

**FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ PRODUKCI
BIOGENNÍCH AMINŮ
U VYBRANÝCH BAKTERIÍ RODŮ
ENTEROCOCCUS A *STAPHYLOCOCCUS***

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

Autor: Ing. Pavel Pleva

Studijní program: P2901 Chemie a technologie potravin

Studijní obor: 2901V013 Technologie potravin

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

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

Zlín, 8/2017

© Pavel Pleva

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

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

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

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

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

[Jan Amos Komenský]

Poděkování:

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

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

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

ABSTRAKT

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

ABSTRACT

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

OBSAH

| | |
|---|----|
| ABSTRAKT | 4 |
| ABSTRACT | 5 |
| OBSAH..... | 8 |
| 1. SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY | 10 |
| 1.1 Charakteristika studovaných rodů | 10 |
| 1.1.1 Rod <i>Enterococcus</i> | 10 |
| 1.1.2 Rod <i>Staphylococcus</i> | 12 |
| 1.2 Charakteristika biogenních aminů | 14 |
| 1.3 Funkce a význam biogenních aminů a polyaminů | 14 |
| 1.4 Mechanismus tvorby biogenních aminů u bakterií | 16 |
| 1.5 Výskyt a význam biogenních aminů v potravinách | 23 |
| 1.5.1 Nefermentované potraviny | 24 |
| 1.5.2 Fermentované potraviny..... | 26 |
| 1.6 Vliv příjmu biogenních aminů z potravin na člověka | 35 |
| 1.7 Faktory ovlivňující produkci biogenních aminů | 36 |
| 1.7.1 Teplota | 37 |
| 1.7.2 Hodnota pH | 38 |
| 1.7.3 Aktivita vody | 39 |
| 1.7.4 Aerobní a anaerobní prostředí | 41 |
| 1.7.5 Dostupnost volných aminokyselin | 41 |
| 2. CÍL DISERTAČNÍ PRÁCE..... | 42 |
| 3. MATERIÁL A METODY..... | 43 |
| 3.1 Materiál | 43 |
| 3.1.1 Použité bakteriální kmeny | 43 |
| 3.1.2 Kultivační podmínky | 43 |
| 3.2 Popis experimentální části | 44 |
| 3.2.1 Experiment I | 44 |
| 3.2.2 Experiment II..... | 46 |
| 3.3 Metody využívané v experimentální části | 47 |
| 3.3.1 Stanovení nárůstu buněk..... | 47 |
| 3.3.2 Měření pH kultivačního média..... | 48 |
| 3.3.3 Stanovení aminokyselinového profilu kultivačních médií..... | 48 |
| 3.3.4 Stanovení biogenních aminů kapalinovou chromatografií | 48 |
| 3.3.5 Statistické metody hodnocení dat..... | 49 |
| 5. VÝSLEDKY A DISKUZE | 51 |
| 5.1 Výsledky experimentu I – dekarboxylázová aktivita | 51 |
| 5.1.1 <i>Enterococcus</i> sp..... | 51 |
| 5.1.2 <i>Staphylococcus</i> sp..... | 52 |
| 5.2 Diskuze k experimentu I..... | 53 |
| 5.3 Výsledky experimentu II – sledování vlivu faktorů | 56 |
| 5.3.1 <i>Enterococcus faecium</i> M2C..... | 57 |

| | | |
|-------|---|-----|
| 5.3.2 | <i>Enterococcus faecium</i> 5BM1 | 63 |
| 5.3.3 | <i>Enterococcus</i> sp. M5a | 64 |
| 5.3.4 | <i>Staphylococcus epidermidis</i> 21/2..... | 69 |
| 5.3.5 | <i>Staphylococcus hominis</i> 20/2..... | 75 |
| 5.3.6 | <i>Staphylococcus pasteurii</i> 19/1 | 79 |
| 5.3.7 | Statistické hodnocení produkce biogenních aminů | 85 |
| 5.4 | Diskuze k experimentu II | 87 |
| | ZÁVĚR | 93 |
| | PŘÍNOS PRÁCE PRO VĚDU A PRAXI | 95 |
| | SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY | 96 |
| | SEZNAM TABULEK A ILUSTRACÍ | 121 |
| | SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK | 124 |
| | PŘEHLED PUBLIKAČNÍ ČINNOSTI..... | 126 |
| | <i>CURRICILUM VITAE</i> | 129 |
| | PŘÍLOHA I | 130 |
| | PŘÍLOHA II | 131 |
| | PŘÍLOHA III..... | 147 |
| | PŘÍLOHA IV | 150 |

1. SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

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

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

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

1.1 Charakteristika studovaných rodů

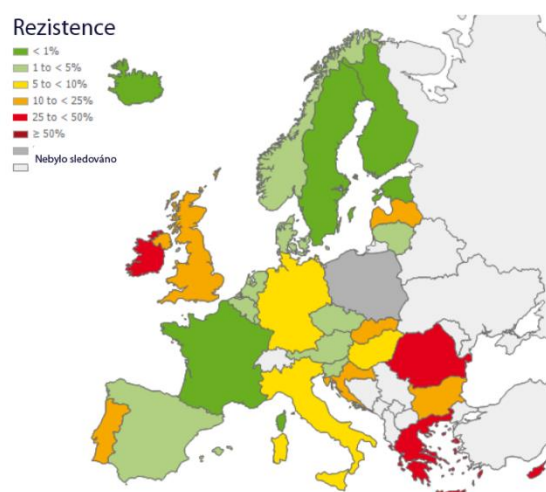
1.1.1 Rod *Enterococcus*

Rod *Enterococcus* taxonomicky náleží do domény *Bacteria*, kmene *Firmicutes*, třídy *Bacilli*, řádu *Lactobacillales*, čeledi *Enterococcaceae*. Enterokoky patří do skupiny grampozitivních bakterií, mají sférické nebo ovoidní buňky. Vyskytují se po dvou, ve shlucích nebo krátkých řetězcích. Netvoří endospory. Některé druhy jsou pohyblivé s nevýraznými bičíky a

netvoří pouzdra. Bakterie rodu *Enterococcus* jsou fakultativně anaerobní, chemoorganotrofní s fermentativním metabolismem, vyžadují nutričně bohatá média. Využívají široké rozmezí sacharidů. Hlavním produktem fermentace je L(+) kyselina mléčná bez tvorby plynu. Enterokoky mohou růst v širokém teplotním rozmezí, řada kmenů může růst při teplotách kolem -1 °C. Maximální uváděná teplota růstu je 50 °C, ale teplota optimální pro řadu druhů je 37 °C (Sedláček, 2007). Enterokoky jsou rezistentní vůči zmrazení a přežívají skladování při teplotě -70 °C po dobu několika let (Lawley *et al.*, 2012). Bakterie jsou kataláza negativní, na krevním agaru často viridují (α -hemolýza). Rostou také v přítomnosti 6,5 % NaCl nebo při 40 % žluči v médiu a při pH 9,6. Zdrojem enterokoků v potravinách je především kontaminace z vnitřního obsahu střev savců. Díky znečištění životního prostředí se vyskytují enterokoky běžně také v půdě, vodě, na rostlinách i hmyzu (Franz, 2003; Franz a Holzapfel, 2006). Občas způsobují pyogenní infekce. Mezi nejvýznamnější zástupce tohoto rodu patří *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. durans*, *E. malodoratus*, *E. raffinosus*, *E. flavescens* (Sedláček, 2007; Holzapfel a Wood, 2014).

Rezistence (%) Enterococcus faecium na vybraná antibiotika v ČR v letech 2005 – 2012

| | Aminopenicillin | Vankomycin |
|------|-----------------|------------|
| 2005 | 91,9 | 13,7 |
| 2006 | 90,1 | 3,8 |
| 2007 | 91,3 | 6,1 |
| 2008 | 94,0 | 8,1 |
| 2009 | 97,6 | 5,7 |
| 2010 | 97,3 | 4,8 |
| 2011 | 97,2 | 7,6 |
| 2012 | 97,7 | 11,5 |



Obr. 1. Rezistence na vankomycin u Enterococcus faecium v Evropě v roce 2012. Tabulka rezistence Enterococcus faecium v ČR v letech 2005–2012 (European Centre for Disease Prevention and Control, 2013).

V posledních letech dochází ke znepokojivému zvýšení výskytu antibiotické rezistence u enterokoků (Obr. 1). Enterokoky mohou být původci alimentárních onemocnění a klinických infekcí (močopohlavního systému, bakteriémie, endokarditidy, peritonitidy, infekce měkkých tkání pánevní oblasti a pooperačních ran). Často způsobují infekce polymikrobního charakteru. U enterokoků se můžeme setkat s rezistencí přirozenou i získanou (přenosnou). Přirozená rezistence je dána vrozenou necitlivostí buněk, vzniká důsledkem mutací genu na bakteriálním chromozomu. Přenosná rezistence vzniká na základě působení vnějších podmínek, kdy jsou geny zodpovědné za rezistenci

lokalizovány na plazmidech a transpozomech. Používání a nadužívání antibiotik vede k přenosu rezistentních enterokoků v potravinách živočišného původu (Jiménez *et al.*, 2013; Holzapfel a Wood, 2014). Do přirozené antibiotické rezistence řadíme odolnost vůči cefalosporinům, nízkým hladinám betalaktamů, sulfonamidům a nízkým hodnotám klindamycinu a aminoglykosidů, zatímco příkladem získané rezistence může být rezistence na chloramfenikol, erythromycin, vysoké hladiny klindamycinu a aminoglykosidů, tetracyklin, vysoké hladiny betalaktamů, fluorochinolony a glykopeptidy (zejména vankomycin) (Top *et al.*, 2008; Holzapfel a Wood, 2014). Rezistence na vankomycin má mimořádný význam, neboť toto antibiotikum bývá považováno za poslední možnost při léčbě vícenásobných enterokokových infekcí (Leclercq, 1997; Holzapfel a Wood, 2014).

1.1.2 Rod *Staphylococcus*

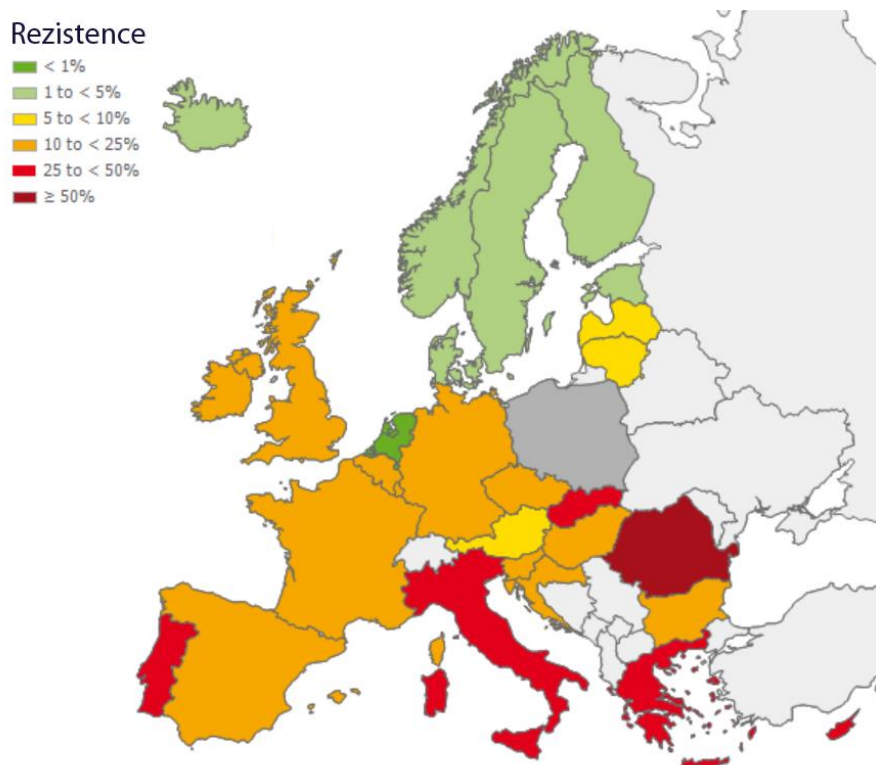
Rod *Staphylococcus* taxonomicky náleží do domény *Bacteria*, kmene *Firmicutes*, třídy *Bacilli*, řádu *Bacillales*, čeledi *Staphylococcaceae*. Bakterie tohoto rodu jsou sférické, vyskytující se jednotlivě, po dvou a v nepravidelných shlucích, občas v tetradách. Kolonie jsou obvykle neprůhledné a mohou být bílé nebo krémové, občas žluté až žlutooranžové. Jsou grampozitivní, nepohyblivé, nesporulující, fakultativně anaerobní. Chemoorganotrofní metabolismus je respiratorní i fermentatorní. Stafylokoky jsou kataláza pozitivní a oxidáza negativní. Rostou v přítomnosti 10 % NaCl. Optimální růstová teplota se pohybuje mezi 30 a 37 °C. Stafylokoky patří mezi všudypřítomné bakterie, jejich výskyt je primárně svázán s kůží, kožními žlázami a sliznicemi teplokrevných obratlovců. Dále bývají často izolovány z potravin živočišného původu (maso, mléko, sýry) a z nejrůznějších zdrojů v prostředí jako je půda, voda, písek a prach. Některé druhy jsou oportunně patogenní pro zvířata (Sedláček, 2007).

Během posledních patnácti let došlo k výraznému taxonomickému rozvoji tohoto rodu, který nyní zahrnuje okolo padesáti taxonů. Mezi koaguláza pozitivní a novobiocin citlivé stafylokoky řadíme *S. aureus* subsp. *aureus*, *S. aureus* subsp. *anaerobius*, *S. intermedius*, *S. schleiferi* subsp. *schleiferi*, *S. lugdunensis*. Příkladem koaguláza negativních a novobiocin citlivých stafylokoků jsou *S. epidermidis*, *S. warneri*, *S. haemolyticus*, *S. hominis* subsp. *hominis*, *S. simulans*, *S. carnosus*. Zástupci skupiny koaguláza negativních a novobiocin rezistentních stafylokoků jsou: *S. saprophyticus* subsp. *saprophyticus*, *S. cohnii*, *S. xylosus*, *S. hominis* subsp. *novobiosepticus* (Sedláček, 2007).

Kromě toho, že jsou bakterie rodu *Staphylococcus* jednou z hlavních příčin humánních infekcí (od mírné infekce měkkých tkání a kůže, až k životu ohrožujícím sepsím, endokarditidě a pneumoniím), zvyšující se antimikrobiální rezistence této bakterie představuje vážnou hrozbu pro veřejné zdraví (Obr. 2) (European Centre for Disease Prevention and Control, 2013). Potraviny

využívané pro výživu člověka jsou zřídka sterilní. V potravinách se vyskytují mikroorganismy ve formě společenstev, jejichž složení je dáno původem a zpracováním potravin. Většina mikroorganismů pochází z mikroflóry přirozeně se vyskytující na potravinách a potravinářských surovinách. Stafylokoky se do potravin mohou dostat především během sklizně plodin či porážky hospodářských zvířat, během skladování a distribuce. Ve většině případů mají stafylokoky na kvalitu potravin nevratný a negativní účinek. Způsobují kažení potravin, mění organoleptické vlastnosti a mohou být původci onemocnění. *Staphylococcus aureus* tvoří několik desítek termostabilních enterotoxinů. Tělo na tyto toxiny reaguje již několik minut po požití infikované potravin (Yang *et al.*, 2016).

Staphylococcus aureus, zvláště pak meticilin rezistentní (MRSA), je život ohrožující patogen lidí, a jeho přítomnost v potravinách je problémem veřejného zdraví. Studie Yang *et al.* (2016) potvrzuje výskyt 12,5 % meticilin rezistentních *S. aureus* v potravinách. Ostatní sledované kmeny *S. aureus* (69 izolátů) byly rezistentní na tři nebo více antibiotik.



Obr. 2. Rezistence na meticilin-rezistentní *Staphylococcus aureus* (MRSA) v Evropě v roce 2012 (European Centre for Disease Prevention and Control, 2013).

Zástupci rodů *Enterococcus* a *Staphylococcus* mohou v potravinách prokazovat dekarboxylázovou aktivitu a produkovat BA (Cosentino *et al.*, 2004, Martín *et al.*, 2006, Burdychová a Komprda, 2007, Buňková *et al.*, 2009, Even *et al.*, 2010 a Latorre–Moratalla *et al.*, 2010).

1.2 Charakteristika biogenních aminů

Podle definice Askar a Treptow (1986) jsou biogenní aminy bazické dusíkaté sloučeniny tvořené především dekarboxylací aminokyselin nebo aminací a transaminací aldehydů a ketonů. Dekarboxylace je reakce, kdy se odbourává karboxylová skupina a vytváří se oxid uhličitý za účasti dekarboxyláz (Murray, 2002). Biogenní aminy jsou organické báze s nízkou molekulovou hmotností mající heterocyklickou (histamin, tryptamin), aromatickou (tyramin, β -fenyletylamin) nebo alifatickou (putrescin, kadaverin, spermin a spermidin) strukturu. Někteří autoři (Bardot *et al.*, 1993; Halász *et al.*, 1994; Santos, 1996; Teti *et al.*, 2002; Juneja a Sofos, 2010) řadí putrescin, spermin, spermidin a kadaverin do skupiny polyaminů, které hrají důležitou roli při regulaci funkce nukleových kyselin, syntéze proteinů a stabilizaci membrán.

BA jsou syntetizovány mikroorganismy, rostlinami i živočichy (ten Brink *et al.*, 1990; Shalaby, 1996; Newton, 2007). Dekarboxylázy vyskytující se v potravinářských surovinách a potravinách jsou označovány za endogenní. Produkce endogenními dekarboxylázami je však zanedbatelná ve srovnání s exogenní (mikrobiální) produkcí (Wendakoon a Sakaguchi, 1993).

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

1.3 Funkce a význam biogenních aminů a polyaminů

BA a polyaminy se podílejí na metabolických procesech v buňkách mikroorganismů, rostlin i živočichů, kde vykazují různé biologické funkce. Podílejí se na důležitých fyziologických procesech. Jsou významné v procesech růstu, podílejí se na diferenciaci buněk, stabilizaci membrán a regulaci pH. Mohou mít přímo funkci hormonu nebo mohou být stavební látkou pro biosyntézu hormonů či alkaloidů. Jsou tak přirozenou součástí potravin rostlinného i živočišného původu. Vznikají také vlivem některých procesů při zpracování potravin (Bardot *et al.*, 1993; Halász *et al.*, 1994; Santos, 1996; Teti *et al.*, 2002; Juneja a Sofos, 2010). Mikroorganismy produkující dekarboxylázy se vyskytují jako přirozená mikroflóra suroviny nebo se do potraviny mohou dostat jako kontaminanty při zpracování a v neposlední řadě je pravděpodobnost, že jsou přidávány do potravin v závislosti

na technologickém procesu výroby (Halász *et al.*, 1994). Dva hlavní důvody pro aktivaci dekarboxylačních drah mikroorganismů jsou ty, že dekarboxylace je jednou z buněčných odpovědí na stres vyvolaný kyselým prostředím, kdy se produkcí zásaditých BA zvyšuje intracelulární (a extracelulární) pH a dále tato dráha může sloužit jako doplňkový zdroj energie pro buňky (Gardini *et al.*, 2016).

Polyaminy se nacházejí v mnoha organizmech a působí jako signální a regulační molekuly. Jsou nezbytné pro normální buněčný růst a množení prokaryotických a eukaryotických buněk, v závislosti na podmínkách stresu způsobeného reaktivními formami kyslíku, teplem, UV zářením, kyselým prostředím a osmotickým tlakem (Bandounas *et al.*, 2011). Spermidin a spermin se podílejí na vývoji střevní tkáně savců (Santos, 1996). Spermin je schopen regenerovat tokoferol z tokoferoxylového radikálu přes donor vodíků z aminoskupiny. Sperminový radikál následně váže lipidové nebo peroxidové radikály do lipidového komplexu (Károvičová a Kohajdová, 2005). Koncentrace sperminu v bakteriálních buňkách není přesněji známa (Shah a Swiatlo, 2008). U téměř všech bakterií se intracelulární obsah spermidinu pohybuje v rozmezí 6,9 – 20,7 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ a je vyšší než obsah putrescinu 1,1 – 2,2 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$. V eukaryotických buňkách jsou polyaminy lokalizovány především v cytoplazmě, vakuolách, mitochondriích a chloroplastech. Polyaminy hrají důležitou roli v řadě fyziologických procesů rostlin, ke kterým patří iniciace kvetení a vývoj plodů (Halász *et al.*, 1994).

Biogenní aminy jsou pro lidský organizmus v určitých koncentracích nepostradatelné. Mají vliv na růst, vývoj a diferenciaci eukaryotických buněk (Příloha I, Tab. 1). Vedle růstu buněk rovněž ovlivňují regulaci nukleových kyselin, stabilizaci membrán, syntézu bílkovin, slouží jako prekurzory některých hormonů, plní funkci neurotransmiterů, apod. (Bardot *et al.*, 1993; Halász *et al.*, 1994; Santos, 1996; Juneja a Sofos, 2010). Z fyziologického hlediska mají největší význam histamin a tyramin. Histamin lze u člověka detekovat v různých koncentracích ve tkáni mozku, plic, kůže, žaludku, tenkého a tlustého střeva a dělohy. Nachází se v žírných buňkách, ze kterých se histamin uvolňuje při zánětech a alergických reakcích. Náhlé uvolnění histaminu způsobí vazodilataci a zvyšuje permeabilitu kapilár. Histamin ovlivňuje receptory nacházející se v mozku, které se podílejí na srdečním rytmu, zprostředkovává cévní a bronchiální svalové odpovědi při procesech alergických reakcí, ovlivňuje pozornost a kognitivní funkci mozku. Podílí se také na stimulaci receptorů vyvolávajících sekreci žaludeční kyseliny a kontrakci hladkého svalstva střev (Rangachari, 1992; Coruzzi *et al.*, 2001; Jørgensen *et al.*, 2007; Maintz a Novak, 2007). Toxicita histaminu je zesílena v přítomnosti dalších aminů, jako jsou kadaverin a putrescin, které snižují účinnost detoxikačních mechanismů monoaminoxidáz a diaminoxidáz (Shalaby, 1996).

