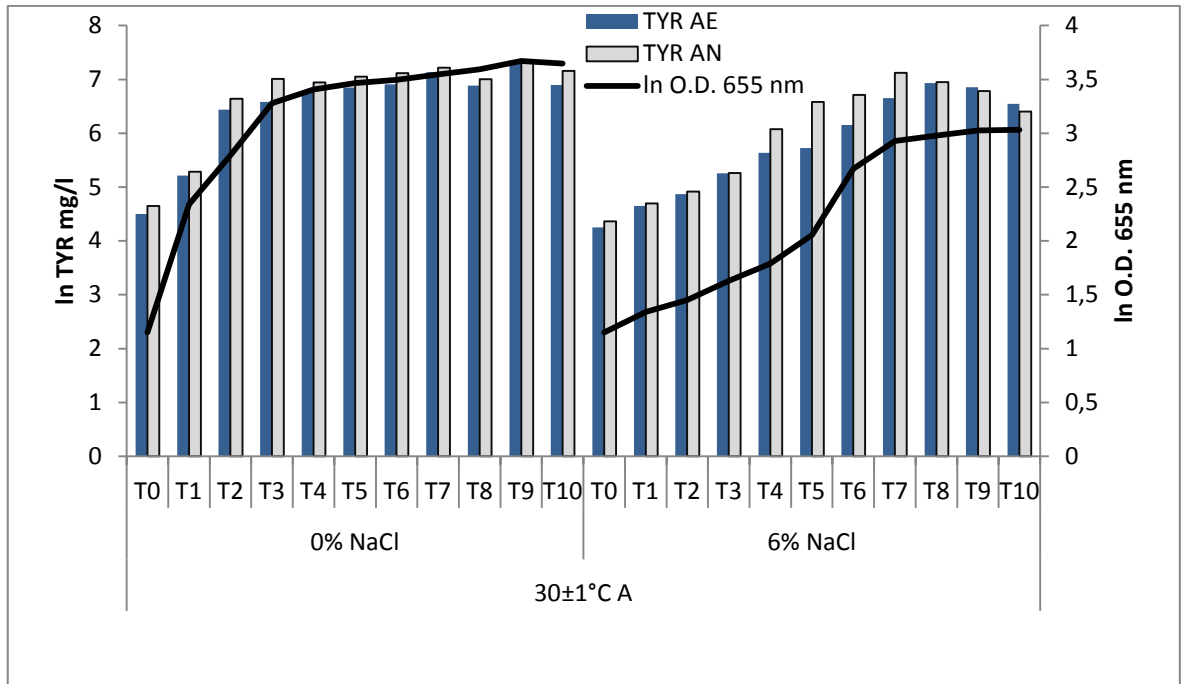
Obr. 15: Produkce kadaverinu u *Enterococcus sp. M5a*. Při pH=7, 12±1 °C, 1 %, 3 % a 6 % (w/v) NaCl. CAD AE – produkce v aerobním prostředí; CAD AN – produkce v anaerobním prostředí; O.D. (optická denzita) měřena při 655 nm za aerobních podmínek

Produkce kadaverinu při 12 ± 1 °C a pH 7 byla výrazně zvýšená druhý den kultivace (CAD <11 mg/l) při všech koncentracích NaCl (obr. 15). Nejvyšší produkce kadaverinu byla zaznamenána při 0 % (w/v) NaCl za aerobních podmínek (CAD $11,86\pm 0,23$ mg/l) a při 3 % (w/v) NaCl za anaerobních podmínek (CAD $10,06\pm 0,19$ mg/l). Produkce sperminu byla výrazná od druhé ho dne kultivace (SPN <23 mg/l), v polovině doby kultivace došlo k ustálení a při koncentracích 1-6 % (w/v) NaCl produkce od 10. dne mírně klesala. Tvorba fenyletylaminu při 12 ± 1 °C byla výrazná od 10. dne kultivace (PHE <24 mg/l) zejména při anaerobních podmínkách (obr. 16). Nejvyšší produkce byla zaznamenána při 1 % (w/v) NaCl (AE PHE $11,96\pm 1,63$; AN PHE $36,86\pm 1,38$ mg/l).