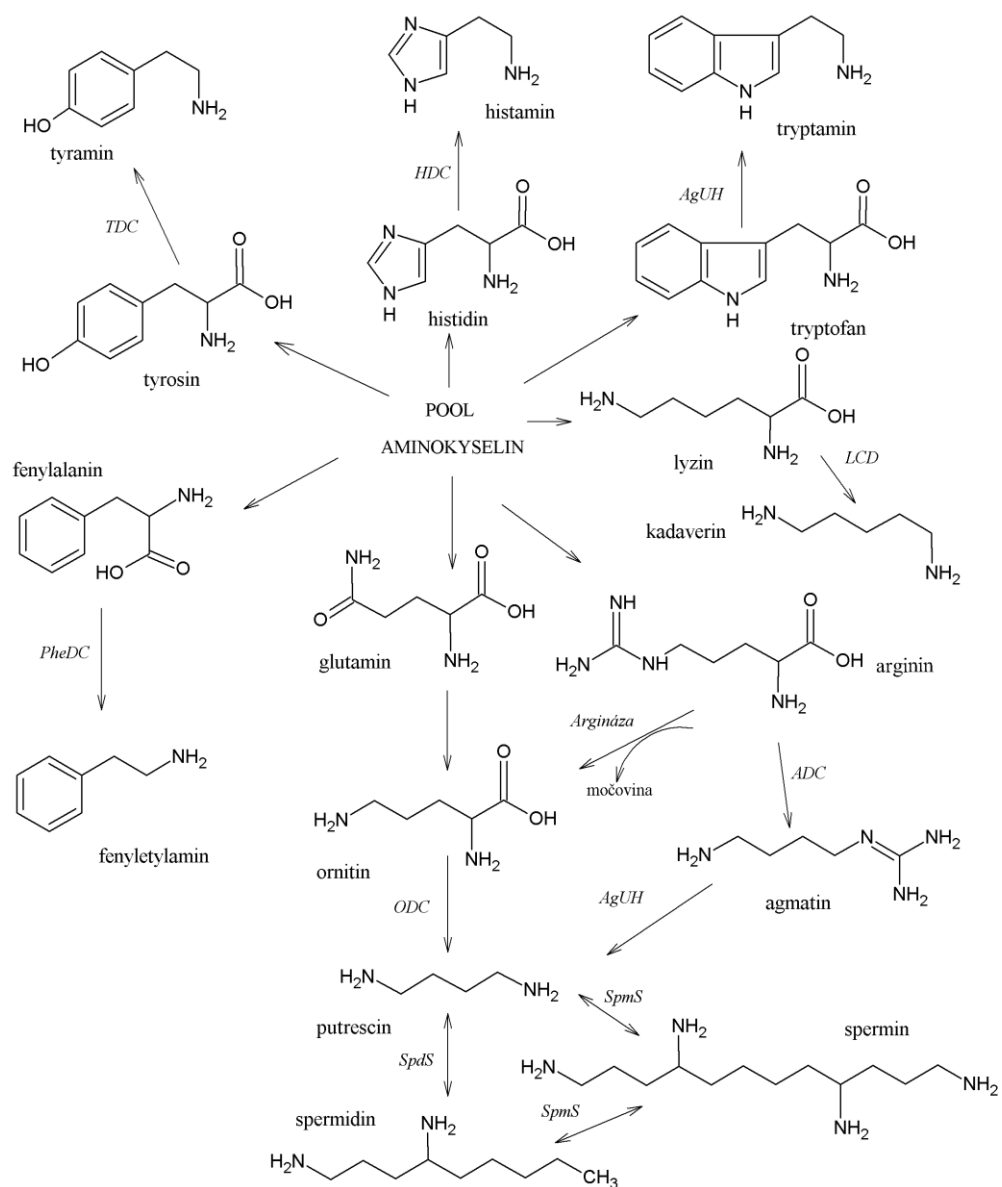
Fenyletylamin je inhibítozem diaminooxidázy a histamin-*N*-metyltransferázy (Santos, 1996).

Tyramin a fenyletylamin jsou řazeny do skupiny stopových endogenních aminů s velkou strukturní podobností a funkcí monoaminových neuropřenašečů. Slouží k udržení neuronální aktivity monoaminových neurotransmiterů. Jsou vázány na proteiny a propojeny receptory (přítomnými na cytoplazmatické membráně buněk), z nichž některé jsou specificky aktivovány stopovými endogenními aminy (Lindemann *et al.*, 2005; Berry, 2007). Tyto receptory se nachází v cévách, což vysvětluje účinek tyraminu na krevní tlak. Tyramin může být přeměněn na oktopamin a dále noradrenalin, který způsobuje hypertenzi a jiné sympatomimetické účinky (Maguire *et al.*, 2002; Lindemann *et al.*, 2005; Berry, 2007). Tyramin patří k nejhojněji se vyskytujícím BA ve fermentovaných výrobcích. Vzhledem k tomu, že je silným vazokonstriktorem, může při vysokých koncentracích v organizmu vyvolat hypertenzi, migrény, krvácení do mozku a selhání srdce (Kuley a Özogul, 2011). Fenyletylamin má významné biologické funkce včetně vaskulárních účinků (Zamora *et al.*, 2012).

Polyaminy putrescin, spermin a spermidin (vzniklé metylací z putrescinu) mají esenciální vliv na růst buněk, regulaci genové exprese tím, že mění strukturu DNA modulací signálních drah a při modulaci cest přenosu signálu. Molekuly polyaminů při fyziologickém pH nesou kladný náboj na jejich primární a sekundární aminoskupině. Tak polyaminy mohou působit jako ligandy na různých místech DNA, RNA, proteinech, fosfolipidech a nukleosidtrifosfátech. Optimální funkce buněk vyžaduje určitý intracelulární obsah polyaminů. Malé množství perorálně podávaných polyaminů indukuje růst buněk, avšak větší množství růst ve skutečnosti inhibuje. Studie, která polyaminy řadí mezi látky důležité při vývoji střevního epitelu, uvádí, že polyaminy hrají také roli v prevenci potravinových alergií (Dufour *et al.*, 1988; Dandriofosse *et al.*, 2000; Linsalata a Russo, 2008).

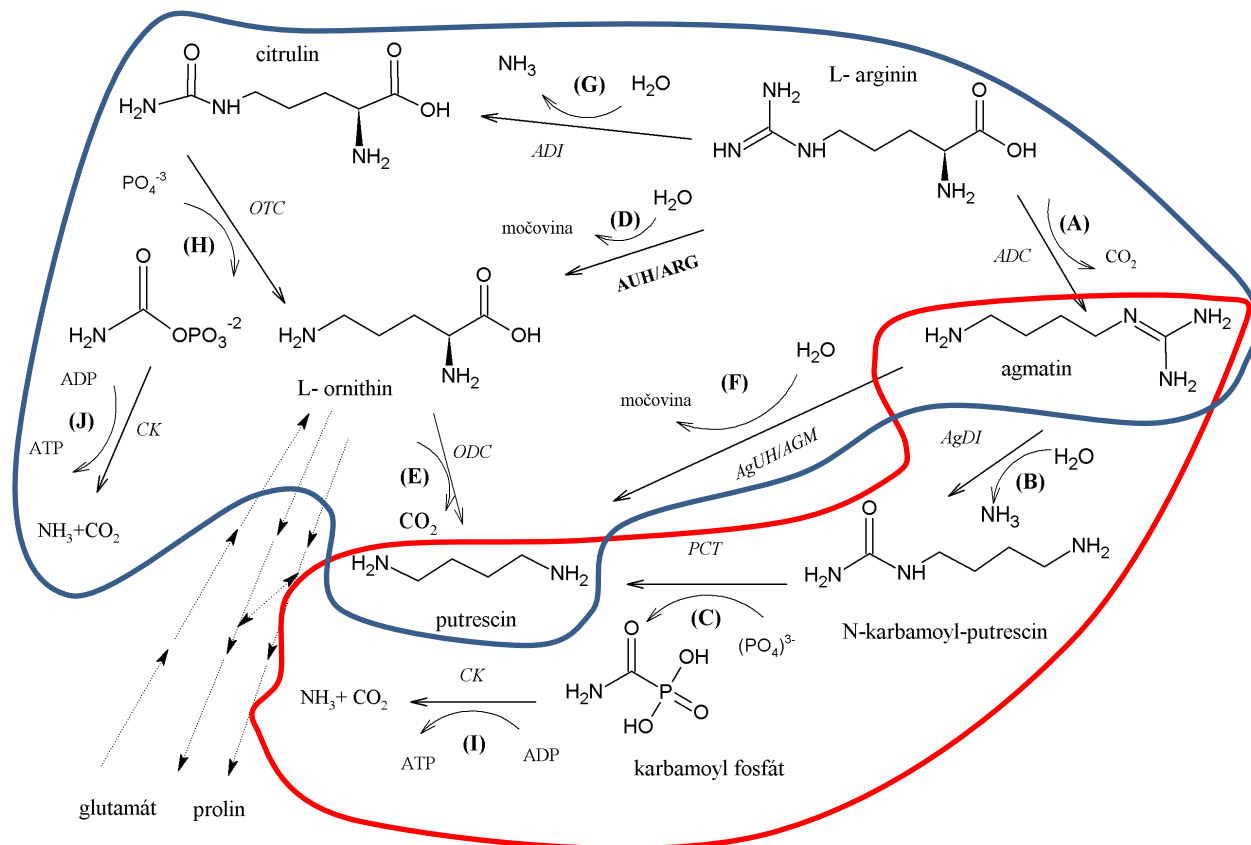
1.4 Mechanismus tvorby biogenních aminů u bakterií

Bakterie produkující biogenní aminy jsou ve svém genomu vybaveny geny pro dekarboxylázy, které se dají rozdělit dle jejich substrátu. Na Obrázku 3 jsou zobrazeny reakce, jež jsou součástí sekundárního metabolismu. U enterokoků se velmi často popisuje přítomnost genu pro membránově vázanou tyrozindekarboxylázu (*tdc*) (Bhardwaj *et al.*, 2009; Marcobal *et al.*, 2012), ale mohou se vyskytnout i jiné. Stafylokoky izolované z potravin mohou disponovat celou řadou dekarboxyláz, které tvoří histamin, putrescin, kadaverin a další (Pachlová *et al.*, 2016).



Obr. 3. Produkce biogenních aminů dekarboxyláza pozitivními mikroorganismy (upraveno podle Halász et al., 1994).

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



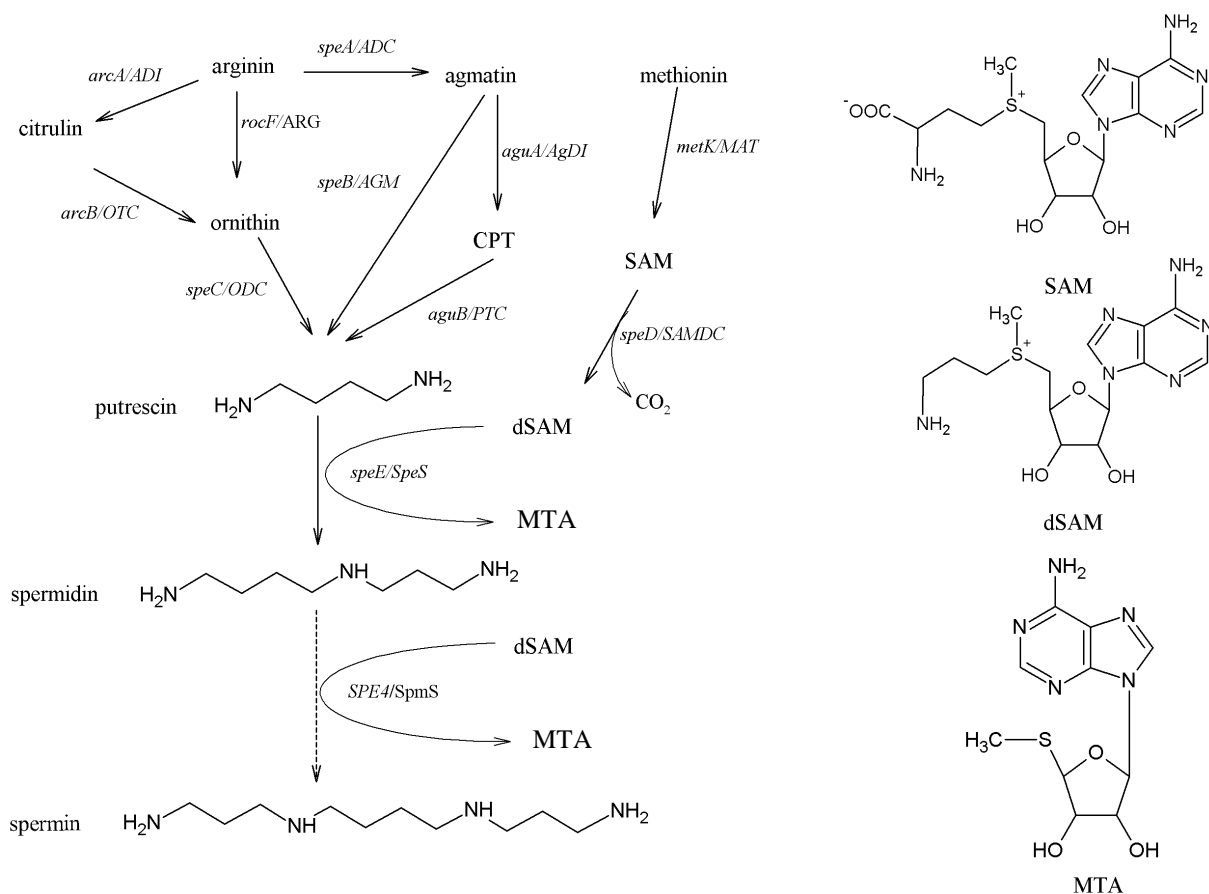
Obr. 4. Dráha biosyntézy putrescinu u grampozitivních a gramnegativních bakterií (upraveno dle Budin–Verneuil *et al.*, 2006; Benkerroum, 2016).

Gramnegativní a grampozitivní bakterie – modrá, bakterie mléčného kvašení – červená dráha. ARG – argináza; AUH – argininureohydroláza; ADC – arginindekarboxyláza; AgDI – agmatindeimináza; PCT – putrescinkarbamoyltransferáza; ODC – ornitindekarboxyláza; AGM/AUH – agmatináza/agmatinureohydroláza; OCT ornitinkarbamoyltransferáza; ADI – arginindeimináza; CK – karbamátkináza; ADP – adenosindifosfát; ATP – adenosintrifosfát.

Na mikrobiální tvorbě putrescinu se podílí 5 drah (Obr. 4) – arginindekarboxylázová dráha (A – C), dráha argináz (D, E), cesta agmatindekarboxylázy (A – F), dráha arginindeaminázy (A, H a I) a ornitindekarboxylázy (E). Pro gramnegativní a grampozitivní bakterie je znázorněna modře, červená dráha znázorňuje biosyntézu putrescinu u bakterií mléčného kvašení, ačkoli některé bakterie mléčného kvašení mohou využívat dráhu ADI (G) (Budin-Verneuil *et al.*, 2006; Benkerroum, 2016). Glutamát je přeměňován biosyntézou argininu. Některé mikroorganismy využívají ornitin jako meziprodukt biosyntézy putrescinu. L-ornitin je tvořen z argininu katabolickou drahou arginázami u některých bakterií a kvasinek a vznikají jiné produkty než putrescine. Biosyntéza putrescinu z agmatinu je vlastnost kmenově specifická. Dráha agmatinu (AGM) je biosyntetická trasa vyznačující se tvorbou spermidinu, který může být z buňky vyloučen. Tato dráha byla popsána nejen

u zástupců čeledi *Enterobacteriaceae* (Shah a Swiatlo, 2008), ale i u rodu *Bacillus* (Ivanova *et al.*, 2003) a *Pseudomonas* (Ichise *et al.*, 2015). K převaze metabolismu za přítomnosti agmatináz dochází u bakterií způsobujících kontaminaci mléka. Dráha agmatindeamináz (AgDI) se vyskytuje u rodů *Pseudomonas*, *Aeromonas* a bakterií mléčného kvašení. Výsledkem této dráhy je tvorba adenosintrifosfátu (ATP), alkalizace média a hromadění putrescinu. Zmíněná dráha je pravděpodobně nejčastěji využívána pro podporu růstu buněk, které již vyčerpaly živiny ve svém okolí. Bylo prokázáno, že produkce putrescinu bakteriálním druhem *Lactococcus lactis* byla rychlejší ve stacionární fázi růstové křivky (del Rio *et al.*, 2015).

Polyaminy mohou vznikat i mnohem složitějšími reakcemi (Obr. 5).



Obr. 5. – Biosyntéza polyaminů (Morgan, 1999).

Ornitindekarboxyláza (ODC), spermidinsyntetáza, sperminsyntetáza, acetylkoenzym A – N¹-spermidin/spermintransferáza (SSAT), polyaminoxidáza (PAO), N⁸-acetylspermidintransferáza, diaminoxidáza (DAO), S-adenosylmetionin dekarboxyláza (SAM), S-adenosylmetioninhomocysteinamin (SAMHC), 5'-metyltioadenozin (5' MTA).

Je obecně přijímáno, že pokud jsou buňky vystaveny okyselení, dekarboxylační dráhy jsou aktivovány pro zvýšení odolnosti buněk a udržení

buněčné homeostázy (Pereira *et al.*, 2009). Alkalizace růstového média pak zmírňuje účinek kyselosti na růst bakterií. Některé kmeny bakterií mohou mít navíc geny pro alternativní dráhy tvorby putrescinu (Romano *et al.*, 2014). V průběhu dekarboxylace dochází ke spotřebování intracelulárních H^+ (Kanjee *et al.*, 2011) a vzniklé BA např. tyramin jsou transportovány antiport systémem (TyrP) do vnějšího prostředí výměnou za substrát např. tyrozin (Marcobal *et al.*, 2012).

Tyrozindekarboxylační dráha je přítomna pouze u některých bakterií a je považována spíše za kmenově než druhově specifickou (Buňková *et al.*, 2009). Podle Marcobal *et al.* (2006) byly tyrozindekarboxylázy identifikovány u grampozitivních bakterií, a to zejména u bakterií mléčného kvašení, včetně enterokoků. Enterokoky jsou typické tím, že mají schopnost přežít výkyvy pH (Franz *et al.*, 2011; Marcobal *et al.*, 2012). Akumulace nadměrného množství tyraminu ve fermentovaných potravinách je připisována právě enterokokům (Suzzi a Gardini 2003; Foulquie Moreno *et al.*, 2006; Komprda *et al.*, 2008a,b). Přítomnost genu kódujícího tyrozindekarboxylázu byla prokázána u druhů *Enterococcus faecalis*, *E. faecium* (Ladero *et al.*, 2012), *E. durans* (Linares *et al.*, 2009) i *E. mundtii* (Gatto *et al.*, 2016). Jejich tyrozindekarboxylázy mají k tyrozinu jako substrátu vysokou afinitu (Ladero *et al.*, 2012). Bargossi *et al.* (2015b) u *E. faecalis* a *E. faecium* popisují zvýšenou expresi genu pro tyrozindekarboxylázu v počátku exponenciální fáze růstu. Toto maximum nekoresponduje s maximálním množstvím namnožených buněk v daném substrátu. Je tedy jasné, že produkce tyrozindekarboxylázy není odpovědí na nedostatek živin a strádání typické pro stacionární fázi. To je jeden z důkazů, že tyrozindekarboxylační dráha není v kompetici s dalšími energetickými metabolickými drahami (Pessione *et al.*, 2009).

Navíc bylo v nedávné době zjištěno, že bakteriální tyrozindekarboxylázy jsou schopné také dekarboxylace fenylalaninu (za tvorby fenyletylaminu) a dalších aminokyselin, což naznačuje společný fylogenetický původ tyrozindekarboxyláz z jednoho genu nebo skupiny genů (Newton, 2007). Pessione *et al.* (2009) proteomickou studií prokázali přítomnost membránově vázané tyrozindekarboxylázy u *E. faecium* dekarboxylující také fenylalanin, ovšem pouze se stupněm konverze 10 %. Je však zajímavé, že tato dekarboxylační aktivita vůči fenylalaninu nebyla prokázána u *E. faecalis*.