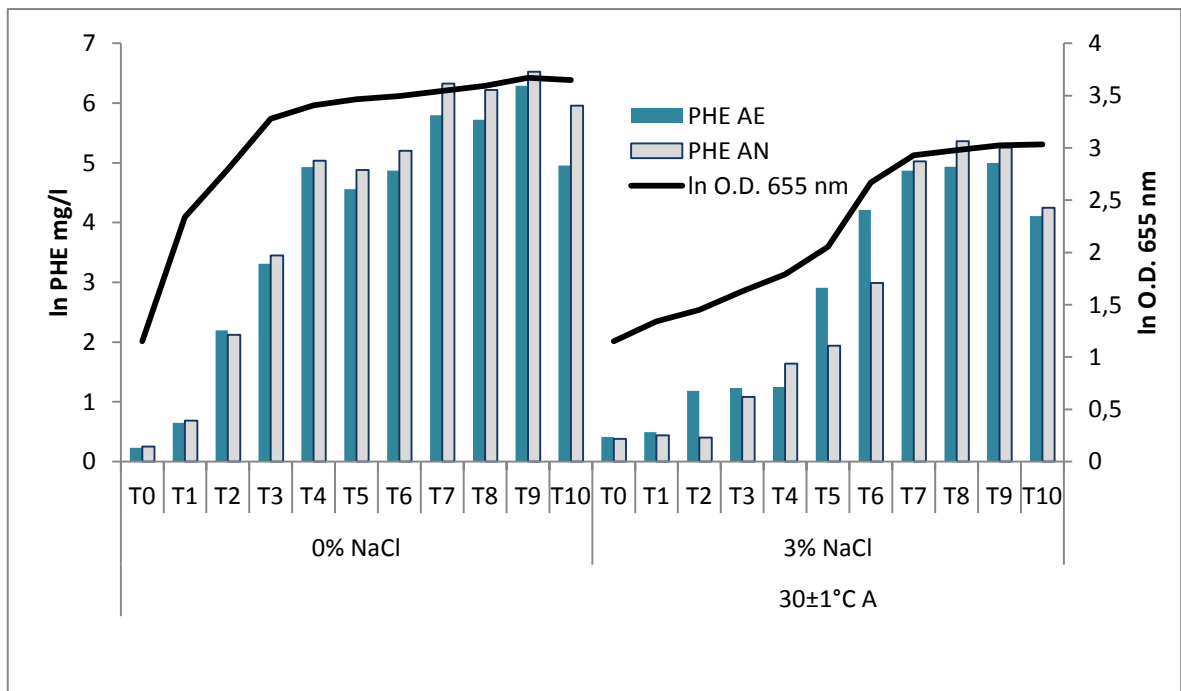


Obr. 16: Produkce fenyletylaminu u *Enterococcus sp. M5a*. Při pH=7. 12 ± 1 °C, 1 %, 3 % a 6 % (w/v) NaCl. PHE AE – produkce v aerobním prostředí; PHE AN – produkce v anaerobním prostředí; O.D. (optická densita) měřena při 655 nm za aerobních podmínek

Produkce biogenních aminů při 30 ± 1 °C a pH 5 byla významná již po dvou hodinách kultivace (TYR $192,62\pm 4,63$ mg/l; SPN $90,47\pm 1,72$ mg/l; CAD $12,06\pm 0,41$ mg/l; PUT $4,39\pm 0,16$ mg/l; PHE $1,98\pm 0,06$ mg/l). Po 48 hodinách kultivace dosahovaly BA při aerobních podmínkách následujících hodnot: TYR <1470 mg/l; PHE <540 mg/l; CAD <9 mg/l; PUT <7 mg/l; SPN <2 mg/l; při anaerobních podmínkách TYR <1490 mg/l; PHE <710 mg/l; CAD <10 mg/l; PUT <7 mg/l; SPN <2 mg/l. Hodnoty pH byly v rozmezí pH 5,2-6,2, úměrně s rostoucí koncentrací NaCl pH klesalo.



Obr. 17: Produkce tyraminu u *Enterococcus sp. M5a*. Při $pH=5$, $30\pm 1^\circ C$, 0 % a 6 % (w/v) NaCl. TYR AE – produkce v aerobním prostředí; TYR AN – produkce v anaerobním prostředí; O.D. (optická denzita) měřena při 655 nm za aerobních podmínek



Obr. 18: Produkce fenyletylaminu u *Enterococcus sp. M5a*. Při $pH=5$, $30\pm 1^\circ C$, 0 % a 3 % (w/v) NaCl. TYR AE – produkce v aerobním prostředí; TYR AN – produkce v anaerobním prostředí; O.D. (optická denzita) měřena při 655 nm za aerobních podmínek

Produkce tyraminu při 30 ± 1 °C byla nejvyšší při 2 % (w/v) NaCl (TYR $1470,65\pm 68,28$ mg/l). Růst produkce při koncentracích 0-3 % (w/v) NaCl byl obdobný (TYR <1470 mg/l), při koncentraci 6 % (w/v) NaCl (TYR $1038\pm 61,72$ mg/l) byl růst produkce pomalejší (obr. 17). Množství fenyletylaminu, které bylo produkováno při 30 ± 1 °C přímo úměrně kopírovalo trend růstu *Enterococcus* sp. (obr. 18) a po 10 hodinách bylo množství vyprodukovaného fenyletylaminu nejvyšší (aerobní podmínky PHE <95 mg/l; anaerobní podmínky PHE <132 mg/l). Růst produkce byl obdobný při 0-2 % (w/v) NaCl (PHE <95 mg/l). Znatelný rozdíl produkce fenyletylaminu byl zaznamenán při 0 % (w/v) NaCl za aerobních (PHE $538,61\pm 0,08$ mg/l) i anaerobních podmínek (PHE $710,91\pm 57,28$ mg/l), narozdíl od 3 % a 6 % (w/v) NaCl (PHE <40 mg/l). Produkce kadaverinu a putrescinu se v době kultivace významně neměnila. Produkce sperminu měla spíše klesající charakter, což je způsobeno jeho funkcí jako prekurzoru dalších polyaminů.

Produkcí tyraminu významně ovlivnila teplota, kdy při 30 ± 1 °C byla produkce několikanásobně vyšší, při 6 ± 1 °C a pH 6 byla produkce tyraminu (TYR <483 mg/l); při 30 ± 1 °C a pH 5 byla produkce tyraminu několikanásobně vyšší (TYR <1470 mg/l). Vliv pH byl patrný při kultivační teplotě 6 ± 1 °C u médií s pH 6 a pH 7. Při pH 7 dosahovalo množství tyraminu hodnot: AE TYR $53,91\pm 3,09$ mg/l, AN TYR $56,66\pm 7,94$ mg/l. Při pH 6 byla produkce při aerobní kultivaci: TYR $482,7\pm 58,29$ mg/l; při anaerobní kultivaci: TYR $333,83\pm 63,77$ mg/l. Rozdíl produkce při aerobních a anaerobních podmínkách byl významný při $12\pm$ °C a pH 7, kdy při anaerobních podmínkách byla produkce tyraminu dvojnásobná oproti aerobnímu prostředí (TYR $1062,63\pm 46,52$ mg/l). Koncentrace NaCl v médiu měla také vliv na růst produkce, při 6 % (w/v) NaCl došlo k výraznému zpomalení růstu produkce tyraminu u všech kultivačních médií. Burdychová a Komprda (2007, s. 153) uvádí, že řada kmenů rodu *Enterococcus* tvoří takové koncentrace tyraminu, které již překračují hladinu toxicity (100 mg/l). Toto tvrzení odpovídá naměřeným hodnotám.

U fenyletylaminu měla kultivační teplota zásadní vliv na jeho produkci. Při 6 ± 1 °C byla produkce fenyletylaminu minimální (PHE <3 mg/l), při 12 ± 1 °C byl patrný růst produkce a při 30 ± 1 °C byla produkce výrazná (AE PHE <538 mg/l; AN PHE <710 mg/l). Vliv pH byl patrný při 6 ± 1 °C, kdy při pH 7 byly hodnoty fenyletylaminu pod mezí detekce (PHE <2 mg/l) a při pH 6 byla vyšší produkce (PHE <9 mg/l). Vyšší produkce PHE byla zaznamenána při anaerobních podmínkách. Při 6 % (w/v) NaCl byla produkce biogenních aminů výrazně nižší u všech kultivačních médií. Bover-Cid et al. (2001, s. 187) zjistili produkci tyraminu v rozmezí 500-4300 mg/l a fenyletylaminu 40-432 mg/l u všech

jimi testovaných kmenů *E. faecium* (5 testovaných kmenů). Výsledky produkce tyraminu byly v tomto rozmezí a produkce fenyletylaminu u testovaného kmene *Enterococcus* sp. byla v tomto rozmezí nebo vyšší (max PHE 710,90±57,28 mg/l).

Produkce kadaverinu byla minimálně ovlivněna teplotou, kdy při 6±1 °C (pH 6 a pH 7) byl minimální růst produkce kadaverinu. Při 12±1 °C byl patrný růst produkce u médií s NaCl <2 % (w/v) a při 30±1 °C nedocházelo k významnému růstu produkce kadaverinu. Vliv pH byl patrný při 6±1 °C, při pH 7 byla produkce nižší (AE CAD <10 mg/l; AN CAD <9 mg/l) a při pH 6 byla zvýšená (AE CAD <14 mg/l; AN CAD <11 mg/l). Oproti předchozím biogenním aminům byla produkce kadaverinu výrazně nižší (CAD <18 mg/l). Mezi produkcí za aerobních a anaerobních podmínek nebyl významný rozdíl.

Růst produkce sperminu byl zaznamenán při 6±1 °C a pH 7 (AE SPN <18 mg/l; AN SPN <19 mg/l), nepatrně vyšší produkce byla zaznamenána při stejné teplotě a pH 6 (AE SPN <20 mg; AN SPN <22 mg/l) a při 12±1 °C a 30±1 °C se produkce neměnila nebo měla mírně klesající charakter. Vliv koncentrace NaCl na produkci sperminu nebyl patrný. Vyšší produkce sperminu byla zaznamenána při anaerobních podmínkách. Vliv teploty na růst produkce putrescinu byl patrný pouze při 30±1 °C (PUT <7 mg/l), u ostatních teplot nedošlo k výraznému růstu. Vliv aerobního a anaerobního prostředí byl patrný pouze při 30±1 °C, kdy byla produkce putrescinu vyšší za anaerobních podmínek (AE PUT 7,04±0,23 mg/l; AN PUT 21,27±2,08 mg/l). Sledované biogenní aminy histamin a spermidin byly pod mezí detekce, z tohoto důvodu nebyly diskutovány.