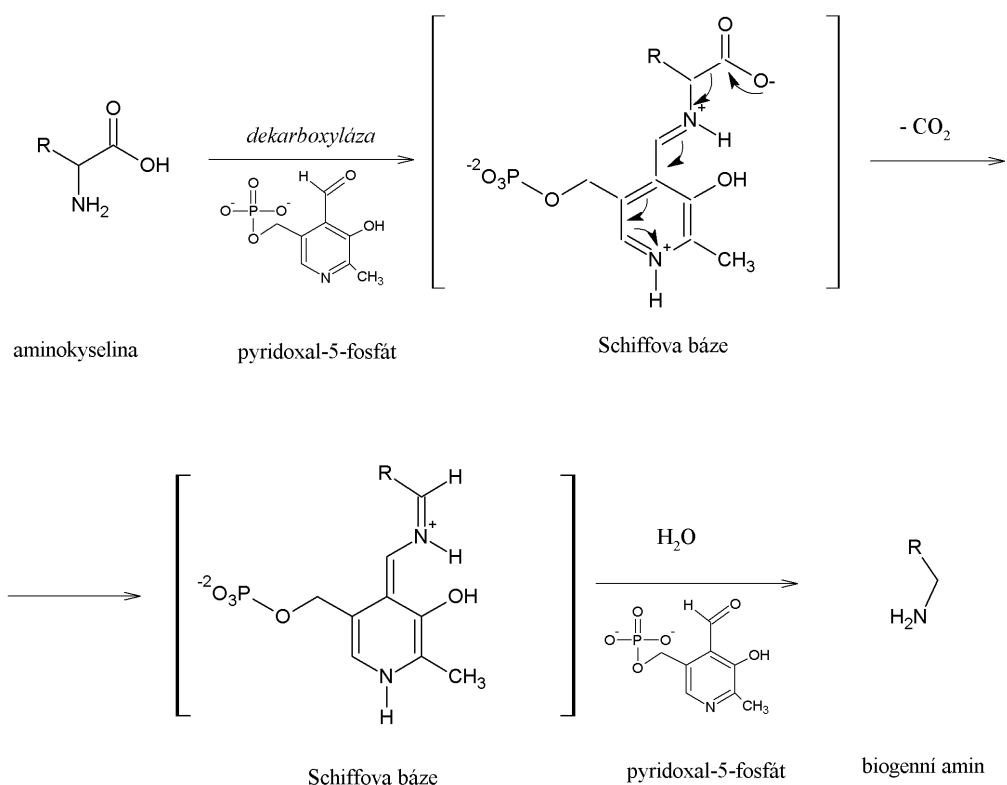
Tvorba histaminu v potravinách vyžaduje přítomnost histidindekarboxyláza pozitivních mikroorganismů, je však i závislá na kultivačních podmínkách a zpravidla není rodově a ani druhově podmíněna. Mezi mikroorganismy produkující histamin patří řada bakterií izolovaných z různých potravinářských výrobků. Mezi gramnegativní bakterie tvořící histamin se řadí *Enterobacter aerogenes*, *Hafnia alvei*, *Klebsiella pneumoniae*, *Morganella morganii*, *Plesiomonas shigelloides*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Aeromonas hydrophila*, *Shewanella putrefaciens*, *Acinetobacter lwoffii*, *Vibrio* sp. aj. Tyto

bakterie tvoří i polyaminy (Landete *et al.*, 2007; Juneja a Sofos, 2010; Linares *et al.*, 2011; Romano *et al.*, 2014).

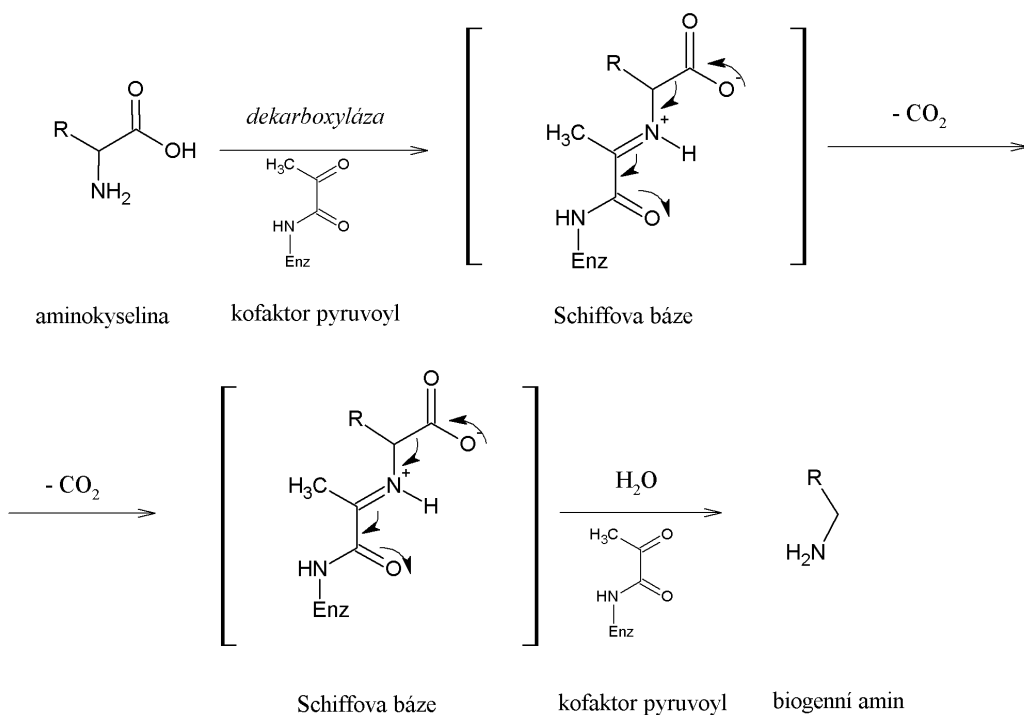
Jak již bylo zmíněno, na dekarboxylaci aminokyselin a tvorbě BA se podílejí hlavně exogenní enzymy, které jsou uvolněny dekarboxyláza pozitivními mikroorganismy (Fedda *et al.*, 2001; Özogul a Özogul, 2007). Jedná se především o četné druhy hnilobných bakterií (např. klostridia a pseudomonády), ale také o řadu druhů bakterií mléčného kvašení (např. laktobacily) a bifidobakterie (Smělá *et al.*, 2004; Kohajdová *et al.*, 2008; Goodfellow *et al.*, 2011; Pokusa *et al.*, 2011).

Syntéza BA je u bakterií spojena s energetickým metabolismem a napomáhá chránit buňky vůči stresu z kyselého prostředí (Konings *et al.*, 1997; Foster, 2004). Bakteriální dekarboxylázy vykazují zvýšenou aktivitu vůči L – formám základních alifatických aminokyselin (L–lyzinu, L–argininu a L–ornitinu) (Kohajdová *et al.*, 2008). Dekarboxylázy aminokyselin spotřebovávají intracelulární protony prostřednictvím specifického antiportového systému. Důležitým aspektem pro funkci a regulaci různých dekarboxyláz je oligomerizace. K reakci dochází, když buňky mají nepříznivé podmínky pro růst (nedostatek živin a stresové podmínky růstu) a dochází k významným změnám fyziologie, včetně indukce genů, odpovědi na stres a k biosyntéze aminokyselin (Kanjee *et al.*, 2011).

Při tvorbě BA dekarboxylací aminokyselin byly identifikovány dva specifické mechanismy. První mechanismus probíhá za účasti pyridoxal–5–fosfátu, který je považován za součást enzymu dekarboxylázy – jako kofaktor (Obr. 6). Pokud se pyridoxal–5–fosfát vyskytuje ve sledované potravíně, dochází s vysokou pravděpodobností k produkci BA (Marcobal *et al.*, 2006). Tyto reakce jsou rovnovážné a jsou katalyzované aminotransferázami. Aktivní místo dekarboxylačního enzymu je tvořeno pyridoxal–5–fosfátem, kdy konkrétně aldehydová skupina pyridoxal–5–fosfátu (kofaktoru) reaguje s aminokyselinami za vzniku meziproductů (Schiffovy báze). Tyto jsou poté dekarboxylovány, přičemž jsou získány odpovídající aminy (Obr. 6). Druhý mechanismus zahrnuje pyruvoylový zbytek místo pyridoxal–5–fosfátu. Pyruvoylová skupina je kovalentně vázána na aminoskupinu enzymu a funguje při dekarboxylaci podobným způsobem jako pyridoxal–5–fosfát (Obr. 7) (Juneja *et al.*, 2010).



Obr. 6. Dekarboxylace *L*-aminokyselin za účasti pyridoxal-5-fosfátu u bakterií (upraveno podle Kohajdová et al. 2008).



Obr. 7. Dekarboxylace pomocí pyruvoylové skupiny (upraveno podle Juneja a Sofos, 2010).

Hlavní faktory ovlivňující kinetiku dekarboxylačních reakcí (tj. množství enzymu a substrátu, aktivita enzymu, teplota, pH, přítomnost inhibitorů) mají

velký význam. Pochopení významu faktorů ovlivňujících rychlosti enzymově katalyzovaných reakcí je významné například pro toxikologii. Rostoucí teplota zvyšuje rychlost dekarboxylázami katalyzovaných reakcí jen v přesně vymezeném rozsahu. Optimální teploty většiny enzymů mají hodnoty stejné nebo o málo větší než je optimální teplota růstu. Rychlost reakce ovlivňuje i pH. Při limitním pH již může docházet k denaturaci enzymů, anebo ke změnám nabitého stavu slabě kyselých nebo bazických skupin aminokyselin (prekurzorů BA) (Murray, 2002).

1.5 Výskyt a význam biogenních aminů v potravinách

BA jsou přírodní antinutriční činitelé (např. inhibitory enzymů), podílející se na otravách potravinami (Shalaby, 1996). Výskyt BA lze předpokládat prakticky ve všech potravinách, které obsahují proteiny či volné aminokyseliny a umožňují mikrobiální a biochemickou činnost (Santos, 1996). Nadlimitní tvorba BA v potravinách je podporována přítomností mikroorganismů produkujících v hojné míře dekarboxylázy (Halász *et al.*, 1994).

BA jsou přítomny v široké škále potravinářských produktů, včetně rybích výrobků, masných výrobků, mléčných výrobků, vína, piva, zeleniny, ovoce, ořechů a čokolády. Produkci BA v potravinách mimo jiné ovlivňují technologické procesy výroby, např. inhibiční a akcelerační faktory ovlivňující mikroflóru (pH, teplota, koncentrace NaCl, přístup kyslíku a další) (ten Brink *et al.*, 1990).

BA mohou být označeny jako indikátory kvality a čerstvosti potravin. Například putrescin a kadaverin jsou považovány za indikátory čerstvosti ryb. Tyto BA jsou indikátory začínajícího rozkladu říčních a mořských produktů (Lakshmanan *et al.*, 2002; Kuley *et al.*, 2012).

Juneja a Sofos (2010) uvádějí, že koncentrace BA se zvyšuje v průběhu skladování potravin v důsledku mikrobiální metabolické aktivity. K tvorbě těchto sloučenin značnou měrou přispívá kulturní, u fermentovaných potravin záměrně využívaná, ale i kontaminující mikroflóra.

Ve fermentovaných potravinách mohou být za původce BA a polyaminů označeny spíše nonstartérové mikroorganismy, zástupci rodů *Enterococcus* (*Enterococcus faecium*), *Lactobacillus* a *Staphylococcus* (*S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. hominis*, *S. warneri*). *Staphylococcus carnosus* a *S. xylosus* mohou být součástí startérových kultur pro výrobu fermentovaných masných výrobků (Gardini *et al.*, 2001; Bover-Cid *et al.*, 2001,2008; Suzzi a Gardini, 2003; Landete *et al.*, 2007). Konečná koncentrace BA může být ovlivněna dobou fermentace a skladování, kdy je dán prostor k množení a dekarboxylázové aktivitě mikroorganismů.

V nefermentovaných potravinách je výskyt BA spojen s nežádoucím rozkladem bílkovin. V některých publikacích jsou popsány korelace mezi tvorbou BA a snížením obsahu volných aminokyselin; aminokyseliny však mohou být proteosyntézou inkorporovány do proteinů. Volné aminokyseliny jsou obecně přítomné ve tkáních a jejich množství se může zvyšovat *post mortem* (Wendakoon *et al.*, 1990). Autolytické změny, zejména v mase (svalovině), hrají důležitou roli při uvolňování aminokyselin do svalové tkáně, což umožňuje snadnější pronikání bakterií a způsobuje příznivé podmínky pro činnost příslušných dekarboxyláz (ten Brink *et al.*, 1990).

Implementace a dodržování systému analýzy nebezpečí a stanovení kritických kontrolních bodů (HACCP), kvůli zamezení kontaminace potravin technologicky nežádoucími či potenciálně patogenními nebo patogenními mikroorganismy, hraje významnou úlohu při předcházení produkce BA těmito kontaminanty (ten Brink *et al.*, 1990; Hernández–Jover *et al.*, 1996).

Studované rody v této dizertační práci, *Enterococcus* a *Staphylococcus*, jsou široce rozšířeny v prostředí a především v potravinách. V následujících kapitolách bude popsán nejen výskyt biogenních aminů v potravinách, ale také vztahy mezi zmíněnými mikrobiálními rody.

1.5.1 Nefermentované potraviny

Ovocné šťávy, nektary a limonády vyrobené z pomerančů, malin, citronů, grapefruitů, mandarinek, jahod, rybízu a hroznů obsahují různé BA, převážně putrescin (Dabrowski *et al.*, 2005). Halász *et al.* (1994) uvádějí vysokou hladinu aminů ($\sum BA \geq 600 \text{ mg.kg}^{-1}$) přirozeně se vyskytujících v pomerančové šťávě (noradrenalin a tryptamin), v rajčeti (tyramin, tryptamin a histamin), v banánech (tyramin, noradrenalin, tryptamin a serotonin), ve švestkách (tyramin a noradrenalin) a v listovém špenátě (histamin). Fenyletylamin je mimo jiné také přirozenou součástí kakaových bobů, vyskytuje se v čokoládě, čokoládových výrobcích a cukrovinkách obsahujících čokoládu. Důvodem výskytu fenyletylaminu v čokoládě je nejen jeho přítomnost v čerstvých kakaových bobech, ale také díky fermentaci, ke které dochází během zpracování kakaových bobů. Histamin a tyramin jsou zastoupeny ve větších koncentracích v kakaových bobech než putrescin, spermidin a spermin. Kadaverin, serotonin a fenyletylamin jsou přítomny ojedinele, a to ve velmi nízkých koncentracích. Tvorba biogenních aminů ve fermentovaných kakaových bobech je ovlivněna především bakteriemi rodů *Gluconobacter* a *Acetobacter*, jejichž koncentrace může být až 10^6 CFU.g^{-1} (Restuccia *et al.*, 2015). Dále některé druhy volně rostoucích jedlých hub čeledi *Boletaceae* obsahují také vysoké hladiny fenyletylaminu ($< 500 \text{ mg.kg}^{-1}$) (Dadáková *et al.*, 2009).

Čerstvé maso obsahuje velmi málo mikroorganismů. Do svaloviny však časem pronikají hlavně aerobní mikroorganismy, v menší míře anaerobní. V mase se můžou vyskytovat bakterie rodů *Yersinia*, *Clostridium*, *Salmonella*,

Staphylococcus (Alves *et al.*, 2016; Duan *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2016). Mezi nejčastěji se vyskytující BA v syrovém masu patří histamin, kadaverin, putrescin a tyramin. Vysoký obsah polyaminů sperminu a spermidinu byl popsán v drůbežích, vepřových a hovězích játrech, která jsou vybavena detoxikačním mechanismem odbourávajícím BA v mitochondriích (Krausová *et al.*, 2006). Čerstvé i opracované vepřové maso obsahuje vysoké hladiny adrenalinu, spermidinu a sperminu, ale nízké hladiny noradrenalinu, putrescinu, histaminu, kadaverinu a tyraminu (Nadon *et al.*, 2001). Při skladování masa dochází vlivem enzymové aktivity přítomné mikroflóry ke zvyšování obsahu BA (Ntzimani *et al.*, 2008). Vysoké hodnoty BA byly stanoveny nejen v syrovém hovězím a vepřovém masu, ale i v tepelně opracovaném masu (Dabrowski *et al.*, 2005). Hodnoty BA v masu uchovávaném při teplotách nad 8 °C dosahují u tyraminu $\leq 250 \text{ mg.kg}^{-1}$, kadaverinu $\leq 340 \text{ mg.kg}^{-1}$ a putrescinu $\leq 80 \text{ mg.kg}^{-1}$ (Suzzi a Gardini, 2003).

K nefermentovaným potravinám s vyššími koncentracemi BA patří mořské produkty. V čerstvém rybím masu je sice obsah BA zanedbatelný, avšak obsahuje vysoké hodnoty histidinu (prekurzor tvorby histaminu). Tvorba histaminu v mořských produktech je ovlivněna spíše mikrobiální činností než endogenní aktivitou histidindekarboxylázy (Halász *et al.*, 1994; Dabrowski *et al.*, 2005). Histidin je mikroorganismy metabolizován deaminací na kyselinu urokanovou nebo dekarboxylací za vzniku histaminu. Nejvýznamnějšími producenty histaminu jsou zástupci čeledi *Enterobacteriaceae*, včetně rodu *Proteus* (Kimata, 1961), druhů *Klebsiella pneumoniae* (Lerke *et al.*, 1978), *Hafnia alvei* (Ferencík, 1970; Taylor a Speckhard, 1983) nebo psychrotrofní bakterií této čeledi (Furutani *et al.*, 2013; Tahmouzi *et al.*, 2013), dále potom např. *Staphylococcus capitis*. Studie mikrobiálního osídlení produktů rybolovu poukazuje na produkci velkého množství histaminu a následných otrav i za nízkých chladírenských teplot (Dabrowski *et al.*, 2005).

Obsah BA výrazně roste s délkou skladování masa, jež je spojena s jeho kažením (Shalaby, 1996). Vysoké koncentrace BA mohou při posuzování kvality potravin signalizovat potraviny v pokročilém stupni rozkladu (Juneja a Sofos, 2010). Avšak přítomnost BA v potravinách nemusí být v přímém vztahu s vysokým počtem bakterií, stářím potraviny nebo jakostí potravin (Santos, 1996). Hladina histaminu, putrescinu a kadaverinu je obvykle zvyšována během kažení ryb a mořských produktů, zatímco množství sperminu a spermidinu během tohoto procesu klesá (ten Brink *et al.*, 1990). U pstruha duhového byl detekován kadaverin, putrescin, spermin a spermidin ve vyšších hodnotách, a to v závislosti na době skladování s měnící se teplotou. U ryb čeledi *Scombridae* (makrelovití) a *Clupeidae* (sled'ovití) byly stanoveny různé biogenní aminy (histamin, putrescin, kadaverin, tyramin, spermin, spermidin) (Yatsunami a Echigo 1993; Shalaby, 1996).

Mikroorganizmy v mléce patří mezi další rizikovou skupinu produkující BA. Mikroflóra mléka se skládá převážně ze zástupců rodu *Staphylococcus* a *Streptococcus*, ale obsahuje také bakterie mléčného kvašení se zástupci enterokoků (Reviriego *et al.*, 2005; Jiménez *et al.*, 2008). Enterokoky jsou brzy po narození nedílnou součástí gastrointestinálního traktu savců. Mléko představuje jeden z prvních zdrojů příjmu bakterií rodu *Enterococcus* v lidské populaci. Některé kmeny jsou používány jako probiotika (Bhardwaj *et al.*, 2010) a při výrobě fermentovaných mléčných výrobků. Enterokoky se vyskytují v másle, zmrzlinách, smetaně, jogurtech, v čerstvém, pasterizovaném i sušeném mléce. Avšak nesmí být opomenuto, že enterokoky jsou oportunní patogeny, které mohou způsobit celou řadu infekcí (Manson *et al.*, 2003; Pomba *et al.*, 2010; Zou a Shankar, 2016).

1.5.2 Fermentované potraviny

Při přípravě fermentovaných potravin lze očekávat výskyt mnoha druhů mikroorganismů, z nichž některé jsou schopny produkovat BA (Tab. 1). Mezi fermentované potraviny patří fermentované masné a rybí výrobky, sýry, fermentovaná zelenina, pivo a víno (Santos, 1996). Na začátku fermentace se vyskytuje zejména kadaverin a histamin, na konci spíše putrescin a tyramin. Ve finálním výrobku může být také přítomen tryptamin, fenyletylamin, spermidin a spermin. Daná skutečnost může být vysvětlena tím, že v případě fermentace mají přítomné mikroorganizmy dostatek času metabolizovat či produkovat více substancí (Kohajdová *et al.*, 2008; Buňková *et al.*, 2010).

Fermentace je ovlivněna zástupci bakteriálních rodů *Brevibacterium*, *Enterococcus*, *Kocuria*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Staphylococcus* nebo *Streptococcus*, kvasinkami *Torulopsis*, *Kluyveromyces* a *Candida* nebo také plísněmi (např. *Botrytis*, *Penicillium*, *Stachybotrys*), případně dalšími mikroorganizmy (Halász *et al.*, 1994; Chittipurna *et al.*, 2011).

Typickými představiteli dekarboxyláza pozitivní mikroflóry, kteří mohou kontaminovat výrobu fermentovaných produktů, jsou zástupci čeledi *Enterobacteriaceae* (Halász *et al.*, 1994). U izolátů rodů *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Serratia* získaných z fermentovaných klobás byla zjištěna produkce polyaminů kadaverinu a putrescinu (Bover-Cid *et al.*, 2003). U enterobakterií izolovaných (*Hafnia*, *Serratia*, *Escherichia*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Pantoea*) z masa, fermentovaných masných výrobků a sýrů byla detekována hojná produkce polyaminů. Kromě putrescinu a kadaverinu byl v růstovém prostředí detekován i histamin a tyramin v množstvích 10–100 mg.l⁻¹ (Pircher *et al.*, 2007). BA mohou také tvořit mikroorganizmy zodpovědné za duření sýrů (rod *Clostridium*).