Z výše uvedených výsledků lze vyčíst trend závislosti tvorby BA a polyaminů na teplotě. S rostoucí teplotou přímo úměrně roste produkce biogenních aminů rodem *Enterococcus* sp. Tvorba biogenních aminů je především ovlivněna růstovou fází buněk (měřenou optickou denzitou) a aktivitou *Enterococcus* sp.

ZÁVĚR

Tato práce byla zaměřena na produkci biogenních aminů rodem *Enterococcus*, konkrétně vybraným kmenem *Enterococcus* sp. M5a při různých kultivačních podmínkách. Mezi nejvýznamnější produkovaný biogenní amin patřil tyramin, jehož koncentrace ve většině přípa dů přesahovala hladinu toxicity (100 mg/l). Druhým nejvíce produkovaným biogenním aminem byl fenyletylamin, který také vykazoval vysoké koncentrace během kultivace.

Během experimentu byl prokázán vliv vybraných faktorů na produkci biogenních aminů, mezi které patřila: teplota, aerobní a anaerobní prostředí, pH a koncentrace NaCl. Vyšší přidavek NaCl vedl ke snížení produkce biogenních aminů. Dále bylo zjištěno, že během anaerobní kultivace došlo k prokazatelně vyšší produkci tyraminu.

Z naměřených hodnot bylo možné konstatovat, že kmen *Enterococcus* sp. M5a izolovaný z masa králíků by mohl být potenciálním původcem kontaminace biogenními aminy během dlouhodobého skladování. Z tohoto důvodu by bylo vhodné sledovat další možné faktory, které by mohly ovlivnit tvorbu biogenních aminů, v rámci navazující diplomové práce.

Výsledky experimentu budou publikovány na 26. kongresu Československé společnosti mikrobiologické v Brně, ve dnech 24.6.- 26.6.2013 a jsou k nahlédnutí u autora, ukázka zpracovaných výsledků viz příloha P II a příloha P III.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- BANDOUNAS, Luaine et al., 2011. Redundancy in putrescine catabolism in solventtolerant *Pseudomonas putida* S12. *Journal of Biotechnology*. 2011, vol. 154, iss. 1, s. 1-10.
- BĚLOHLÁVKOVÁ, Simona a Martin FUCHS, 2005. Scombroid syndrom. *Alergie*. 2005, vol. 3, s. 230-233.
- BIBEK, Ray, 2004. *Fundamental Food Microbiology*. 3rd ed. 2004. ISBN 0-8493-1610-3 1.
- BOVER-CID, Sara et al., 2001. Amino acid-decarboxylase activity of bacteria isolated from fermented pork sausages. *International Journal of Food Microbiology*. 2001, vol. 66, iss. 3, s. 185–189.
- BRYANT, Bronwen a Kathleen KNIGHTS, 2010. *Pharmacology for Health Professionals*. 3rd ed. Australia: ElsevierAustralia, 2010. 1062 p. ISBN 9780729539296.
- BUŇKOVÁ, Leona et al., 2012. Effects of NaCl, lactose and availability of oxygen on tyramine production by the *Enterococcus durans* CCDM 53. *European Food Research and Technology*. 2011. vol. 234, iss. 6, s. 973-979.
- BURDYCHOVÁ, Radka a Tomáš KOMPRDA, 2007. Biogenic amine-forming microbial communities in cheese. *FEMS Microbiology Letters*. 2007, vol. 276, iss. 2, s. 149–155.
- CID, Bover Sara et al., 2008. Amino acid decarboxylation by *Lactobacillus curvatus* CTC273 affected by the pH and glucose availability. *Food Microbiology*. 2008, vol. 25, iss. 2, s. 269–277.
- CORKERY, John M. et al., 2012. The recreational tryptamine 5-MeO-DALT (N,N-diallyl-5-methoxytryptamine): A Brief Review. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*. 2012, vol. 39, iss. 2, s. 259–262.
- CORRY, J. E. L., CURTIS, G. D. W. a R. M. BAIRD, 2003. *Handbook of Culture Media for Food Microbiology*. 37th ed. Elsevier, 2003. 662 p. ISBN 0-444-51084-2.
- DADÁKOVÁ, Eva et al., 2009. Determination of biogenic amines in foods using ultra-performance liquid chromatography (UPLC). *Food Chemistry*. 2009, vol. 116, iss. 1, s. 365-370.

DAVIS, Kenneth L. et al., 2002. *Neuropsychopharmacology: The Fifth generation of Progress*. 1st ed. USA: Lippincott Williams and Wilkins, 2002. 2010 p. ISBN 0-7817-2837-1.

FRANZ, Charles M. A. P., HOLZAPFEL, Wilhelm H. a Michael E. STILES, 1999. Enterococci at the crossroads of food safety?. *International Journal of Food Microbiology*. 1999, vol. 47, iss. 1-2, s. 1-24.

FUGELSANG, Kenneth C. a Charles G. EDWARDS, 2007. *Wine Microbiology: Practical Applications and Procedures*. 2nd ed. Springer, 2007. 393 p. 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*. 2000, vol. 64, iss. 1-2, s. 105-117.

GARDINI, Fausto et al., 2008. Modeling the aminogenic potential of *Enterococcus faecalis* EF37 in dry fermented sausages through chemical and molecular approaches. *Applied and Environmental Microbiology*. 2008, vol. 74, iss. 9, s. 2740-2750.

HAWEL, Leo III et al., 1994. Biosynthesis and selective export of 1,5-diaminopentane (cadaverine) in mycoplasma-free cultured mammalian cells. *Journal of Biological Chemistry*. 1994, vol. 269, iss. 10, s. 7412-7418.

HENRY CHIN, K. D. a P. E. KOEHLER, 1986. Effects of salt concentration and incubation temperature on formation of histamine, phenylethylamine, tryptamine and tyramine during miso fermentation. *Journal of Food Protection*. 1986, vol. 49, s. 423-427.

JOHNSTON, Lynette M. a Lee-Ann JAYKUS, 2004. Antimicrobial resistance of *Enterococcus* species isolated from produce. *Applied and Environmental Microbiology*. 2004, vol. 70, iss. 5, s. 3133-3137.

JUNEJA, Vijay K. a John N. SOFOS, 2010. *Pathogens and Toxins in Food: Challenges and Interventions*. 1. vydání. Washington, DC: ASM Press, 2010. 512 s. ISBN 978-1-55581-459-5. Chapter 16. Biogenic Amines in Foods. 248-274.

JUTEL, Marek et al., 2002. Immune regulation by histamine opionin. *Current Opinion in Immunology*. 2002, vol. 14, iss. 6, s. 735-740.

KAROVIČOVÁ, J. a Z. KOHAJDOVÁ, 2005. Biogenic amines in food. *Chemical Papers*. 2005, vol. 59, iss. 1, s. 70-79.

KONINGS, W. N., KUIPERS, O. a J. H. J. HUIS IN 'T VELD, 1999. *Lactic Acid Bacteria: Genetics, Metabolism and Applications*. 1st ed. Springer, 1999. 411 p. ISBN 978-0792359531.

KULEY, Esmeray a Fatih ÖZOGUL, 2011. Synergistic and antagonistic effect of lactic acid bacteria on tyramine production by food-borne pathogenic bacteria in tyrosine decarboxylase broth. *Food Chemistry*. 2011, vol. 127, iss. 3, s. 1163-1168.

LANDETE, José María et al., 2008. Updated molecular knowledge about histamine biosynthesis by bacteria. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2008, vol. 48, iss. 8, s. 697-714.

LAWLEY, Richard, CURTIS, Laurie a Judy DAVIS, 2012. *The Food Safety Hazard Guidebook*. 1st ed. United Kingdom: The Royal Society of Chemistry, 2012. 533 p. ISBN 978-0-85404-460-3.

LEO, M. L., TOLDRÁ, Nollet a Fidel TOLDRÁ, 2010. *Safety Analysis of Foods of Animal Origin*. 1st ed. USA: CRC Press, 2010. 1002 p. ISBN 978-1-4398-4817-3.

LEROI, F. et al., 2000. Effect of salt and smoke on the microbiological quality of cold smoked salmon during storage at 5 degrees C as estimated by the factorial design method. *Journal of Food Protection*. 2000, vol. 63, iss. 4, s. 502-508.

LUTEN, J. B. et al., 1992. Biogenic amines in fishery products: standardization methods within E.C. *Quality Assurance in the Fish Industry*, Elsevier Science Publishers. B.V. 1992, s. 427-439

MAINTZ, Laura a Natalija NOVAK, 2007. Histamine and histamine intolerance. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2007, vol. 85, iss. 5, s. 1185-1196.

MEDINA, Miguel Ángel et al., 2003. Biogenic amines and polyamines: similar biochemistry for different physiological missions and biomedical applications. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*. 2003, vol. 38, iss. 1, s. 23-59.

NEWTON, David E., 2007. *Chemistry of Drugs*. 1st ed. United States of America: Facts On File, Inc, 2007. 191 p. ISBN 978-0-8160-5276-9.

NOVAK, Maja et al., 2009. Bacterial growth properties at low optical densities. *Antonie van Leeuwenhoek*. 2009, vol. 96, no. 3, s. 267-274.