Tab. 1. Mikroorganizmy produkující biogenní aminy.

| Potravina | Biogenní aminy | Producenti biogenních amnů | Reference |
|-----------|----------------|--|--|
| Ryby | Histamin | <i>Morganella morganii</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Hafnia alvei</i> , <i>Proteus vulgaris</i> , <i>Proteus mirabilis</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Enterobacter aerogenes</i> , <i>Serratia fonticola</i> , <i>Serratia liquefaciens</i> , <i>Citrobacter freundii</i> , <i>Pseudomonas fluorescens</i> , <i>Pseudomonas putida</i> , <i>Aeromonas sp.</i> , <i>Plesiomonas shigelloides</i> , <i>Photobacterium sp.</i> , <i>Clostridium sp.</i> | Rehbein <i>et al.</i> , 2009; Deabas <i>et al.</i> , 2013; Hu <i>et al.</i> , 2014 |
| Sýry | Histamin | <i>Lactobacillus buchneri</i> | Marino <i>et al.</i> , 2000; Linares <i>et al.</i> , 2009; |
| | Tyramin | <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Enterococcus faecium</i> , <i>Enterococcus durans</i> , <i>Enterococcus hirae</i> , <i>Lactobacillus brevis</i> , <i>Lactobacillus curvatus</i> | Nout, 1994 |
| | Putrescin | <i>Enterobacteriaceae</i> (<i>Enterobacter</i> , <i>Serratia</i> , <i>Escherichia</i> , <i>Salmonella</i> , <i>Hafnia</i> , <i>Citrobacter</i> , <i>Klebsiella</i>) <i>Lactobacillus brevis</i> | Chaves–López <i>et al.</i> , 2006; Lucas <i>et al.</i> , 2007 |
| Vino | Kadaverin | <i>Enterobacteriaceae</i> | Lucas <i>et al.</i> , 2005; Moreno <i>et al.</i> , 2008 |
| | Histamin | <i>Oenococcus oeni</i> , <i>Lactobacillus hilgardii</i> , <i>Pediococcus parvulus</i> | |
| | Tyramin | <i>Lactobacillus brevis</i> , <i>Lactobacillus hilgardii</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Enterococcus faecium</i> | Lucas <i>et al.</i> , 2007 |
| | Putrescin | <i>Lactobacillus brevis</i> , <i>Lactobacillus hilgardii</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Lactobacillus buchneri</i> , <i>Lactobacillus zaeae</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides</i> , <i>Oenococcus oeni</i> | Lucas <i>et al.</i> , 2007; Ancín-Azpilicueta <i>et al.</i> , 2008 |
| Maso | Histamin | <i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Staphylococcus capitis</i> | Shiling <i>et al.</i> , 2016 |
| | Tyramin | <i>Staphylococcus carnosus</i> , <i>Staphylococcus xylosus</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Staphylococcus saprophyticus</i> , <i>Lactobacillus curvatus</i> , <i>Lactobacillus sakei</i> , <i>Lactobacillus bavaricus</i> , <i>Lactobacillus brevis</i> , <i>Carnobacterium divergens</i> , <i>Carnobacterium piscicola</i> | |
| | Putrescin | <i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Morganella morganii</i> , <i>Serratia liquefaciens</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Lactobacillus curvatus</i> , <i>Enterococcus sp.</i> | Xie <i>et al.</i> , 2016 |
| | Kadaverin | <i>Enterobacteriaceae</i> | |

Zástupci rodu *Enterococcus* jsou významnými producenty BA (AGM – agmatin, CAD – kadaverin, HIS – histamin, PHE – fenyletylamin, PUT – putrescin, SPD – spermidin, SPM – spermin, TYM – tyramin) v různých potravinách (Tab. 2). Dostupná literatura nepopisuje tvorbu tryptaminu (TRP) u enterokoků. Standarová *et al.* (2009) sledovali dekarboxylázovou aktivitu

Enterococcus faecalis, *E. faecium*, *E. durans*, *E. hirae*, *E. malodoratus*, *E. casseliflavus*, *E. avium*, *E. gallinarum* a *E. mundtii*. Do dekarboxylačního média byl přidán pyridoxal-5-fosfát. Produkce histaminu nebyla prokázána u žádného z testovaných kmenů. *E. faecalis* a *E. faecium* jsou této studii označeny za největší producenty tyraminu (1485–2363 mg.l⁻¹). V práci je také jako významný producent tyraminu uveden *E. casseliflavus* (≤ 2016 mg.l⁻¹), což je při srovnání s prací Rea *et al.* (2004), kteří uvádějí, že kmen tohoto druhu (izolát ze sýru čedar) je tyrozindekarboxyláza negativní, odlišný výsledek. Rea *et al.* (2004) sledovali 6 kmenů *Enterococcus faecalis*, jeden kmen *E. faecium*, *E. durans* a *E. casseliflavus*. Tyto mikroorganismy se mohou podílet na vývoji chuti a vůni sýrů čedar. Mikroorganismy byly izolovány po 48 týdnech zrání sýru při 8 °C. Všechny kmeny, kromě *E. casseliflavus*, produkovaly tyramin (<162 mg.kg⁻¹). Enterokoky jsou odpovědné za akumulaci BA (tyramin a putrescin) u kysaných mléčných výrobků. Schopnost produkovat putrescin byla proměnná u všech testovaných enterokokových druhů (*E. faecium*, *E. durans* a *E. hirae*) (Ladero *et al.*, 2010a; Perin *et al.*, 2014).

Liu *et al.* (2013) potvrdil, že *E. faecalis* patří mezi potenciální producenty BA. Kmeny byly získány z kachny divoké a jejich kultivace probíhala v MRS bujónu s prekurozory BA (aminokyselinami). Bylo zjištěno, že *E. faecalis* tvoří biogenní aminy tyramin (< 320 mg.kg⁻¹) a fenyletylamin (< 220 mg.kg⁻¹).

Kuley *et al.* (2013) zmiňují možnosti snižování množství vyprodukovaných BA u *E. faecalis* za pomoci současné kultivace s bakteriemi mléčného kvašení (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *L. lactis* subsp. *cremoris*, *Lactobacillus plantarum*, *Streptococcus thermophilus*). Především *Lactobacillus plantarum* byl schopen snížit, při současné kultivaci s *E. faecalis*, celkové množství sledovaných BA (PUT, CAD, HIS, SPD, TRP, PHE, SPM, serotoninu a TYR) v některých případech dokonce o více jak 50 %. Při správné kombinaci enterokoků a laktobacilů lze tedy významně snížit množství vyprodukovaných BA.

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

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

Tab. 2. pokračování – detekovaná produkce biogenních aminů nebo výskyt genů pro dekarboxylázy u bakterií rodu *Enterococcus*.

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

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

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

Enterococcus faecium jako charakteristický dekarboxyláza pozitivní druh v červeném víně popisuje Capozzi *et al.* (2011). Schopnost tvorby tyraminu u *E. faecium* ($\leq 85 \text{ mg.kg}^{-1}$) byla sledována pomocí RP–HPLC/UV. Produkce histaminu a putrescinu nebyla u sledovaných kmenů detekována.

Izoláty *Enterococcus durans* izolované z tradičního fermentovaného mléčného výrobku v oblasti Tibetu produkovaly spermin a spermidin ($\leq 8,6 \text{ mg.l}^{-1}$), tyramin ($\leq 912,0 \text{ mg.l}^{-1}$) a histamin ($\leq 10,6 \text{ mg.l}^{-1}$) (Li *et al.*, 2011).

Zástupci druhů *E. faecalis*, *E. durans*, *E. faecium* a blíže neurčené *Enterococcus* sp. byli předmětem studie Ladero *et al.* (2010b). Jejich závěry poukazují na přítomnost enterokoků v sýrech (tvrdé, polotvrdé, s plísní v těstě a sýrů ze syrového mléka) a jejich odpovědnost za akumulaci tyraminu ($\leq 382,6 \text{ mg.kg}^{-1}$) v těchto potravinách. Dále je v práci zmíněn účinek pasterizace, která je jedním z hlavních technologických faktorů, které pozitivně ovlivňují množství tyraminu v sýrech (pokles o více než 50 %). Ladero *et al.* (2011) v další studii sledovali právě vliv pasterizace na přežití dekarboxyláza pozitivních *E. durans*, *E. faecalis* a *Lactobacillus brevis*. Testované kmeny výše uvedených druhů vykazovaly odolnost vůči pasteračním zákrokům. Jejich přítomnost v procesu výroby by mohla mít negativní dopad na konečná množství BA v mléčných výrobcích.

Zástupci enterokoků *E. faecium* a *Enterococcus* sp. izolovaní z fermentovaného masa neprokazovali ve studii Belgacem *et al.* (2010) dekarboxylázovou aktivitu (lyzin–, ornitin–, histidin– a tyrozin–dekarboxylázovou aktivitu). Tato studie dále polemizuje o biotechnologickém využití a bezpečnosti kmenů rodu *Enterococcus* v potravinářském průmyslu (Belgacem *et al.*, 2010). Podobným tématem, tedy bezpečností využití enterokoků v technologii výroby masných výrobků, se zabývali již dříve Ruiz–Moyano *et al.* (2009). Sledované kmeny *E. durans*, *E. faecium* a *E. hirae* vykazovaly vysokou schopnost produkce BA ($\geq 750 \text{ mg.l}^{-1}$). Deset z patnácti sledovaných kmenů, produkovalo TYM ($\leq 958 \text{ mg.l}^{-1}$). Několik kmenů *E. faecium* je v publikaci označeno za producenty tryptaminu.

Mezi významné producenty BA (CAD, HIS, PHE, PUT, SPD, SPM, TYM) v různých potravinách patří i zástupci rodu *Staphylococcus* (Tab. 3). Produkci TRP uvádí pouze studie Even *et al.* (2010).

Staphylococcus epidermidis je schopný produkovat histamin, kadaverin a putrescin v kultivačním médiu i v hroznovém moštu, ovšem ve víně nikoli (Benavent–Gil *et al.*, 2016). Landeta *et al.* (2013) sledovali dekarboxylázovou aktivitu u koaguláza negativních stafylokoků (*S. capitis*, *S. carnosus*, *S. caprae*, *S. epidermidis*, *S. equorum*, *S. vitulinus* (*S. pulvereri*), *S. xylosus* a *S. lugdunensis*). Bakterie byly izolovány z fermentovaných salámů za účelem jejich využití jako startérových kultur. Ze všech sledovaných kmenů rodu *Staphylococcus* bylo 25 % kmenů dekarboxyláza pozitivních. *S. carnosus* byl dle výsledků studie schopen tvořit tyramin. Kmen *S. capitis* byl pozitivní na tvorbu histaminu, a to metodou PCR (detekce *hdc* genu) i TLC (detekce histaminu). *S. lugdunensis* a *S. epidermidis* tvořili putrescin a kadaverin.

Tab. 3. Detekovaná produkce biogenních aminů nebo genů pro dekarboxylázy u bakterií rodu *Staphylococcus*.

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

Tab. 3. pokračování – producenti biogenních aminů rodu *Staphylococcus*.

| Producenti a jejich zdroje výskytu* | Detekované biogenní aminy**; geny pro enzymy | Reference |
|--|--|--|
| <i>S. epidermidis</i> , <i>S. equorum</i> , <i>S. saprophyticus</i> – fermentované potraviny | PHE | Even <i>et al.</i> , 2010 |
| <i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i> , <i>S. saprophyticus</i> , <i>S. pasteurii</i> , <i>S. sciuri</i> , <i>S. warneri</i> , <i>S. xylosus</i> | histidin/tyrozin/lyzin/ornitindekarboxyláza | Marino <i>et al.</i> , 2011 |
| <i>S. xylosus</i> , (<i>Lactobacillus sakei</i>) – fermentované klobásy | TYM, PUT | Latorre-Moratella <i>et al.</i> , 2010 |
| <i>S. carnosus</i> – salám paprikáš | TYM, PUT, | Komprda <i>et al.</i> , 2009 |
| <i>S. xylosus</i> – fermentované ančovičky | histidin/tyrozindekarboxyláza | Mah <i>et al.</i> , 2009 |
| <i>S. capitis</i> | histidinekarboxyláza | Landete <i>et al.</i> , 2007 |
| <i>S. carnosus</i> , <i>S. xylosus</i> , (<i>Lactobacillus a</i> <i>Pediococcus</i>) – klobásy | PUT, CAD, HIS, TYM, SPM | Genccelep <i>et al.</i> , 2007 |
| <i>S. xylosus</i> , <i>S. carnosus</i> | TYM, PHE | Simonová <i>et al.</i> , 2006 |

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

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

U kmenů *S. equorum*, *S. caprae*, *S. hominis*, *S. vitulinus*, *S. xylosus* a *S. warneri* nebyly detekovány ani geny pro dekarboxylázy, ani sledované BA (histaminu, tyraminu, putrescinu a kadaverinu) (Landete *et al.*, 2007).

Produkce BA u kmenů *S. pasteurii* a *S. sciuri* izolovaných z klobás z masa tuňáka je popsána ve studii Kung *et al.* (2012). Sledovali zde produkci devíti BA (putrescinu, kadaverinu, tryptaminu, fenyletylaminu, spermidinu, sperminu, histaminu, tyraminu a agmatinu) metodou HPLC/UV. Žádný ze sledovaných vzorků uzenin neobsahoval tryptamin, fenyletylamin a tyramin. Průměrný obsah každého ze zbývajících šesti BA byl velmi nízký ($\leq 0,2 \text{ mg.kg}^{-1}$). Hladiny histaminu u všech vzorků byly do $0,2 \text{ mg.kg}^{-1}$. Pět sledovaných kmenů *S. pasteurii* (40 % izolátů) bylo identifikováno jako histidin-dekarboxyláza pozitivní s vysokou tvorbou histaminu u dvou kmenů ($\leq 945 \text{ mg.kg}^{-1}$), ostatní kmene tvořily histamin v nižších koncentracích ($\leq 57 \text{ mg.kg}^{-1}$). *S. epidermidis* a *S. capitis* (izoláty ze slaných španělských sardinek) produkovaly více než 1000 a 400 mg.kg^{-1} histaminu. Podobně tomu bylo i u kmene *S. pasteurii* ($\leq 945 \text{ mg.kg}^{-1}$) (Kung *et al.*, 2012).

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

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

Even *et al.* (2010) se ve studii zabývali rovněž produkcí BA u koaguláza negativních stafylokoků izolovaných z fermentovaných potravin (fermentovaný salám a sýr). Práce posuzuje využití některých koaguláza negativních stafylokoků při výrobě fermentovaných masných i mléčných výrobků. Tvorba BA byla sledována při 30 °C, po dobu 24 h až 48 h a za přídavku

pyridoxal-5-fosfátu ($2,5 \text{ g.l}^{-1}$). Dále byly jako prekurzory přidány aminokyseliny ($2,5 \text{ g.l}^{-1}$) histidin, ornitin, lyzin, fenylalanin, tryptofan a tyrozin. U *S. equorum* a *S. epidermidis*, byla stanovena tvorba BA (putrescinu $\leq 1500,0 \text{ mg.l}^{-1}$; kadaverinu $\leq 140,0 \text{ mg.l}^{-1}$; fenyletylaminu $\leq 116,0 \text{ mg.l}^{-1}$; tryptaminu $\leq 23,0 \text{ mg.l}^{-1}$ a histaminu $\leq 3,0 \text{ mg.l}^{-1}$). *S. saprophyticus*, izolovaný ze sýru, produkoval putrescin, kadaverin a spermin v koncentracích $\leq 7,0 \text{ mg.l}^{-1}$. Pouze 6 % kmenů lze zařadit do skupiny dekarboxyláza pozitivních koaguláza negativních stafylokoků.

1.6 Vliv příjmu biogenních aminů z potravin na člověka

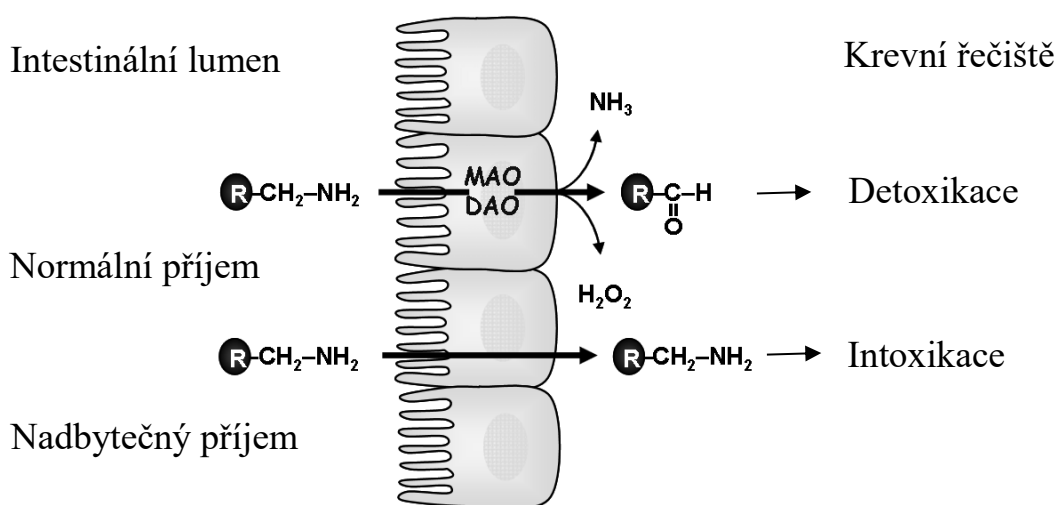
Obecně přítomnost nízkých koncentrací BA a polyaminů v potravinách nepředstavuje pro zdravé osoby závažnější problém. Vyšší koncentrace BA se vyskytují ve fermentovaných potravinách, kde vznikají činností mikroorganismů. Přítomnost nebezpečných koncentrací BA je asociována s množením dekarboxyláza pozitivních mikroorganismů ($>7 \text{ log CFU.g}^{-1}$) (Gardini *et al.*, 2016). V rybách a v mase jsou BA a polyaminy produkovány zejména kontaminující mikroflórou. K akumulaci může docházet i v rostlinných materiálech vlivem nevhodného skladování ovoce, zeleniny a hub (Halász *et al.*, 1994; Schindler *et al.*, 2015). Množství biogenních aminů lze využít jako indikátor čerstvosti potravin a tudíž k posouzení míry jejich rozkladu. Obsah BA může být ukazatelem jakosti vstupní suroviny a úrovně hygieny během výrobního procesu a skladování (Landete *et al.*, 2007). Příliš vysoké koncentrace BA a polyaminů mohou na člověka působit toxicky (600 mg/jednorázový příjem). Škodlivý vliv těchto substancí se může projevit dříve při současném příjmu psychofarmak, nebo v případě zhoršené funkce jater, kdy je porušen proces biotransformace BA (Linares *et al.*, 2012). Při nadměrném příjmu BA a polyaminů může u člověka docházet k poruchám centrálního nervového systému, poruchám krevního oběhu, bolestem hlavy, bušení srdce, zvracení a průjmů (Halász *et al.*, 1994; Santos, 1996).

Zvláště u citlivých jedinců (podle věku, zdravotního stavu, užívání farmak, konzumace alkoholu) jsou biogenní aminy po požití většího množství schopny způsobit otravu. BA mohou mít nepříznivý vliv na vznik rakoviny. Některé aminy mohou být nitrosoderiváty nebo mohou sloužit jako prekurzory pro jiné sloučeniny schopné tvořit nitrosaminy. Nitrosaminy jsou karcinogenní látky a představují potenciální riziko pro zdraví lidí a domácích zvířat (Bardot *et al.*, 1993; Halász *et al.*, 1994; Santos, 1996; Juneja a Sofos, 2010). V alkoholických nápojích, jako je pivo a víno, je za zdravotně bezpečnou koncentraci BA považováno 10 mg.l^{-1} tyraminu (Deepika a Rakshit, 2011).

Hlavní cestou detoxikace nebo biotransformace BA v lidském organismu je oxidace, v menší míře probíhá také metylace a acetylce (Taylor a Speckhard, 1983; Lehane a Olley, 2000). Malé množství BA přijaté v potravinách je

metabolizováno monoaminoxidázami, diaminoxidázami a histidinmetyltransferázami (Obr. 8) bez významných toxikologických účinků.

Příkladem přímého snižování BA v potravinách je řízená degradace BA. Použití diaminoxidáz nebo bakterií, které těmito enzymy disponují, jsou jediný možný způsob rozkladu BA (Naila *et al.*, 2010). Studie Xu *et al.* (2016) prokázala, že rekombinantní *Lactobacillus plantarum* oxiduje BA pomocí benzenediol oxidoreduktáz, patřících do skupiny enzymů obsahujících měď. Tyto enzymy tak představují nový biotechnologický potenciál pro eliminaci BA ve fermentovaných potravinách a nápojích (Callejón *et al.*, 2016).



Obr. 8. Cesta přijatých biogenních aminů v intestinálním traktu člověka. MAO – monoaminoxidáza, DAO – diaminoxidáza (upraveno podle Taylor a Speckhard, 1983; Lehane a Olley, 2000).

1.7 Faktory ovlivňující produkci biogenních aminů

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

- teplotu,
- pH,
- přístup kyslíku,
- aktivitu vody,
- přítomnost mikroorganismů jako producentů dekarboxyláz (množství a druhové zastoupení mikroorganismů),

- synergický efekt mezi mikroorganismy,
- množství a dostupnost aminokyselin a pyridoxal-5-fosfátu,
- dodržování hygienických postupů během výroby,
- čas (doba zrání).

1.7.1 Teplota

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

Ritchie a Mackie (1979) sledovali tvorbu histaminu, putrescinu, kadaverinu, sperminu a spermidinu v čerstvě ulovené makrele obecné a ve sledi obecném. Nevykuchané ryby byly ponechány při různých teplotních podmínkách – na ledu, při 1 °C, 10 °C a při pokojové teplotě (25 °C). V rybách byla zjištěna koncentrace histaminu a dalších aminů pod 10 mg.kg⁻¹ po delším skladování při teplotě 1 °C, i když ryby již vykazovaly známky hniloby. Podle očekávání byly aminy produkovány ve větších koncentracích při sledovaných vyšších teplotách. Autoři uvádějí, že histamin byl přítomen i v rybách skladovaných při teplotách pod 10 °C. Tyto výsledky jsou v souladu s novějšími studiemi (Furutani *et al.*, 2013; Tahmouzi *et al.*, 2013; Pachlová *et al.*, 2012). Tyto studie uvádějí, že produkce histaminu při 4 °C byla zanedbatelná, zatímco při teplotě skladování 10 °C se množství zvýšilo na 185 mg.kg⁻¹, a to v důsledku vyššího růstu psychrotolerantních bakterií produkujících histamin (zejména čeled' *Enterobacteriaceae*).

Velmi významnou vlastností BA je termostabilita. Výjimku představuje spermin, jehož množství klesá při tepelné úpravě masa (Juneja a Sofos, 2010). Luten *et al.* (1992) a Wendakoo a Sakaguchi (1993) uvádějí, že histamin je teplotně stabilní v průběhu procesu pečení. Vzhledem k této skutečnosti je přítomnost aminů ve vařených výrobcích úzce spojena s kvalitou použité suroviny.

Teplota v rozmezí 20 až 37 °C je optimální pro růst většiny bakterií, které obsahují dekarboxylázy. Obecně při snížení teploty dochází ke zpomalení nebo zastavení růstu bakterií (Karovičová a Kohajdová, 2005). Histidindekarboxyláza se u některých rodů čeledi *Enterococcaceae* začíná inaktivovat po 8 až 15 dnech v -20 °C. Skladování při velmi nízkých až mrazírenských teplotách je pro tvorbu BA nepříznivé (Juneja a Sofos, 2010). Nicméně putrescin byl v mase produkován psychrotrofními mikroorganismy i při teplotě 4 °C. Výsledkem je pak zvyšující se koncentrace BA během skladování (Suzzi a Gardini, 2003). U kmenů různých druhů rodu *Staphylococcus* (*S. epidermidis*, *S. equorum*, *S. pasteurii*, *S. saprophyticus*) izolovaných ze suchých fermentovaných salámů

byla prokázána dekarboxylázová aktivita i při teplotě 10 °C (Cachaldora *et al.*, 2013).

Autoři Kalhotka *et al.* (2012) popisují ve své studii kmeny enterokoků (*Enterococcus* sp., *E. faecium*, *E. mundtii*, *E. durans*) izolované z 9 vzorků kozího mléka a sýrů. V této práci byla sledována produkce BA izoláty enterokoků v závislosti na teplotě (6, 25, 30, 37 °C) desátý den kultivace. Všechny testované mikroorganismy vykazovaly významnou tyrozindekarboxylázovou a arginindekarboxylázovou aktivitu, u *Enterococcus* sp. a *Enterococcus mundtii* dokonce při všech sledovaných teplotách kultivace.

1.7.2 Hodnota pH

Hodnota pH je jedním z klíčových faktorů ovlivňujících aktivitu dekarboxyláz, a tím i tvorbu BA v potravinách. Bylo prokázáno, že tvorba aminů bakteriemi je fyziologický mechanismus vedoucí k potlačení kyselého prostředí, a proto je aktivita dekarboxyláz obvykle vyšší v kyselém prostředí s optimální aktivitou při pH mezi 4,0–5,5 (Juneja *et al.*, 2010). Tato hodnota se shoduje s optimální hodnotou pro histidindekarboxylázovou aktivitu kontaminující mikroflóry (např. *Escherichia coli*, *Pseudomonas* sp. a *Proteus* sp.). Bakterie *Klebsiella pneumoniae* izolovaná z tuňáka pruhovaného vykazovala významnou dekarboxylaci histidinu na histamin při pH 4, ale ještě při pH 6 byla aktivita 70% (Juneja *et al.*, 2010).

Snížením pH dochází ke snížení růstu mikroorganismů (např. zástupců čeledi *Streptococcaceae*, *Enterobacteriaceae*, aerobních mezofilních bakterií), kdy ale nejsou ovlivněny bakterie mléčného kvašení. Díky tomu dochází nejen k nižší produkci BA, ale tímto způsobem zvýhodněné bakterie mléčného kvašení mohou být degradéry BA, čímž dochází ke snižování obsahu BA (Santos, 1996; Suzzi a Gardini, 2001; Callejón *et al.*, 2016).

Aktuální odborné zdroje uvádí rod *Staphylococcus* jako významného producenta tyraminu a fenyletylaminu (Lauková *et al.*, 2017). Navíc kmen *S. epidermidis* izolovaný z vína produkoval histamin, putrescin a kadaverin při velmi nízkých hodnotách pH (Benavent *et al.*, 2016).

Faktory ovlivňující produkci tyraminu u *Enterococcus faecalis* a *E. faecium* popisuje Bargossi *et al.* (2015a). Sledovány byly faktory jako pH (4; 5; 6; 7), koncentrace NaCl (0; 5; 10; 15 %) a kultivační teplota (20; 30; 37 a 45 °C). Největší aktivita purifikované tyrozindekarboxylázy byla zjištěna při 20 °C a pH 4. Perez *et al.* (2015) popisují aktivaci tyrozindekarboxylázy *Enterococcus faecalis* při stresu způsobeném nízkým pH v gastrointestinálním traktu. V práci je uvedeno, že teplota má společně s pH na aktivitu tyrozindekarboxylázy pozoruhodný efekt. Byla pozorována kumulace tyraminu u *Enterococcus faecalis* již po 2 hodinách kultivace při 37 °C (200 mg.l⁻¹). Menší produkce byla zaznamenána při 20 °C a 45 °C (100 mg.l⁻¹ a 250 mg.l⁻¹). Po 24 hodinách kultivace *E. faecalis* byla nejvýraznější produkce tyraminu *in vitro* při 20 °C

(1600 mg.l⁻¹). Množství tyraminu při kultivaci nad 30 °C za 24 hodin bylo poloviční, zatímco při 45 °C byla koncentrace BA významně redukována. Zajímavé je, že po 2 hodinách inkubace *E. faecium* nebyl pozorován významný rozdíl v produkci tyraminu (Bargossi *et al.*, 2015a). Fernández *et al.* (2011) si ve své studii vybrali ke sledování dekarboxylázové aktivity enterokoků zástupce *Enterococcus durans*. Tento kmen byl izolován ze sýru a byla u něj prokázána aktivní tyrozindekarboxyláza. Na tomto kmenu byly studovány modelové „fyziologické“ podmínky. Kolektiv autorů uvedl, že při pH 5,0 a 4,1 docházelo k maximální produkci tyraminu (850,0 ± 0,2 mg.l⁻¹).

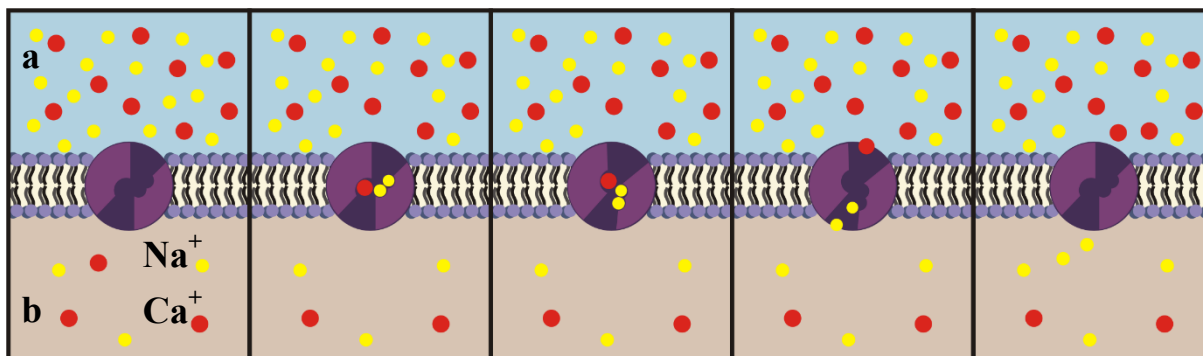
1.7.3 Aktivita vody

Vysoké koncentrace rozpuštěných látek (např. makromolekulárních látek jako jsou škrob i další polysacharidy a bílkoviny i osmoaktivních látek, jako je sacharóza a chlorid sodný) snižují množství využitelné vody. Nízká aktivita vody zpomaluje růst bakterií. Chin a Koehler (1986) dokázali, že koncentrace NaCl v rozmezí od 3,5 do 5,5 % může inhibovat tvorbu histaminu, zatímco při nižších koncentracích soli byla inhibice neúčinná. Přítomnost NaCl inhibuje histidindekarboxylázu a aktivuje tyrozindekarboxylázu (Santos, 1996; Kohajdová *et al.*, 2008).

Sušení lze rovněž považovat za zákrok, který efektivně snižuje obsah dostupné vody. Sušením fermentovaných salámů dochází ke snížení obsahu vody především na okraji salámu, kde je tento proces nejintenzivnější. Z tohoto důvodu má na produkci BA významný podíl i průměr výrobku. Čím větší je průměr fermentovaných masných výrobků, tím vyšší koncentrace BA může obsahovat (Kohajdová *et al.*, 2008). Tento vliv lze připsat snížení množství mikroorganismů v důsledku vyšších koncentrací NaCl. Chlorid sodný postupně narušuje buněčné membrány, kde se nacházejí (mikrobiální) dekarboxylační enzymy. Podobné vlivy NaCl na růst mikroorganismů a produkci BA byly zaznamenány u *Enterococcus faecalis*. Leroie *et al.* (2000) uvádí, že produkce BA byla přímo úměrná inhibici bakterií, a tedy i množství NaCl v uzeném lososovi. Ve studii Pachlová *et al.* (2011) je uvedeno, že výše zmíněný trend nemusí být v případě výroby sýrů stejný. Největší množství sledovaných BA stanovili na povrchu sýru z nízkodohřívané sýřeniny a v okrajových vrstvách sýra. Nejnižší hodnoty tyraminu, putrescinu a kadaverinu byly stanoveny ve středu sýra během celého experimentu, přičemž střed obsahuje nižší koncentrace NaCl než na povrchu sýrů.

Bevilacqua *et al.* (2010) izolovali z oliv *Enterococcus faecalis*, u kterého sledovali schopnost růstu a produkce BA při pH 4,0; 5,0; 8,0; 8,5; 9,0; 9,5; 10,0 a přidavku NaCl (2,5%; 5,0%; 7,5%; 10,0% w/v) v de Man, Rogosa a Sharpeho (MRS) bujónu. Žádný ze sledovaných kmenů izolovaných z oliv „Bella di Cerignola“ nebyl pozitivní na produkci BA (putrescinu, kadaverinu, histaminu a tyraminu), což naznačuje možnost využití tohoto kmene jako startérové kultury pro tento druh potravin. V jiné studii bylo pozorováno, že koagulóza negativní

stafylokoky (*S. saprophyticus*, *S. succinus*, *S. xylosus*) v podmínkách 18 a 21 % NaCl produkují až 300x méně tyraminu než *E. faecalis* (Jeong *et al.*, 2016). Přídavek chloridu sodného do kultivačního prostředí může být naopak pro produkci některých BA prospěšný, a to z důvodů dodání iontů Na^+ , které se podílí na regulaci intracelulárního pH (nahradí H^+). Dodání těchto iontů prokazatelně ovlivňuje tyrozindekarboxylázovou aktivitu a je významné pro antiportový systém (Obr. 9) (Gardini *et al.*, 2001; 2008; Buňková *et al.*, 2011). Molekuly se mohou pohybovat v protisměru koncentračního gradientu. Antiportový systém je tak účinný, že může zachovat buněčnou koncentraci Na^+ na úrovni 10 000 krát nižší, než je koncentrace ve vnějším prostředí.



Obr. 9. Aktivní transportní protein v buněčné membráně, který se podílí na pohybu různých iontů nebo molekul v opačném směru přes membránu. Při přechodu antiportovým systémem Na^+ svým pohybem dodá energii pro transport Ca^{2+} . Transporter mění orientaci se zřetelem na vnitřní i vnější povrch membrány. Vnější prostředí (a); prostředí buňky (b).

Gardini *et al.* (2008) sledovali přeměnu aminokyselin u kmenů *Enterococcus faecalis* a *E. faecium* v průběhu fermentace a zrání tradičního fermentovaného salámu „Salame Veronese“. Byly zde sledovány tři faktory ovlivňující fermentaci a produkci BA (tyraminu a fenyletylaminu) u enterokoků: teplota (15 – 25 °C), koncentrace NaCl (0 – 2,5 %) a množství glukózy (0 – 1,4 %). U *E. faecium* i *E. faecalis* byly pozorovány znatelné rozdíly v produkci tyraminu v závislosti na sledovaných faktorech a jejich rozsahu. Produkce tyraminu byla stanovena již po 3 dnech fermentace, nejvyšší množství tyraminu ($\leq 193,3 \text{ mg.kg}^{-1}$) bylo vyprodukováno 19. den kultivace. Fenyletylamin ($\leq 32,3 \text{ mg.kg}^{-1}$) byl nejvíce produkován v prostředí bez soli a při fermentační teplotě 25 °C. Lze tedy poznamenat, že se snižující se teplotou a zvyšujícím se množstvím NaCl se koncentrace fenyletylaminu snižovala. Teplota a přítomnost glukózy na tvorbu tyraminu mají zanedbatelný vliv především v počátečních dnech kultivace. Kolektiv autorů Sparo *et al.* (2008) publikoval podobné výsledky, především produkci histaminu a tyraminu u *E. faecalis* izolovaného z fermentovaných salámů.

1.7.4 Aerobní a anaerobní prostředí

Zásobování kyslíkem má významný vliv na biosyntézu aminů (Santos, 1996). *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). Buňková *et al.* (2011) studovali v modelových podmínkách účinky aero/anaerobiózy na růst a produkci tyraminu u rodu *Lactococcus*. Bylo zjištěno, že oproti jiným faktorům, jako je např. koncentrace NaCl, má aero/anaerobióza menší význam na dekarboxylační aktivitu grampozitivních bakterií.

Ve fermentovaných uzeninách patří mezi nejvýznamnější producenty tyraminu fakultativně anaerobní rod *Enterococcus* (Pircher *et al.*, 2007; La Gioia *et al.*, 2011; Ladero *et al.*, 2012). U nebalených klobás byl tyramin identifikován ve stopovém množství ($\leq 4 \text{ mg.kg}^{-1}$), na rozdíl od jeho množství ($\leq 220 \text{ mg.kg}^{-1}$) v prostředí s modifikovanou atmosférou, která obsahovala 30 % CO₂ a 70 % N₂, tak i u výrobků balených v 100% N₂, po 3 měsíční fermentaci (Tabanelli *et al.*, 2013). Ve fermentovaných potravinách, kdy je kyslík nahrazen produkty fermentace (NH₃ nebo CO₂), byli jako významní producenti BA (putrescinu, kadaverinu, fenyletylaminu a tyraminu) označeni zástupci rodů *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Pediococcus* a *Streptococcus* (Bover-Cid *et al.*, 2001; Gardini *et al.*, 2001; Gennaro *et al.*, 2003; Suzzi a Gardini, 2003; Landete *et al.*, 2007; Bover-Cid *et al.*, 2008).

Růst mikroorganismů je také ovlivněn rozpustností CO₂ ve vodě, čímž se dá snížit i produkce BA v nápojích. Při 101 325 Pa se ve 100 ml vody absorbuje 88 ml CO₂ při 20 °C, ale pouze 36 ml při 60 °C. Inhibice se také zvyšuje se snižujícím se pH (Guillard *et al.*, 2016).

1.7.5 Dostupnost volných aminokyselin

Koncentrace dostupných volných aminokyselin hraje zásadní roli při tvorbě aminů v potravinách. Vybrané aminokyseliny jsou totiž prekurzory aminů a navíc jsou substrátem pro růst mikroorganismů. Přítomnost bakterií s vysokou proteolytickou aktivitou stimuluje tvorbu aminů. Míra dekarboxylace aminokyselin také závisí na koncentraci produkovaného aminu, na přítomnosti dalších biogenních aminů, případně na dalších vnějších faktorech (Juneja a Sofos, 2010).

2. CÍL DISERTAČNÍ PRÁCE

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

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

3. MATERIÁL A METODY

3.1 Materiál

3.1.1 Použité bakteriální kmeny

Testované a identifikované kmeny byly získány z Ústavu fyziologie hospodářských zvířat, Slovenské akademie věd v Košicích. Kmeny laskavě poskytl MVDr. Andrea Lauková, CSc. Bakterie rodu *Enterococcus* (celkem 33 kmenů: 22 kmenů *Enterococcus faecium* a 11 kmenů *Enterococcus* sp.) byly izolovány z masa králíka (*Oryctolagus cuniculus*). Bakterie rodu *Staphylococcus* (celkem 21 kmenů) byly izolovány ze střevního obsahu pstruha potočního (*Salmo trutta*): 9 kmenů *Staphylococcus warneri*, 2 kmeny *Staphylococcus pasteurii*, 3 kmeny *Staphylococcus epidermidis*, 4 kmeny *Staphylococcus haemolyticus* a 3 kmeny *Staphylococcus hominis* (Tab. 4).

Tab. 4. Seznam testovaných kmenů na produkci biogenních aminů.

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

N^a Počet testovaných kmenů. **Tučně** označené kmeny byly použity v Experimentu II.

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

3.1.2 Kultivační podmínky

Bakterie rodu *Enterococcus* byly kultivovány v M17 bujónu (M17; HiMedia, Bombai, Indie) a kmeny rodu *Staphylococcus* v mozkosrdcové infuzi (BHI; Brain Heart Infusion Broth; HiMedia, Bombai, Indie). Na BHI agaru byla sledována čistota kmenů, dále probíhala kultivace v dekarboxylačním médiu obohaceném 0,2 % (w/v) každé aminokyseliny (arginin, ornitin, histidin, tyrozin, lyzin). U všech kmenů byla před kultivací v dekarboxylačním médiu

kontrolována čistota formou křížového roztěru a mikroskopického ověření (Gramovo barvení).

Ještě před vlastní analýzou v Experimentu II byly provedeny experimenty, ve kterých byly zjišťovány podmínky růstu testovaných kmenů bakterií (rozsah teplot, pH, koncentrace NaCl, apod.).

Nejprve bylo připraveno inokulum bakterií pro zaočkování příslušných kultivačních médií (M17 nebo BHI). Inokulum bylo připraveno zaočkováním bujónu o objemu 5 ml s příslušnými aminokyselinami (jako prekurzory BA). Následně probíhala kultivace bakterií při optimální teplotě (podle informací poskytovatele kultur o optimální teplotě růstu) po dobu 24 hodin.

Připraveny byly bujóny obsahující prekurzory testovaných biogenních aminů (aminokyseliny histidin, ornitin, arginin, lyzin, tyrozin, fenylalanin; Sigma–Aldrich, St. Louis, USA) v koncentracích 0,2 % (w/v) a příslušné látky při sledování faktorů (NaCl; Sigma–Aldrich) v testovaných koncentracích. Příslušné kultivační médium o objemu 5 ml bylo zaočkováno vždy 50 μ l 24 hodinové suspenze bakterií a po dosažení potřebného nárůstu buněk bylo médium podrobeno detekci produkce biogenních aminů. Každý izolát byl kultivován pro stejnou sledovanou kombinaci faktorů pětkrát podle Buňková *et al.* (2009).

V Experimentu II byl rovněž sledován vliv aerobního/anaerobního prostředí na produkci biogenních aminů. Anaerobního prostředí bylo dosaženo zakápnutím kultivačního média po zaočkování sterilním parafinovým olejem (750 μ l).

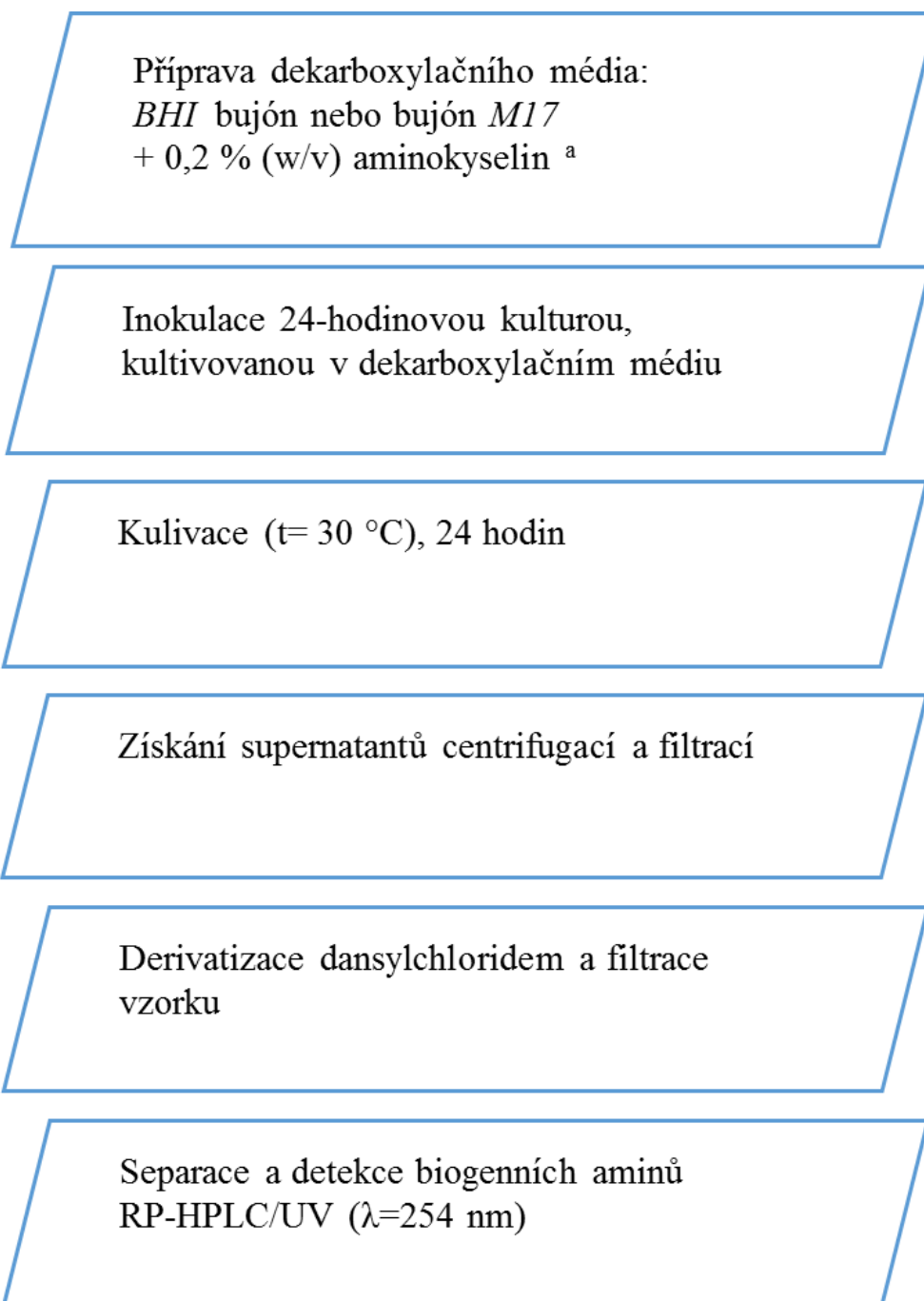
3.2 Popis experimentální části

Experimenty se zabývaly produkcí BA a fyzikálně chemickými faktory ovlivňujícími růst sledovaných bakterií a tvorbu BA. Cíle práce byly plněny ve dvou hlavních experimentech. Prvním experimentem byl skrínig dekarboxylázové aktivity všech získaných bakterií rodů *Staphylococcus* a *Enterococcus* metodou kapalinové chromatografie (HPLC/UV) s předkolonovou derivatizací dansylchloridem. Záměrem druhého experimentu bylo sledovat kinetiku produkce BA *in vitro* v závislosti na kultivačních podmínkách, při kterých byla monitorována dekarboxylázová aktivita vybraných bakteriálních kmenů.