- OLIVIERA, Sami D. et al., 2005. The effect of roasting on the presence of bioactive amines in coffees of different qualities. *Food Chemistry*. 2003, vol. 90, iss. 1-2, s. 287-291.
- PEREIRA et al., 2010. Dual role for the tyrosine decarboxylation pathway in *Enterococcus faecium* E17: response to an acid challenge and generation of a proton motive force. *Applied and Environmental Microbiology*. 2010, vol. 75, iss. 2, s. 345–352.
- PLEVA, Pavel et al., 2012a. Decarboxylation activity of enterococci isolated from rabbit meat and staphylococci isolated from trout intestines. *Veterinary Microbiology*. 2012, vol. 159, iss. 3-4, s. 438–442.
- PLEVA, Pavel et al., 2012b. Factors affected decarboxylation activity of *Enterococcus faecium* isolated from rabbit. *Potravinárstvo*. 2012, vol. 6, iss. 2, s. 46-49
- QUITTENDEN, Laura J. et al., 2009. Auxin biosynthesis in pea: characterization of the tryptamine pathway. *Plant Physiology*. 2009, vol. 151, iss. 3, s. 1130–1138.
- RAI, Mahendra a Michael CHIKINDAS, 2011. *Natural antimicrobials in food safety and quality*. 1st ed. United Kingdom: MPG BookGroups, 2011. ISBN 978-1-84593-769-0.
- RAO, Govind, 2010. *Optical sensor systems in biotechnology*. 1st ed. Springer, 2010. 161 p. ISBN 978-3-642-03469-5.
- RITCHIE, A. H. a I. M. MACKIE, 1979. The formation of diamines and polyamines during storage of mackerel (*Scombercombus*). *Advances in Fish Science and Technology*. 1979, s. 489–494. Farnham, UK: FishingNews (Books) Ltd.
- SEDLÁČEK, Ivo, 2007. *Taxonomie prokaryot*. 1st ed. Brno: Masarykova univerzita, 2007. 270 p. ISBN 80-210-4207-9.
- SHAH, Pratik a Edwln SWIATLO, 2008. A multifaceted role for polyamines in bacterial pathogens. *Molecular Microbiology*. 2008, vol. 68, iss. 1, s. 4–16.
- SHALABY, Ali R., 1996. Significance of biogenic amines to food safety and human health. *Food Research International*. 1996, vol. 29, iss. 7, s. 675-690.
- SILLA SANTOS, M.H., 1996. Biogenic amines: their importance in foods. *International Journal of Food Microbiology*. 1995, vol. 29, iss. 2-3, s. 213-231.
- ŠUPINOVÁ, Petra, 2009. Studium podmínek aerobní kultivace vybraných kmenů rodu *Lactobacillus*. *Diplomová práce*, 2009, FCH VUT, Brno.

WENDAKOON, C. N. a M. SAKAGUCHI, 1993. Combined effect of sodium chloride and clove on growth and biogenic amine formation of *Enterobacter aerogenes* in mackerel muscle extract. *Journal of Food Protection*. 1993, vol. 56, s. 410–413.

YASSORALIPOUR, Ali et al., 2012. Biogenic amines formation in barramundi (*Latescalcarifer*) fillets at 8°C kept in modified atmosphere packaging with varied CO₂ concentration. *Food Science and Technology*. 2012, vol. 48, iss. 1, s. 142-146.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

AE- aerobní prostředí

AN- anaerobní prostředí

BA- biogenní amin

BHI- brain heart infusion

CAD- kadaverin

DAD- detektor diodového pole

DAO- diaminooxidáza

HIS- histamin

HNMT- histamin-N-metyltransferáza

HPLC- vysoce účinná kapalinová chromatografie

NaCl- chlorid sodný

PHE- fenyletylamin

PUT- putrescin

RP-HPLC- reverzní fáze vysoce účinné kapalinová chromatografie

SD- směrodatná odchylka

SPD- spermidin

SPN- spermin

TYR- tyramin

UV/VIS- ultrafialovo-viditelná oblast

SEZNAM OBRÁZKŮ

<i>Obr. 1: Histamin</i>	13
<i>Obr. 2: Tyramin</i>	14
<i>Obr. 3: Fenyletylamin</i>	15
<i>Obr. 4: Tryptamin</i>	16
<i>Obr. 5: Putrescin, spermidin a spermin</i>	17
<i>Obr.6: Kadaverin</i>	18
<i>Obr. 7: Metabolizmus biogenních aminů a polyaminů u savců (převzato a upraveno dle Medina et al., 2003, s. 30)</i>	23
<i>Obr. 8: Fáze růstové křivky- I - Lag-fáze, II - Fáze zrychlujícího se růstu, III - Exponenciální fáze, IV - Fáze zpomalujícího se růstu, V - Stacionární fáze, VI - Fáze postupného odumírání (Šupinová, 2009, s. 27)</i>	28
<i>Obr. 9: Produkce tyraminu u Enterococcus sp. M5a. Při pH=7, 6±1 °C, 0 % a 6 % (w/v) NaCl. TYR AE – produkce v aerobním prostředí; TYR AN – produkce v anaerobním prostředí; O.D. (optická densita) měřena při 655 nm za aerobních podmínek</i>	37
<i>Obr. 10: Produkce kadaverinu u Enterococcus sp. M5a. Při pH=7, 6±1 °C, 1 % a 6 % (w/v) NaCl. CAD AE – produkce v aerobním prostředí; CAD AN – produkce v anaerobním prostředí; O.D. (optická densita) měřena při 655 nm za aerobních podmínek</i>	38
<i>Obr. 11: Produkce tyraminu u Enterococcus sp. M5a. Při pH=6, 6±1 °C, 1 % a 6 % (w/v) NaCl. TYR AE – produkce v aerobním prostředí; TYR AN – produkce v anaerobním prostředí; O.D. (optická densita) měřena při 655 nm za aerobních podmínek</i>	39
<i>Obr. 12: Produkce tyraminu u Enterococcus sp. M5a. Při pH=6, 6±1 °C, 0 % a 6 % (w/v) NaCl. CAD AE – produkce v aerobním prostředí; CAD AN – produkce v anaerobním prostředí; O.D. (optická densita) měřena při 655 nm za aerobních podmínek</i>	39
<i>Obr. 13: Produkce sperminu u Enterococcus sp. M5a. Při pH=6, 6±1 °C, 0 % a 6 % (w/v) NaCl. SPN AE – produkce v aerobním prostředí; SPN AN – produkce v anaerobním prostředí; O.D. (optická densita) měřena při 655 nm za aerobních podmínek</i>	40