3.2.1 Experiment I

V prvním experimentu byl proveden skrínig všech získaných bakterií rodů *Staphylococcus* a *Enterococcus* na dekarboxylázovou aktivitu. Na produkci BA bylo testováno celkem 54 kmenů: 33 enterokoků a 21 stafylokoků. U všech kmenů byla sledována produkce následujících 8 BA: kadaverinu (CAD), histaminu (HIS), fenyletylaminu (PHE), putrescinu (PUT), tyraminu (TYM),

tryptaminu (TRP), spermidinu (SPD) a sperminu (SPM). Separované dansylderiváty byly následně monitorovány UV detekcí. Schéma experimentu je znázorněno na Obr. 10.



Obr. 10. Schéma experimentu I – in vitro skrining dekarboxylázové aktivity testovaných kmenů stafylokoků v Brain Heart Infusion bujónu (BHI) a enterokoků v M17 bujónu.

^a Příklad aminokyselin jako prekurzorů tvorby BA (arginin, ornitin, histidin, tyrozin, lyzin) 0,2 % (w/v) každé jednotlivé aminokyseliny.

3.2.2 Experiment II

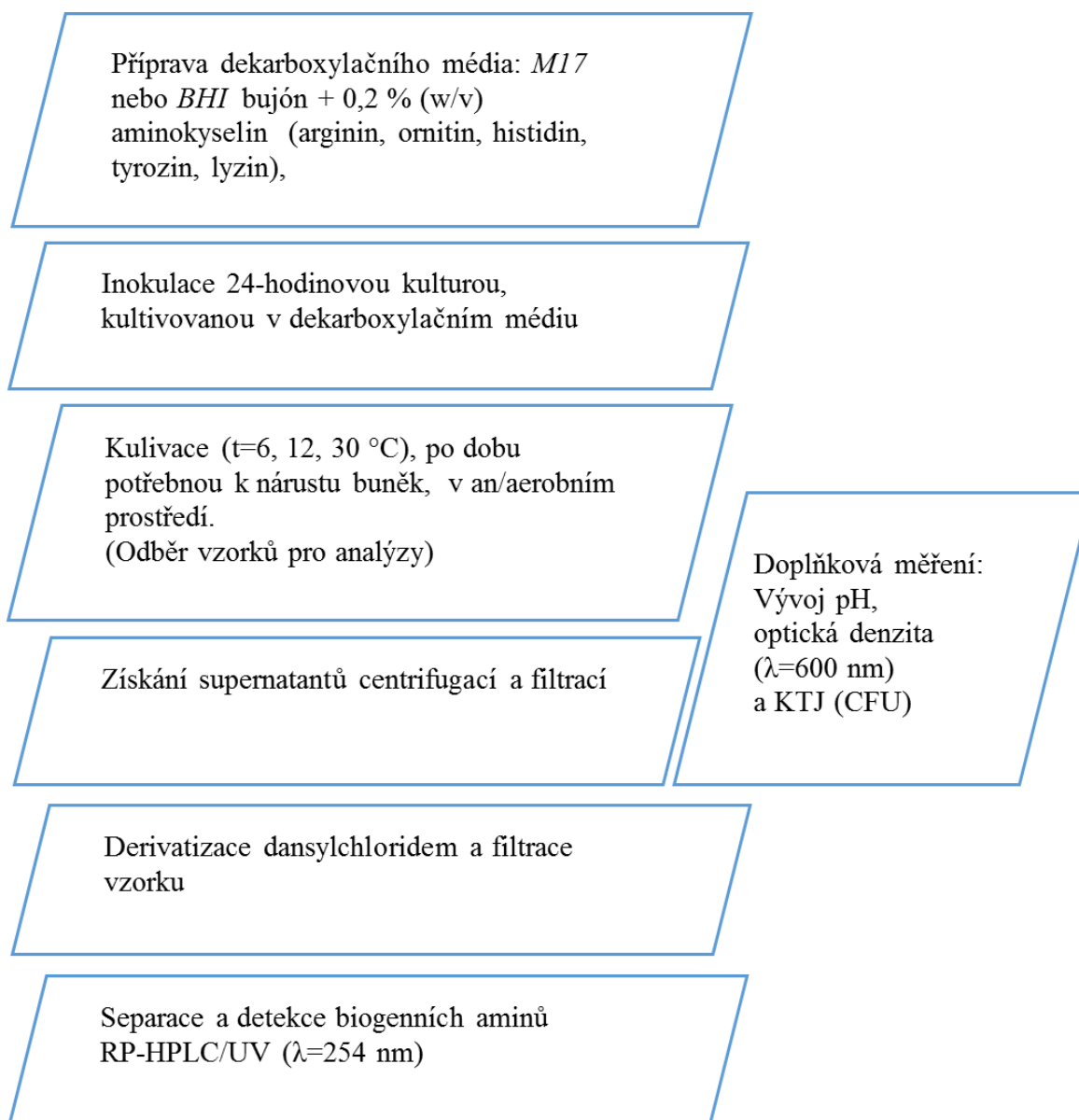
Tento experiment navazoval na Experiment I. Vybrané kmeny bakterií, pozitivní na produkci BA (jednoho a/nebo více), byly následně podrobeny analýzám, kde byla sledována kinetika produkce příslušných BA v závislosti na vlivu vybraných faktorů prostředí (teplota; pH; koncentrace NaCl; aerobní/anaerobní prostředí). Úrovně faktorů byly inspirovány technologickými procesy zpracování potravin, studii dekarboxyláza pozitivních mikroorganismů a podmínkami v Nařízení ES (Evropského společenství) týkající se zpracování potravin, zejména (Nařízení Komise (ES) 1993 – 2017).

V tomto experimentu probíhala kultivace kmenů pozitivních na produkci BA při teplotách 6, 12 a 30 ± 1 °C, které simulovaly podmínky chladírenských teplot a také teplotu optimálního růstu vybraných mikroorganismů. Délka kultivace byla volena v závislosti na kultivační teplotě. Kultivace probíhala jak za aerobních, tak i anaerobních podmínek (Obr. 11).

Bujón byl upraven následovně:

- obohacen o NaCl v koncentraci 0, 1, 2, 3 a 6 % (w/v);
- po přidání všech složek (bujón dle návodu výrobce plus příslušné aminokyseliny, případně NaCl) byla provedena úprava pH bujónu na hodnoty pH 5, 6, 7. Všechny sledované faktory byly použity ve vzájemných kombinacích.

Kromě stanovení množství BA metodou HPLC/UV byla sledována také optická denzita, CFU.ml⁻¹ a pH bujónu po kultivaci buněk.



Obr. 11. Schéma experimentu II – sledování faktorů ovlivňujících dekarboxylázovou aktivitu testovaných kmenů *in vitro*.

Odběr vzorků pro analýzy probíhal při optimální růstové teplotě v rozsahu 48 hodin (2., 4., 6., 8., 10., 12., 30., 36. a 48. hodinu), při nižších teplotách pro dosažení potřebného nárůstu buněk odběry probíhaly v delších intervalech (0., 1., 2., 3., 4., 5., 6., 7., 10., 12. a 15. den kultivace) a to tak, že byly odebrány od každého kmene a každé úrovně faktoru 2 zkumavky. Celý Experiment II byl proveden dvakrát.

3.3 Metody využívané v experimentální části

3.3.1 Stanovení nárůstu buněk

Měření optické denzity bylo využito v Experimentu II, kdy v jednotlivých etapách odběru vzorků byl sledován nárůst buněk bakterií rodů *Enterococcus* a *Staphylococcus* produkujících biogenní aminy. Optická denzita buněk byla

sledována při vlnové délce 600 nm (OD_{600}) proti bujónu obohaceném o příslušné prekurzory bez zaočkovaných buněk v mikrotitračních destičkách s použitím přístroje TECAN Sunrise TW/TC (Tecan, Männedorf, Švýcarsko) při sledovaných teplotách růstu 6, 12, 30 ± 1 °C. Zároveň se sledováním optické denzity byly zjišťovány plotnovou metodou také celkové počty mikroorganismů ($CFU \cdot ml^{-1}$). Na živném médiu (BHI agar) byly očkované suspenze bakterií (100 μ l) v odběrovém čase ve trojím po sobě jdoucím ředění a dvojnásobným opakováním. Při zaočkování na plotny agaru bylo příslušné ředění vybíráno dle zákalu bakteriální suspenze.

3.3.2 Měření pH kultivačního média

Měření pH kultivačního média byly v jednotlivých odběrových dnech srovnávány změny média v důsledku růstu bakterií. Kultivační médium bylo po inkubaci mikroorganismů centrifugováno $6000 \times g$; 22 ± 1 °C; 30 minut a po odstranění bakterií byla zjišťována hodnota pH bujónu. Hodnoty pH byly měřeny pH-metrem (EUTECH Instruments, Malaysia).

3.3.3 Stanovení aminokyselinového profilu kultivačních médií

Aminokyselinový profil použitých kultivačních médií a jejich komponentů byl stanoven po kyselé i oxidativní hydrolýze na aminokyselinovém analyzátoru AAA 400 (Ingos, Praha, ČR) po postkolonové derivatizaci ninhydrinem (ZMBD Chemik s.r.o, ČR). Obsah aminokyselin v médiu byl stanoven z důvodu jejich vztahu k dekarboxylačním reakcím. Pro účely srovnání byly zjištěné koncentrace vyjádřeny v 1 l tekutého média ($g \cdot l^{-1}$), podle Lazárková *et al.* (2010).

3.3.4 Stanovení biogenních aminů kapalinovou chromatografií

Bujón po kultivaci testovaných bakterií byl centrifugován ($15000 \times g$; 22 ± 1 °C; 20 minut) a získaný supernatant byl zředěn v poměru 1:1 (w/v) kyselinou chloristou ($1,2 g \cdot mol^{-1}$; Merck, Darmstadt, Německo). Směs byla podrobena derivatizaci dansylchloridem (Sigma–Aldrich, St. Louis, USA) v acetonu (Sigma–Aldrich) o koncentraci $5 mg \cdot ml^{-1}$ podle Dadáková *et al.* (2009). Jako interní standard byl použit 1,7–heptandiamin (Sigma–Aldrich).

Podmínky separace sledovaných BA jsou popsány v práci Smělá *et al.* (2004). Separace byla provedena gradientovou elucí (voda/acetonitril; Sigma–Aldrich). Každý z pěti nakultivovaných bujónů (pro jeden testovaný mikroorganismus a kombinaci stejných sledovaných faktorů, včetně kontroly) byl derivatizován dvakrát a každá derivatizovaná směs byla nanesena na kolonu (autosampler; LabAlliance, USA and Agilent, Technologies, Agilent, Santa Clara, California, USA, kolona ZORBAX, Eclipse XDB–C18, 50 x 9 x 3.0 mm, 1.8 μ m; Agilent Technologies), detekce probíhala pomocí DAD UV/VIS detektoru ($\lambda=254$ nm) ve dvojnásobném opakování ($n=20$).

3.3.5 Statistické metody hodnocení dat

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

Růst mikroorganismů v čase byl sledován pomocí hodnot optické denzity (kapitola 3.3.1). Hodnoty optické denzity byly využity k odhadu počtu mikroorganismů v čase t (N_t), a to za použití kalibračního modelu. Závislost logaritmu relativního počtu mikroorganismů $y = \ln(N_t/N_0)$, kde N_t a N_0 jsou celkové počty mikroorganismů ($\text{CFU}\cdot\text{ml}^{-1}$) v čase t a čase 0, na čase t (h) byla modelována pomocí Gompertzova modelu (Rovnice 1):

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

kde: μ_m je maximální specifická růstová rychlost ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$); λ lag fáze (h); A je asymptota definovaná jako maximální dosažená hodnota relativního počtu mikroorganismů ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$).

Pro výpočet parametrů μ_m , λ a A byla použita nelineární regresní analýza (Marquardt–Levenburgova metoda) pro následující podmínky $\mu > 0$, $\lambda > 0$ a $A > 0$. Vývoj produkce obsahu BA ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$) u rodů *Enterococcus* a *Staphylococcus* byl modelován také s použitím Gompertzových modelů. Závislost obsahu vývoje BA (y) ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$) na čase (t) byla vyjádřena jako (Rovnice 2):

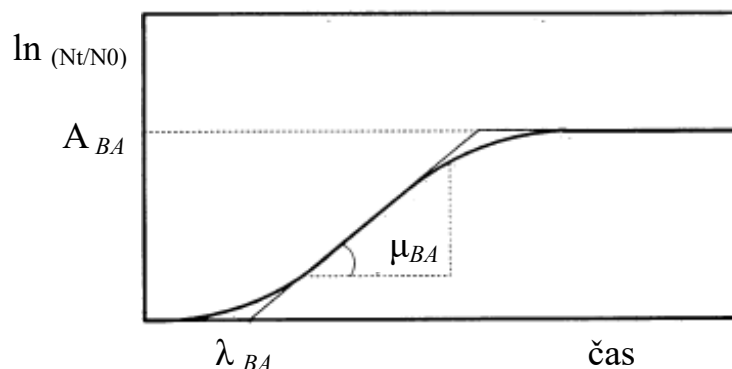
$$y = A_{BA} \cdot \exp \left\{ -\exp \left[\frac{\mu_{BA} \cdot e}{A_{BA}} (\lambda_{BA} - t) + 1 \right] \right\} \quad (2)$$

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

λ_{BA} je doba prodlení produkce BA (h);

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

Význam jednotlivých parametrů Gompertzova modelu je znázorněn na Obr. 12. (Zwietering *et al.*, 1990).



Obr. 12. Parametry Gompertzova modelu (upraveno podle Zwietering *et al.*, 1990).

Pro výpočet parametrů μ_m , λ a A byla použita nelineární regresní analýza (Marquardt–Levenburgova metoda) pro následující podmínky $\mu_{BA} > 0$, $\lambda_{BA} > 0$ a $A_{BA} > 0$. Absolutní tvorba BA (mg.l^{-1}), může souviset s absolutním počtem bakterií v bujónu (CFU.ml^{-1}). Lze tedy využít tzv. produkční (yield) faktor (Y_{BA}/CFU , mg.CFU^{-1}), který vypovídá o teoretické produkci BA jednou CFU. Produkční faktor (Y_{BA}/CFU) lze vypočítat dle modelu (Rovnice 3):

$$BA_t = BA_0 + Y_{BA/\text{CFU}} \cdot (N_t - N_0) \cdot 1000 \quad (3)$$

kde BA_t a BA_0 (mg.l^{-1}) jsou koncentrace biogenních aminů v čase t a 0 a N_t a N_0 jsou celkové počty CFU.ml^{-1} v čase (t) a čase 0 . Parametr Y_{BA}/CFU byl odhadnut metodou nelineární regrese (Marquardt–Levenburgova metoda) pro $Y_{BA}/\text{CFU} > 0$. Parametr Y_{BA}/CFU byl vyjádřen v $\text{mg.10}^9.\text{CFU}^{-1}$.

Kvalita navržených modelů byla posuzována pomocí indexu determinace (I2). Homogenita parametrů regresních funkcí byla testována s využitím Kruskal–Wallisova a Wilcoxonova testu, a to na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ (Buňková *et al.*, 2011; Hendl, 2004; Zwietering *et al.*, 1990). Data byla po statistické analýze znázorněna v grafech vytvořených v programu Origin® 2016 (Graphing & Analysis).

5. VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1 Výsledky experimentu I – dekarboxylázová aktivita

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

Na základě analýzy dat byly mikroorganismy podle dekarboxylázové aktivity rozděleny do pěti skupin: velmi nízká produkce biogenních aminů, produkce BA pod mezí detekce (<2 mg.l⁻¹; -); nízká produkce (2–10 mg.l⁻¹; +); střední produkce (10–100 mg.l⁻¹; ++); vysoká produkce (100–1000 mg.l⁻¹; +++); a velmi vysoká produkce (>1000 mg.l⁻¹; ++++). Výsledky obsahů BA v médiích po kultivaci sledovaných mikroorganismů jsou uvedeny v Tab. 5.

Tab. 5. Produkce biogenních aminů bakteriemi rodů *Staphylococcus* a *Enterococcus* izolovanými ze *Salmo trutta* a *Oryctolagus curiculus*.

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

^a N – Počet izolátů daného druhu bakterií

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

5.1.1 *Enterococcus* sp.

Většina testovaných kmenů rodu *Enterococcus* (31 ze studovaných 33 izolátů) byla posouzena jako dekarboxyláza pozitivní. Dva kmeny (M2C; M3b) produkovaly putrescin v kombinaci s kadaverinem a tyraminem. Devět izolátů (5BM1; 5BM2; M1B; M2c; M3a; M4aA; M5a; M5aA; M5aB) produkovalo fenyletylamin spolu s kadaverinem a tyraminem. Dvojici BA kadaverin a tyramin produkovalo dalších 13 enterokoků (1BM; 4BM1; 4BM2; M1c; M2a; M2A; M3A; M6c; M6C; M4B; M6B; M7Ba; M7Bb). Jeden izolát (M5A) produkoval kadaverin a fenyletylamin. Zbylých 6 dekarboxyláza pozitivních

kmenů produkovalo po jednom biogenním aminu: dva kmeny (M1C; M7b) kadaverin a čtyři kmeny (M2cA; M2cB; M4aB; M4C) tyramin. Žádný ze sledovaných kmenů rodu *Enterococcus* neprodukoval histamin, spermin a spermidin. Pouze u dvou izolátů (M1b; M7C) nebyla vůbec produkce sledovaných biogenních aminů zjištěna.

Z dvaadvaceti sledovaných kmenů *Enterococcus faecium* 5 kmenů (5BM1; M1B; M3a; M4aA; M5aB) tvořilo kombinaci BA kadaverin ($6,0 \pm 0,2$ mg.l⁻¹, $8,0 \pm 1,0$ mg.l⁻¹, $4,0 \pm 0,8$ mg.l⁻¹, $5,0 \pm 0,3$ mg.l⁻¹ a $5,0 \pm 1,0$ mg.l⁻¹), fenyletylamin ($50,0 \pm 8,0$ mg.l⁻¹, $40,0 \pm 4,0$ mg.l⁻¹, $46,0 \pm 8,0$ mg.l⁻¹, $30,0 \pm 5,0$ mg.l⁻¹ a $32,0 \pm 2,0$ mg.l⁻¹) a tyramin ($3400,0 \pm 170,0$ mg.l⁻¹, $2800,0 \pm 300,0$ mg.l⁻¹, $3400,0 \pm 90,0$ mg.l⁻¹, $3200,0 \pm 160,0$ mg.l⁻¹ a $3300,0 \pm 300,0$ mg.l⁻¹). Dva kmeny (M2C; M3b) produkovaly putrescin ($600,0 \pm 20,0$ mg.l⁻¹ a $860,0 \pm 100,0$ mg.l⁻¹), kadaverin ($2,0 \pm 0,2$ mg.l⁻¹ a $5,0 \pm 0,3$ mg.l⁻¹) a tyramin ($7,0 \pm 4,0$ mg.l⁻¹ a $40,0 \pm 10,0$ mg.l⁻¹). Častou kombinací (celkem 7 kmenů; 4BM1; M2a; M2A; M4B; M6c; M6C; M1c) byla také tvorba kadaverinu (5–10 mg.l⁻¹ média) a tyraminu (2–20 mg.l⁻¹ média). U dvou kmenů (M1C; M7b) byla pozorována tvorba pouze kadaverinu ($7,0 \pm 1,0$ mg.l⁻¹ a $6,0 \pm 2,0$ mg.l⁻¹) a u dalších 3 kmenů (M2cA; M2cB; M4C) jen tvorba tyraminu ($1100,0 \pm 20,0$ mg.l⁻¹, $3,0 \pm 1,0$ mg.l⁻¹ a $1100,0 \pm 30,0$ mg.l⁻¹).

Všechny sledované kmeny *Enterococcus* sp. (1BM; 4BM2; 5BM2; M2c; M3A; M4aB; M5a; M5aA; M6B; M7bA; M7bB) produkovaly tyramin (5–4000 mg.l⁻¹) a 10 z nich (kromě M4aB) také kadaverin (2–7 mg.l⁻¹). Pouze 1/3 kmenů *Enterococcus* sp. (M5aA; 5BM2; M2c; M5a) produkovala ještě fenyletylamin (20–60 mg.l⁻¹). Putrescin a histamin nebyly v této skupině enterokoků detekovány.

Dle již zmíněných výsledků byly pro experiment II (tvorba BA v závislosti na podmínkách kultivace) vybrány dekarboxyláza pozitivní kmeny, aby u nich mohla být analyzována produkce BA v závislosti na podmínkách kultivace. Pro sledování BA byla použita HPLC/UV (3.3.4).

5.1.2 *Staphylococcus* sp.

Z 21 sledovaných kmenů rodu *Staphylococcus* produkovalo 7 kmenů (18/1; 21/1; 22/3; 23/4; 23/5; 24/1; 24/2) současně až 4 z monitorovaných BA. U těchto kmenů byla obvykle zaznamenána střední produkce putrescinu, nízká až střední koncentrace fenyletylaminu, střední až vysoká produkce kadaverinu a velmi vysoká koncentrace tyraminu. Dalších 5 kmenů (16/2; 19/1; 21/2; 22/1; 23/2) produkovalo současně 3 BA v kombinaci fenyletylamin, kadaverin a tyramin. Pouze u jednoho kmene (18/1) byla stanovena velmi nízká produkce histaminu. Dalších 5 kmenů (19/2; 20/1; 22/2; 23/1; 23/3) tohoto rodu produkovalo různé kombinace BA: (i) 3 kmeny (22/2; 23/3; 20/1) putrescin a kadaverin; (ii) jeden kmen (23/1) fenyletylamin a tyramin; (iii) jeden kmen (19/2) putrescin a tyramin; a (iv) 2 kmeny (20/2; 22/4) putrescin, kadaverin a tyramin. Dva kmeny produkovaly pouze jeden biogenní amin: kmen 16/1

produkoval tyramin ($900 \pm 60 \text{ mg.l}^{-1}$) a kmen 24/3 produkoval kadaverin ($600 \pm 10 \text{ mg.l}^{-1}$).

Všichni sledovaní zástupci *Staphylococcus warneri* produkovali některý ze sledovaných BA, a to následujícím způsobem: fenyletylamin byl detekován po kultivaci u 5 kmenů (16/2; 18/1; 23/1; 24/1; 24/2; $7\text{--}32 \text{ mg.l}^{-1}$ média); kadaverin u 7 kmenů (16/2; 18/1; 23/2; 23/3; 24/1; 24/2; 24/3; $6\text{--}600 \text{ mg.l}^{-1}$ média); a tyramin u 7 kmenů (16/2; 18/1; 23/1; 24/1; 24/2; v koncentraci $>1000 \text{ mg.l}^{-1}$ média). U 4 kmenů (23/2; 23/3; 24/1; 24/2) byl kadaverin a tyramin produkován spolu s putrescinem ($14\text{--}40 \text{ mg.l}^{-1}$ média). Pouze jeden kmen *S. warneri* 18/1 produkoval histamin ($3,0 \pm 0,4 \text{ mg.l}^{-1}$ média).

Oba sledované kmeny *Staphylococcus pasteurii* (19/1; 23/5) produkovaly fenyletylamin ($20,0 \pm 5,0 \text{ mg.l}^{-1}$ a $2,2 \pm 0,2 \text{ mg.l}^{-1}$), kadaverin ($900,0 \pm 130,0 \text{ mg.l}^{-1}$ a $1200,0 \pm 200,0 \text{ mg.l}^{-1}$) i tyramin ($5,5 \pm 3,0 \text{ mg.l}^{-1}$ a $5,5 \pm 2,0 \text{ mg.l}^{-1}$). Produkce putrescinu byla zjištěna pouze u jednoho z kmenů (19/1) *S. pasteurii* ($950,0 \pm 84,0 \text{ mg.l}^{-1}$ média). Dva ze tří testovaných kmenů *S. epidermidis* (21/1; 23/4) produkovaly BA v kombinaci putrescin ($8,0 \pm 3,0 \text{ mg.l}^{-1}$ a $40,0 \pm 5,0 \text{ mg.l}^{-1}$), fenyletylamin ($8,0 \pm 2,0 \text{ mg.l}^{-1}$ a $2,0 \pm 0,1 \text{ mg.l}^{-1}$), kadaverin ($40,0 \pm 4,0 \text{ mg.l}^{-1}$ a $1000,0 \pm 100,0 \text{ mg.l}^{-1}$) a tyramin ($2200,0 \pm 200,0 \text{ mg.l}^{-1}$ a $6,0 \pm 2,0 \text{ mg.l}^{-1}$). U třetího sledovaného kmene *S. epidermidis* (21/2) nebyla zjištěna produkce putrescinu, zjištěna však byla přítomnost fenyletylaminu, kadaverinu a tyraminu v koncentracích $32,0 \pm 4,0 \text{ mg.l}^{-1}$, $570,0 \pm 80,0 \text{ mg.l}^{-1}$ a $2600,0 \pm 350,0 \text{ mg.l}^{-1}$.

Všechny tři sledované kmeny *S. hominis* (19/2; 20/1; 20/2) produkovaly putrescin ($800,0 \pm 170,0 \text{ mg.l}^{-1}$, $750,0 \pm 50,0 \text{ mg.l}^{-1}$ a $1100,0 \pm 300,0 \text{ mg.l}^{-1}$), kadaverin (nedetekován, $900,0 \pm 300,0 \text{ mg.l}^{-1}$ a $640,0 \pm 26,0 \text{ mg.l}^{-1}$) a tyramin ($1300,0 \pm 380,0 \text{ mg.l}^{-1}$, $2,0 \pm 0,9 \text{ mg.l}^{-1}$ a $1750,0 \pm 200,0 \text{ mg.l}^{-1}$).

Tři ze čtyř izolátů *Staphylococcus haemolyticus* (22/2; 22/3; 22/4) produkovaly putrescin ($60,0 \pm 20,0 \text{ mg.l}^{-1}$, $190,0 \pm 16,0 \text{ mg.l}^{-1}$ a $45,0 \pm 3,0 \text{ mg.l}^{-1}$), čtyři kmeny (22/1; 22/2; 22/3; 22/4) produkovaly kadaverin ($13,0 \pm 1,0 \text{ mg.l}^{-1}$, $580,0 \pm 50,0 \text{ mg.l}^{-1}$, $930,0 \pm 30,0 \text{ mg.l}^{-1}$ a $1300,0 \pm 100,0 \text{ mg.l}^{-1}$). Tři kmeny (22/1; 22/3; 22/4) syntetizovaly navíc tyramin ($500,0 \pm 20,0 \text{ mg.l}^{-1}$, $5,0 \pm 0,7 \text{ mg.l}^{-1}$, a $4,2 \pm 0,4 \text{ mg.l}^{-1}$) a izolát 22/3 dokonce v nízkém množství ($3,0 \pm 0,4 \text{ mg.l}^{-1}$) i fenyletylamin. Produkce biogenních aminů u zástupců *S. haemolyticus* nebyla v dostupné literatuře popsána.

5.2 Diskuze k experimentu I

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

všudypřítomné bakterie, jejich výskyt je primárně svázán s kůží, kožními žlázami a sliznicemi teplokrevných obratlovců. Následně jsou tedy běžně izolovány z potravin živočišného původu (maso, mléko, sýry), kam se dostávají během porážky hospodářských zvířat, v průběhu skladování a distribuce (Yang *et al.*, 2016) a z nejrůznějších prostředí. Zástupci obou rodů mohou vyvolat alimentární infekce či intoxikace, na druhou stranu se enterokoky využívají při výrobě potravin či se přidávají jako probiotika (Bhardwaj *et al.*, 2010). Z toho důvodu je velmi důležité důkladně zmapovat další možnosti ohrožení zdraví konzumentů produkcí nebezpečných látek, jako jsou BA. Je otázkou, zda je tolerance enterokoků jako nonstartérových kmenů v potravinách přijatelná (Morandi *et al.*, 2005).

Pouze u dvou kmenů (MC7; M1b) ze všech 33 sledovaných zástupců rodu *Enterococcus* nebyla zjištěna žádná dekarboxylázová aktivita. U rodu *Staphylococcus* byla produkce BA zjištěna u všech sledovaných kmenů, přičemž byly detekovány následující BA: histamin, tyramin, putrescin, kadaverin a fenyletylamin. Naopak, žádný ze sledovaných kmenů enterokoků a stafylokoků nevykazoval produkci sperminu, spermidinu nebo tryptaminu. Na bohatou produkci BA u některých zástupců rodů *Enterococcus* a *Staphylococcus* upozornili již ve svých studiích Cosentino *et al.* (2004), Martín *et al.* (2006), Burdychová a Komprda (2007), Buňková *et al.* (2009), Even *et al.* (2010) a Latorre–Moratalla *et al.* (2010). Leuschner *et al.* (1998) uvedli, že existují kmeny rodu *Staphylococcus* izolované z potravin, které BA netvoří. Podle Martín *et al.* (2006) jsou stafylokoky obvykle uváděny jako slabě pozitivní nebo dekarboxyláza negativní mikroorganismy. Výsledky této práce však poukazují na skutečnost, že stafylokoky mohou být významnými producenty BA a potenciálně tak ohrožovat bezpečnost potravin.

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

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

U kmenů *Staphylococcus hominis* studovaných v Experimentu I nebyla zaznamenána tvorba histaminu, kdežto tyramin, putrescin a kadaverin byly nadprodukovány. V dostupné literatuře nebyla nalezena produkce tyraminu a

putrescinu u izolátů *S. hominis* z produktů rybolovu (Hwang *et al.*, 2011), naopak neprodukovaly histamin, fenyletylamin a kadaverin.

Oba kmeny *S. pasteurii* produkovaly významně kadaverin, tyramin v rozdílné míře a mírně fenyletylamin. Putrescin byl zaznamenán pouze u jednoho kmene. Bermudéz *et al.* (2012) zjistil pouze velmi nízké koncentrace putrescinu a kadaverinu u zástupců tohoto druhu. U studovaných kmenů *S. haemolyticus* byla nejvýznamnější produkce kadaverinu, putrescinu a tyraminu. Fenyletylamin byl tvořen ve velmi nízkých koncentracích. V aktuální odborné literatuře nejsou dostupné žádné údaje o dekarboxylázové aktivitě u tohoto druhu.

V rámci Experimentu I byla potvrzena významná produkce tyraminu u většiny z 33 studovaných kmenů rodu *Enterococcus*. Dva kmeny výrazně tvoří putrescin. Fenyletylamin a kadaverin byly zaznamenány spíše ojediněle a v nízkých koncentracích. Halász *et al.* (1994) popisuje výraznou tvorbu BA u enterokoků izolovaných ryb. Produkce BA zástupci rodu *Enterococcus* je v literatuře známá a hojně popsána (Bover-Cid *et al.*, 2001; Marcobal *et al.*, 2006 a Burdychová a Komprda, 2007). Burdychová a Komprda (2007) také uvedli, že řada kmenů rodu *Enterococcus* tvoří takové koncentrace tyraminu, které již překračují hladinu toxicity (100 mg.l⁻¹). U testovaných kmenů enterokoků v rámci Experimentu I nebyla zjištěna produkce histaminu, což koresponduje s prací ten Brink *et al.* (1990), avšak Martín *et al.* (2006) uvádí opak. Jelikož jsou některé kmeny enterokoků používány dokonce jako probiotika (Deepika a Rakshit, 2011; Bhardwaj *et al.*, 2010), je třeba se dekarboxylázovou aktivitou zástupců tohoto rodu podrobněji zabývat.

Bover-Cid *et al.* (2001) zjistili produkci tyraminu (500–4300 mg.l⁻¹) a fenyletylaminu (40–432 mg.l⁻¹) u kmenů *E. faecium*. Naopak u těchto izolátů nedetekovali produkci putrescinu a kadaverinu. Autoři rovněž označují studované enterokoky za časté producenty tyraminu a fenyletylaminu, což koresponduje s výsledky této práce. Častou produkcí tyraminu u kmenů *E. faecium* popisují také Roig-Sagués *et al.* (2002), Cosentino *et al.* (2004) a Komprda *et al.* (2008a). V případě kmenů testovaných v této dizertační práci byla tyramin–pozitivní až čtvrtina izolátů *E. faecium*. Dapkevicius *et al.* (2000) studovali kmeny *E. faecium* izolované z makrely obecné (*Scomber scombrus*) a detekovali v souladu s výsledky této práce bohatou produkcí tyraminu. Oproti tomu, posledně citovaní autoři, poukazují také na produkci histaminu, která nebyla v této studii u izolátů *E. faecium* zjištěna. Latorre-Moratalla *et al.* (2010) detekovali u kmenů *E. faecium* kromě již několikrát zmíněného tyraminu i produkci fenyletylaminu a tryptaminu. Pircher *et al.* (2007) uvedli, že dekarboxylázová aktivita u *E. faecium* tvořících histamin a putrescin je slabá. Kromě dvou izolátů sledovaných v této práci nebyla produkce putrescinu u *E. faecium* zjištěna. Na druhou stranu, u dvou putrescin–pozitivních kmenů byla tvorba putrescinu hojná (>500 mg.l⁻¹). Produkce kadaverinu nebyla u izolátů *E. faecium* v dostupné literatuře nalezena.

Podle Marcobal *et al.* (2006) je produkce BA ovlivněna mimo jiné množstvím prekurzorů (zejména volných aminokyselin) a úpravou fyzikálně chemických podmínek prostředí. Navíc produkce BA je vlastnost kmenově závislá (Buňková *et al.*, 2009; Standarová *et al.*, 2009; Pircher *et al.*, 2007). Zde je možné hledat zdůvodnění rozdílů mezi publikovanými studiemi a výsledky této práce.

Na vysokou produkci tyraminu kmeny *Enterococcus* sp. upozornili ve svých pracích např. Koutsoumanis *et al.* (2010) a Pircher *et al.* (2007). Pons-S.-Cascado *et al.* (2005) popisují ve studii, kde sledovali přítomnost BA i mikroflóru v sardeli obecné (*Engraulis encrasicolus*), produkci BA u izolátů enterokoků. Tyto publikované výsledky jsou v souladu se závěry Experimentu I. Řada zástupců rodu *Enterococcus* produkovala tyramin v toxikologicky významných koncentracích (autoři prezentovali množství tyraminu 320–2010 mg.l⁻¹). Avšak, posledně zmínění autoři nezaznamenali produkci putrescinu, kadaverinu ani histaminu. Produkce kadaverinu bakteriemi rodu *Enterococcus* nebyla v literatuře prozatím často uváděna. Lze tedy shrnout, že tyramin je stejně významným biogenním aminem jako histamin a lze navrhnout jeho determinaci v potravinách.

Kapalinová chromatografie s předkolonovou derivatizací dansylchloridem a UV detekcí ($\lambda=254$ nm) je vhodnou, přesnou, avšak finančně nákladnou metodou ke stanovení biogenních aminů. Zvyšuje se potřeba pro jednodušší, levnější a rychlejší metody detekce nebezpečných aminů v potravinách. Jedna z nich je založená na využití nanočástic zlata (El-Nour *et al.*, 2017). Další perspektivní alternativou ke stanovení BA metodou HPLC se jeví selektivní metoda Surface Enhanced Raman Spektroskopie (SERS–TLC). Tato metoda byla kvalitativně i kvantitativně validována na vzorcích ryb (Xie *et al.*, 2017).

5.3 Výsledky experimentu II – sledování vlivu faktorů

V Tab. 6 jsou uvedeny hodnoty vyprodukovaných BA za optimálních kultivačních podmínek pro bakterie. V této práci byla sledována produkce BA v čase za různých změněných podmínek růstu: teplota 6, 12 a 30 °C v kombinaci s přidavkem NaCl 1, 2, 3, 6 % (w/v), v závislosti na přístupu kyslíku a pH kultivačního prostředí (pH 5, 6, 7). Všechny uvedené faktory byly studovány ve vzájemných kombinacích. Tyto faktory simulují podmínky prostředí v potravinách, kde se enterokoky a stafylokoky běžně vyskytují (na povrchu i uvnitř potravin).

Do růstového média byly současně přidány aminokyseliny – arginin, fenylalanin, histidin, lyzin, ornitin a tyrozin v koncentraci 0,2 % (w/v). U sledovaných kmenů enterokoků a stafylokoků byla zjištěna produkce kadaverinu (CAD), fenyletylaminu (PHE), putrescinu (PUT) a tyraminu (TYM). Histamin (HIS), spermidin (SPD) a spermin (SPM) byly produkovány ojedinele. Tryptamin (TRP) nebyl detekován u žádného sledovaného kmenu.

Průměrná hodnota množství BA stanovená v čase 0 v médiu BHI byla $5,5 \pm 0,3 \text{ mg.l}^{-1}$. Vzhledem k tomuto faktu je za produkci považována hodnota nad tuto mez. Biogenní aminy v těchto nízkých hodnotách jsou nejen přirozenou součástí živných médií, ale mohou být dány i metodikou přípravy inokula (Kapitola 3.1.2). Z literatury je známo, že produkce BA je velmi úzce spojena s počtem bakterií v daném prostředí. Z tohoto důvodu byly stanoveny růstové křivky u tří modelových kmenů (*Enterococcus faecium* M2C, *Staphylococcus pasteurii* 19/1, *Staphylococcus epidermidis* 21/2).

Tab. 6. Produkce biogenních aminů bakteriemi rodů *Staphylococcus* a *Enterococcus* za optimálních podmínek růstu (30 °C, pH 7, bez přídavku NaCl, aerobně).

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

5.3.1 *Enterococcus faecium* M2C

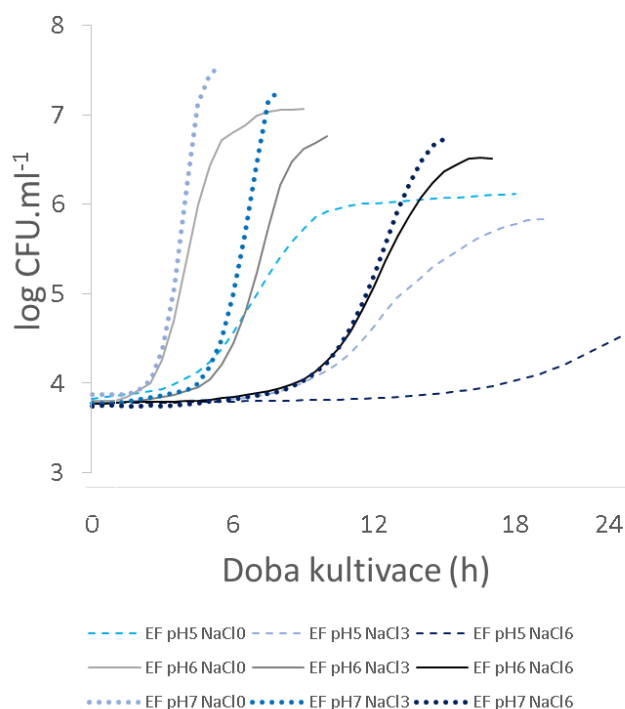
Dekarboxylázová aktivita kmene *Enterococcus faecium* M2C byla sledována při následujících kultivačních podmínkách: teplota 6 ± 1 °C, 12 ± 1 °C a 30 ± 1 °C; pH 5, 6 a 7; 0, 1, 2, 3, 6 % (w/v) NaCl za aerobních a anaerobních podmínek. Nejvyšší maximální hodnoty a podmínky, při kterých bylo těchto hodnot dosaženo, jsou uvedeny v Tab. 7.

Tab. 7. Maximální produkce BA u *Enterococcus faecium* M2C.

| <i>Enterococcus faecium</i> M2C | BA mg.l^{-1} | Teplota (°C) | pH | NaCl (w/v) | an/aerobně |
|---------------------------------|-----------------------|--------------|----|------------|------------|
| tyramin | 2200,1 | 30 | 6 | 1 | AN |
| fenyletylamin | 391,8 | 30 | 6 | 0 | A |
| histamin | 13,1 | 30 | 7 | 0 | AN |
| tryptamin | 22,2 | 6 | 6 | 1 | AN |
| putrescin | 63,6 | 30 | 6 | 1 | AN |
| kadaverin | 14,2 | 12 | 6 | 1 | AN |
| spermin | 35,4 | 30 | 5 | 6 | A |
| spermidin | 34,8 | 12 | 7 | 1 | A |

Růstová křivka Enterococcus faecium M2C

Délka lag fáze se prodlužovala se snižující se teplotou i pH a se zvyšující se hodnotou NaCl ≥ 3 % (w/v). Při stejném pH, ale při snížené teplotě byl růst enterokoků velmi zpomalen. Jak je patrné z Obr. 13, byla lag fáze růstu *E. faecium* prodloužena dvojnásobně při koncentraci NaCl 3 % (w/v) a čtyřnásobně při koncentraci NaCl 6 % (w/v). Mnohem menší vliv mělo na růst buněk pH. *E. faecium* M2C i všechny ostatní kmeny sledovaných enterokoků (*E. faecium* 5BM1; *Enterococcus* sp. M5a) vykazovaly podobné chování při všech sledovaných faktorech.