- Obr. 14: *Produkce tyraminu u Enterococcus sp. M5a. Při pH=7, 12±1 °C, 1 % a 6 % (w/v) NaCl. TYR AE – produkce v aerobním prostředí; TYR AN – produkce v anaerobním prostředí; O.D. (optická densita) měřena při 655 nm za aerobních podmínek* 41
- Obr. 15: *Produkce kadaverinu u Enterococcus sp. M5a. Při pH=7, 12±1 °C, 1 %, 3 % a 6 % (w/v) NaCl. CAD AE – produkce v aerobním prostředí; CAD AN – produkce v anaerobním prostředí; O.D. (optická densita) měřena při 655 nm za aerobních podmínek*..... 41
- Obr. 16: *Produkce fenyletylaminu u Enterococcus sp. M5a. Při pH=7. 12±1 °C, 1 %, 3 % a 6 % (w/v) NaCl. PHE AE – produkce v aerobním prostředí; PHE AN – produkce v anaerobním prostředí; O.D. (optická densita) měřena při 655 nm za aerobních podmínek*..... 42
- Obr. 17: *Produkce tyraminu u Enterococcus sp. M5a. Při pH=5, 30±1 °C, 0 % a 6 % (w/v) NaCl. TYR AE – produkce v aerobním prostředí; TYR AN – produkce v anaerobním prostředí; O.D. (optická densita) měřena při 655 nm za aerobních podmínek* 43
- Obr. 18: *Produkce fenyletylaminu u Enterococcus sp. M5a. Při pH=5, 30±1 °C, 0 % a 3 % (w/v) NaCl. TYR AE – produkce v aerobním prostředí; TYR AN – produkce v anaerobním prostředí; O.D. (optická densita) měřena při 655 nm za aerobních podmínek*..... 43

SEZNAM TABULEK

Tab. 1: Prekurzory hlavních biogenních aminů, které se podílejí na otravě jídlem (převzato a upraveno dle Silla Santos, 1996, s. 214)	19
Tab. 2: Teplota, pH a koncentrace NaCl u jednotlivých médií	33
Tab. 3: Rozdíl navažovaného množství látek u médií s různou koncentrací NaCl	34

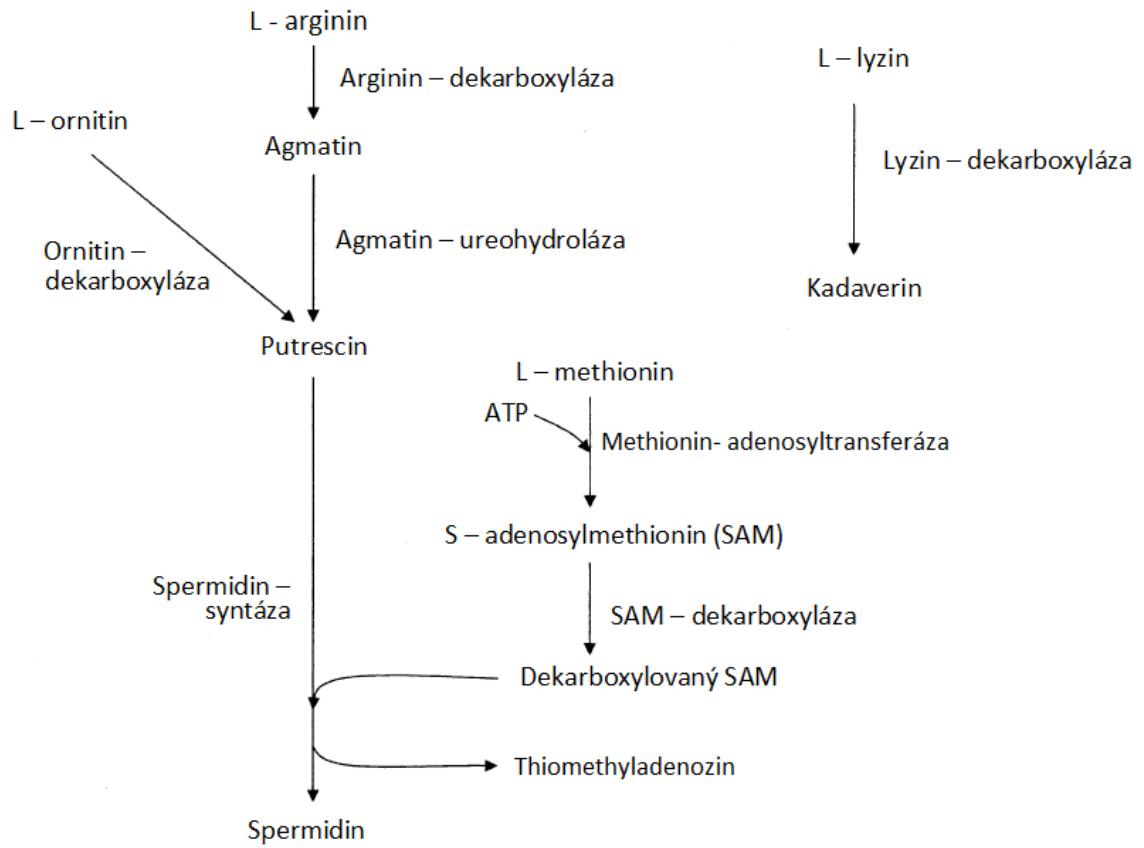
SEZNAM PŘÍLOH

PŘÍLOHA P I: Biosyntetické dráhy pro polyaminy (převzato a upraveno dle Shah a Swiatlo, 2008, s. 6)

PŘÍLOHA P II: Tabulka produkce biogenních aminů při teplotě 30 ± 1 °C a za aerobních podmínek (vybrané výsledky)

PŘÍLOHA P III: Graf produkce biogenních aminů při teplotě 30 ± 1 °C a za aerobních podmínek

PŘÍLOHA P I: Biosyntetické dráhy pro polyaminy (převzato a upraveno dle Shah A Swiatlo, 2008, s. 6)



**PŘÍLOHA P II: Tabulka produkce biogenních aminů při teplotě 30±1 °C
a za aerobních podmínek (vybrané výsledky)**

Teplota	NaCl	ČAS	PHE (mg/l)	SD	TYR (mg/l)	SD	SPN (mg/l)	SD
30±1°C	0% NaCl	T0	1,26	0,10	89,88	1,36	100,96	8,01
		T1	1,92	0,07	183,72	5,84	86,04	2,92
		T2	9,01	0,79	626,32	8,48	22,87	1,38
		T3	27,46	0,99	722,25	13,57	2,96	0,00
		T4	71,28	2,76	871,44	54,20	1,89	0,25
		T5	95,25	5,81	941,13	11,61	1,53	0,03
		T6	129,97	5,06	1003,30	59,57	1,53	0,04
		T7	329,39	15,37	1256,22	40,91	1,38	0,07
		T8	305,42	13,42	977,99	41,77	1,57	0,10
		T9	538,61	0,08	1558,74	1,30	1,23	0,03
	T10	95,38	9,74	990,84	65,78	1,30	0,01	
	1% NaCl	T0	1,26	0,10	89,88	1,36	100,96	8,01
		T1	1,98	0,06	192,62	4,63	78,19	0,98
		T2	6,16	0,29	543,14	17,80	27,82	2,14
		T3	18,95	0,34	800,87	15,33	5,50	0,03
		T4	57,92	1,05	928,96	8,06	1,53	0,05
		T5	77,26	1,91	887,37	36,24	1,72	0,18
		T6	116,49	0,00	953,33	0,00	1,23	0,00
		T7	353,29	10,39	1271,82	74,20	1,53	0,04
		T8	338,19	11,97	1112,00	25,37	1,51	0,12
		T9	455,71	35,22	1510,49	80,57	1,21	0,07
	T10	507,27	23,11	1394,91	58,49	1,43	0,20	
	6% NaCl	T0	1,26	0,10	89,88	1,36	100,96	8,01
		T1	1,51	0,13	104,34	0,60	78,51	6,28
		T2	1,64	0,09	130,22	4,06	70,43	9,15
		T3	3,27	0,73	191,47	22,24	23,03	2,16
		T4	3,44	0,58	280,47	63,26	22,04	0,61
		T5	3,48	0,08	306,71	1,97	18,81	3,35
		T6	1,86	0,26	63,72	1,89	18,71	1,29
		T7	67,35	2,56	777,06	44,65	1,56	0,01
T8		130,00	16,62	1026,66	104,56	1,36	0,21	
T9		139,26	16,69	1009,32	92,37	1,57	0,17	
T10	148,50	2,38	1038,70	61,72	1,33	0,07		

PŘÍLOHA P III: Graf produkce biogenních aminů při teplotě 30 ± 1 °C a za aerobních podmínek