Obr. 13. Růstové křivky *Enterococcus faecium* M2C (EF) při pH 5, 6 a 7 (pH5, pH6 a pH7), $t=30$ °C, aerobních podmínkách s přidavkem různých koncentrací 0, 3 a 6 % (w/v) NaCl (NaCl0, NaCl3 a NaCl6).

Vliv teploty na produkci biogenních aminů

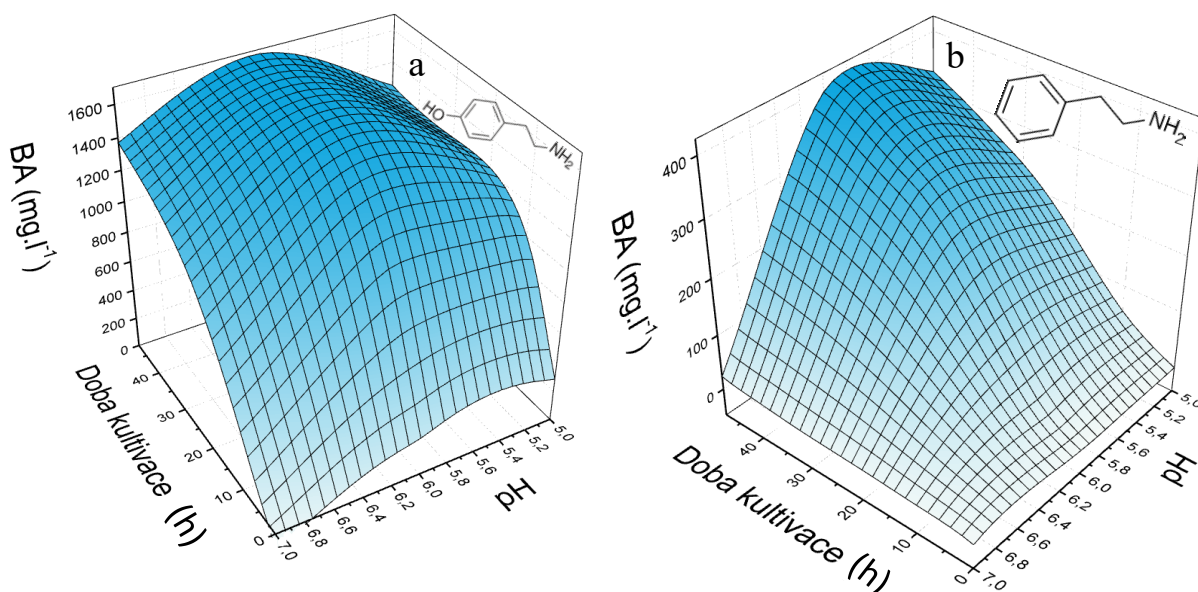
U výše zmíněných kmenů enterokoků byla sledována kinetika produkce BA *in vitro* v závislosti na kultivační teplotě (6, 12 a 30 °C). Suma všech sledovaných BA byla ovlivněna především množstvím tyraminu. Při nižších teplotách kultivace byla produkce tyraminu u *E. faecium* M2C po 24 hodinové kultivaci nižší než při kultivační teplotě 30 °C. Při této teplotě byla produkce TYM ($2200,5 \pm 20,7$ mg.l⁻¹) několikanásobně vyšší. Ačkoli teplota 6 °C není optimální pro růst enterokoků, nebylo pozorováno přerušení růstu buněk, ani zastavení produkce BA. Dalším ze sledovaných BA byl fenyletylamin. Produkce PHE byla nejvyšší po 48 hodinové kultivaci při teplotě 30 °C, kdy dosáhla koncentrace $992,6 \pm 9,9$ mg.l⁻¹. Během kultivace při nižších teplotách 6 a 12 °C byla jeho produkce naopak velmi nízká, $\leq 5,0$ mg.l⁻¹. K výraznému navýšení

produkce fenyletylaminu při nižších teplotách došlo až po 360 hodinách kultivace ($207,7 \pm 3,39 \text{ mg.l}^{-1}$).

Putrescin je prekurzorem tvorby sperminu i spermidinu v rámci metabolismu L-argininu. Po 24 i 48 hodinách kultivace bylo množství produkovaného putrescinu, sperminu i spermidinu, při všech teplotách řádově stejné. Histamin, kadaverin a tryptamin nebyly zaznamenány na hranici detekčního limitu 2 mg.l^{-1} při všech testovaných teplotách kultivace.

Vliv pH na produkci BA u *Enterococcus faecium* M2C

Nejvýznamnějším BA, dle vyprodukovaného množství, byl tyramin. Nejvyšší stanovené množství TYM produkované *E. faecium* M2C bylo při $6 \text{ }^\circ\text{C}$, pH 5 a po 336 hodinách kultivace. Z grafů (Obr. 14) je patrné, že nejvhodnější prostředí pro tvorbu tyraminu při teplotě $6 \text{ }^\circ\text{C}$ bylo médium o pH 5, zatímco při vyšších teplotách byla produkce tyraminu podpořena při pH 6. Při $30 \text{ }^\circ\text{C}$ a pH 6 byla produkce TYM po 48 hodinách kultivace nejvyšší ($1996,5 \text{ mg.l}^{-1}$). Produkce TYM byla iniciovaná rychleji při pH 5 a 6 než při neutrální hodnotě pH. Avšak produkce TYM se v těchto médiích po 24 hodinách kultivace výrazněji zpomalila oproti produkci při pH 7.



Obr. 14. Kinetika produkce tyraminu (a) a fenyletylaminu (b) při teplotě $30 \text{ }^\circ\text{C}$ u *Enterococcus faecium* M2C v závislosti na pH.

Na významných změnách produkce fenyletylaminu v závislosti na pH se jako důležitý faktor podílela teplota. Při kultivační teplotě $30 \text{ }^\circ\text{C}$ docházelo při pH 5 k pozvolnější produkci fenyletylaminu než v médiu o pH 6 – 6,2 které se dá považovat za optimální pro produkci BA. Při dalším zvyšování pH (Příloha II, Obr. 1) se produkce PHE v čase snižovala. Při $30 \text{ }^\circ\text{C}$ a pH 5 byla produkce po 12 hodinách kultivace řádově stejná jako při pH 6. Dále bylo zjištěno, že se zvyšujícím se pH produkce začala stagnovat. Při pH 7 byla produkce nejnižší

($\leq 2,0 \text{ mg.l}^{-1}$). Pokud byl *E. faecium* M2C kultivován při teplotě $6 \text{ }^\circ\text{C}$, tak nedocházelo k produkci fenyletylaminu.

Změna pH neměla jednoznačný vliv na produkci kadaverinu u *E. faecium* M2C (Příloha II, Obr. 2). Při $30 \text{ }^\circ\text{C}$ a pH 5 množství kadaverinu v médiu mírně klesalo během prvních 24 hodin kultivace, poté se v průběhu pokračující kultivace množství kadaverinu výrazněji neměnilo. Při pH 7 množství kadaverinu v médiu klesalo až ke $2,0 \text{ mg.l}^{-1}$ během 24 hodin kultivace. Pouze při pH 6 došlo k následnému nárůstu produkce kadaverinu. Při kultivační teplotě $6 \text{ }^\circ\text{C}$ docházelo k nárůstu produkce kadaverinu pouze v kultivačním médiu upraveném na počáteční pH 5 a 6. Při těchto kombinacích byla produkce po 48 hodinách kultivace dvojnásobná.

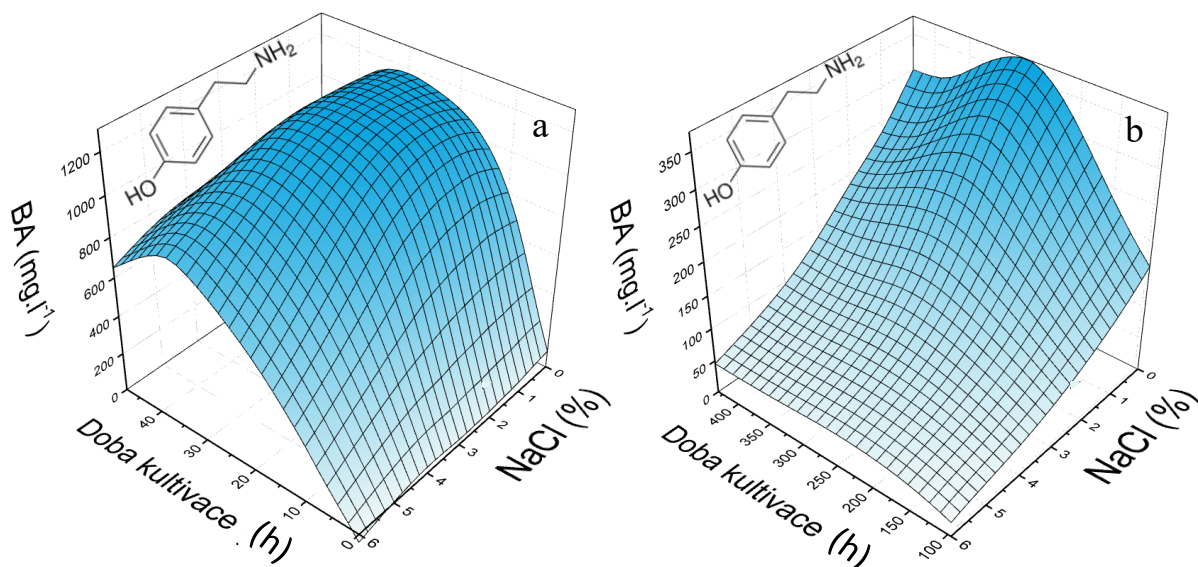
Dalším sledovaným BA byl putrescin. Na začátku kultivace množství putrescinu klesalo při všech sledovaných pH. Po 120 hodinách kultivace při $6 \text{ }^\circ\text{C}$ se spotřeba putrescinu zastavila pouze u pH 7 (PUT snížen o $4,0 \text{ mg.l}^{-1}$). Snížení putrescinu může být vysvětleno tím, že je využíván buď jako prekurzor polyaminů nebo jej buňky využívají jako zdroj energie (Pessione *et al.*, 2009; Gardini *et al.*, 2016). Při pH 5 byla spotřeba putrescinu po 360 hodinách kultivace nejvýraznější, množství putrescinu bylo sníženo o $10,0 \text{ mg.l}^{-1}$.

Spermidin byl produkován pouze při pH 7 ($6 \text{ }^\circ\text{C}$). Při vyšších teplotách se množství spermidinu v závislosti na pH výrazněji neměnilo. Další sledovaný polyamin, spermin spíše ubýval. K výraznějšímu poklesu při $30 \text{ }^\circ\text{C}$ došlo již po 12 hodinách kultivace. Redukce tohoto polyaminu byla nejvýraznější při pH 5, a to o $35,0 \text{ mg.l}^{-1}$, k úbytku sperminu docházelo i při pH 6 (o $16,0 \text{ mg.l}^{-1}$) a pH 7 (o $2,5 \text{ mg.l}^{-1}$).

Vliv NaCl na produkci BA u Enterococcus faecium M2C

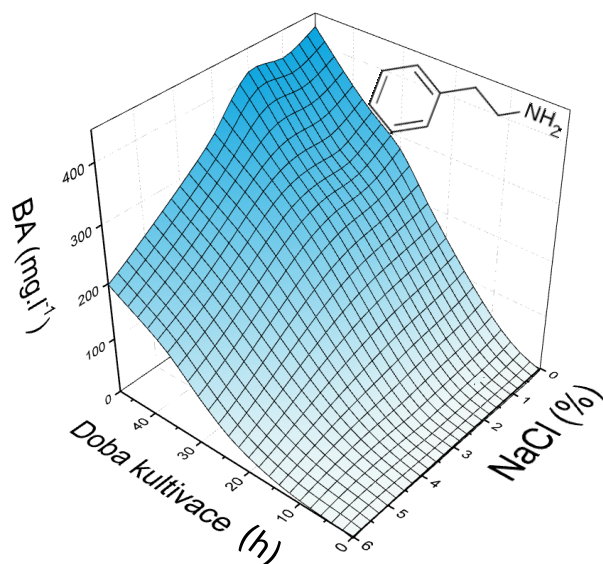
Nejprodukovanejším BA u *E. faecium* M2C byl tyramin (Obr. 15). Nejvyšší stanovené množství TYM produkované *E. faecium* M2C v závislosti na množství NaCl bylo při $30 \text{ }^\circ\text{C}$, po kultivaci 24 a 48 hodin, při koncentraci 0 – 1 % NaCl, a to $2200,1 \text{ mg.l}^{-1}$. Nárůst produkce tyraminu při optimální růstové teplotě ($30 \text{ }^\circ\text{C}$) probíhal do 35 hodin kultivace s nepatrným vlivem NaCl na jeho produkci. Při přidavku 6 % (w/v) NaCl byly konečné hodnoty vyprodukovaného tyraminu nižší, což bylo způsobeno potlačením růstu produkční mikroflóry (Obr. 13). Při $6 \text{ }^\circ\text{C}$ po 24 a 48 hodinách kultivace byla zjištěna nejvyšší produkce tyraminu v médiu s 1, 2 a 3 % NaCl $\leq 58,3 \text{ mg.l}^{-1}$. Po 288 hodinách kultivace byl sledován významný nárůst tyraminu v médiích s koncentrací NaCl do 2 % (w/v). Maximální produkce tyraminu byla po 312 hodinách kultivace při $12 \text{ }^\circ\text{C}$ při 2 % (w/v) NaCl $\leq 1552,2 \text{ mg.l}^{-1}$. Při $6 \text{ }^\circ\text{C}$ a po 336 hodinách kultivace došlo k vrcholu produkce tyraminu, při 2 % (w/v) NaCl $\leq 189,4 \text{ mg.l}^{-1}$. Vyšší hodnoty produkce byly dosaženy vždy v prostředí s nejnižším pH (pH 5). Po 360 hodinové kultivaci došlo k poklesu vyprodukovaného tyraminu o 10 % při všech sledovaných teplotách a při koncentracích NaCl do 2 %.

Hodnoty dalšího ze sledovaných BA histaminu během kultivace nepřesahovaly $\leq 2,5 \text{ mg.l}^{-1}$. Produkce histaminu nebyla významná při kultivaci 6°C ani při 30°C . Při 12°C byl sledován růst produkce histaminu po 312 hodinách kultivace na hodnotu až $9,8 \text{ mg.l}^{-1}$ a po 360 hodinách kultivace byla produkce histaminu $\leq 13,1 \text{ mg.l}^{-1}$.



Obr. 15. Kinetika produkce tyraminu při 30°C (a) a 6°C (b) u *Enterococcus faecium* M2C v závislosti na koncentraci NaCl.

Dalším ze sledovaných BA u *E. faecium* M2C byl fenyletylamin (Obr. 16; Příloha II, Obr. 3). Při všech sledovaných teplotách vykazoval kmen výraznou produkci tohoto aminu, která byla významně ovlivněna množstvím přidaného NaCl. Při 6°C i 12°C po 24 hodinové kultivaci bylo množství PHE vyprodukované při 6% NaCl nejnižší. Shodný vliv na produkci PHE měl přídavek NaCl při všech teplotách kultivace. Produkce PHE rostla se snižující se koncentrací NaCl. Při 12°C a po 360 hodinách kultivace bylo množství vyprodukovaného PHE při 6% NaCl $\leq 5,5 \text{ mg.l}^{-1}$, při 3% NaCl $\leq 147,3 \text{ mg.l}^{-1}$. Tyto uvedené hodnoty fenyletylaminu byly také významně ovlivněny pH. Při teplotě kultivace 30°C po 24 hodinách bylo množství fenyletylaminu snižováno v závislosti na rostoucí koncentraci NaCl, avšak maximální produkce PHE byla zjištěna v prostředí s 2% NaCl ($\leq 451,3 \text{ mg.l}^{-1}$), kdy i po 48 hodinách kultivace byl tento trend zachován.



Obr. 16. Kinetika produkce fenyletylaminu při 30 °C u *Enterococcus faecium* M2C v závislosti na koncentraci NaCl.

Snížení obsahu vyprodukovaného kadaverinu v závislosti na koncentraci NaCl probíhalo při kultivační teplotě 30 °C do 24 hodin (Příloha II, Obr. 4). Po tomto čase se redukce kadaverinu zpomalovala, či zastavila v závislosti na koncentraci NaCl. Při koncentraci 6 % NaCl bylo snižování koncentrace kadaverinu v médiu nejvýraznější. Během kultivace při 6 °C se množství kadaverinu snižovalo. Tento jev nebyl výrazněji ovlivněn koncentrací přidaného NaCl. Obsah kadaverinu v médiu klesal do 250 hodiny kultivace. Po tomto čase začalo docházet k velmi nízké produkci kadaverinu na hodnoty $\leq 2,0 \text{ mg.l}^{-1}$.

Dalším ze sledovaných BA u kmene *E. faecium* M2C byl putrescin (Příloha II, Obr. 5a). Změny produkce putrescinu v závislosti na množství NaCl byly významné pouze během kultivace při 30 °C. Rostoucí trend produkce putrescinu byl patrný do 40. hodiny kultivace. Po tomto čase došlo při koncentraci NaCl $\leq 3 \%$ ke snížení obsahu putrescinu o více jak 50 %. Koncentrace NaCl nad 3 % významně ovlivňovaly růstovou křivku *Enterococcus faecium* M2C, což se projevilo i prostřednictvím snížení produkce putrescinu do 40. hodiny kultivace. Po této době byl viditelný výrazný úbytek putrescinu v růstovém prostředí. S množstvím NaCl se přímo úměrně snižoval i rozdíl v úbytku. Produkce putrescinu v závislosti na koncentraci NaCl byla také velmi významně ovlivněna hodnotou pH, kdy při pH 7 bylo množství vyprodukovaného putrescinu až dvojnásobné. Při 6 °C a po 336 a 360 hodinách kultivace bylo vyprodukované množství při 6 % NaCl $\leq 15,7 \text{ mg.l}^{-1}$, a při 0, 1 a 2 % NaCl bylo množství putrescinu $\leq 4,7 \text{ mg.l}^{-1}$.

Vliv přístupu kyslíku na produkci BA u Enterococcus faecium M2C

Produkce BA *in vitro* byla dále sledována v závislosti na aerobním a anaerobním prostředí. Anaerobní prostředí, nebo použití ochranné atmosféry, je nedílnou součástí výroby a zpracování masa. Pro srovnání produkce byla

vybrána reprezentativní data ve stejném čase odběru (24, 48 a 360 nebo 336 hodin) pro všechny podmínky kultivace.

Aerobní/anaerobní prostředí v prvních hodinách kultivace při 30 °C neovlivnilo produkci tyraminu. Po 24 i 48 hodinách kultivace množství TYM u *E. faecium* M2C nepřesáho při 6 i 12 °C v prostředí s i bez přístupu kyslíku $\leq 22,2 \text{ mg.l}^{-1}$. K výrazným změnám v produkci tyraminu docházelo za anaerobních podmínek při 30 °C po 24 hodinách, kdy množství vyprodukovaného tyraminu bylo $\leq 1003,9 \text{ mg.l}^{-1}$, avšak při aerobní kultivaci pouze $\leq 657,1 \text{ mg.l}^{-1}$. Při 30 °C a 48 hodinách za anaerobních podmínek byly hodnoty produkce TYM $\leq 1198,8 \text{ mg.l}^{-1}$ téměř totožné jako po 24 hodinách, avšak při aerobní kultivaci produkce stále rostla až na hodnoty $\leq 936,0 \text{ mg.l}^{-1}$.

Maximální vyprodukované množství fenyletylaminu u *E. faecium* M2C po 12 hodinách kultivace bylo $\leq 2,0 \text{ mg.l}^{-1}$. Aerobní ani anaerobní prostředí nemělo výraznější vliv na produkci či asimilaci PHE. Při kultivaci ve 12 °C byla produkce PHE po 360 hodinách navýšena u anaerobní kultivace na hodnotu $\leq 88,8 \text{ mg.l}^{-1}$.

Dalším ze sledovaných biogenních aminů u *E. faecium* M2C byl putrescin. Maximální vyprodukované množství bylo po 12 hodinách kultivace, při pH 7 a 30 °C za anaerobní kultivace $\leq 19,0 \text{ mg.l}^{-1}$. Za stejných podmínek při aerobní kultivaci byla produkce nižší, dosahovala maximálně $13,6 \text{ mg.l}^{-1}$. Další kultivací již nedocházelo k navýšení množství produkovaného putrescinu vlivem aerobního či anaerobního prostředí.

Kadaverin byl po 24 i 48 hodinách kultivace *E. faecium* produkován za anaerobních podmínek nepatrně více než za aerobních podmínek. Po 24 i 48 hodinách kultivace bylo množství kadaverinu u kmene *E. faecium* M2C při 6 °C za anaerobních podmínek $\leq 2,7 \text{ mg.l}^{-1}$ a za aerobních podmínek $\leq 2,1 \text{ mg.l}^{-1}$.

Významnější změny v závislosti na přístupu O_2 u *E. faecium* M2C a jeho produkce histaminu byly pozorovány až po 360 hodinách kultivace, při pH 7. V anaerobních podmínkách byla produkce více než 1,5x vyšší než za podmínek aerobních ($\text{HIS}_{\text{AN}} \leq 9,5 \text{ mg.l}^{-1}$; $\text{HIS}_{\text{A}} \leq 5,9 \text{ mg.l}^{-1}$).

Výrazný vliv O_2 na sledované polyaminy spermidin a spermin u *E. faecium* M2C byl pozorován po 360 hodinách kultivace. Produkce při 6 °C byla u spermidinu za anaerobních podmínek na hodnotách $14,7 \text{ mg.l}^{-1}$ a u kultivace za aerobních podmínek dosahovala produkce $\leq 18,0 \text{ mg.l}^{-1}$. Anaerobní kultivace měla za následek snižování produkce sperminu ve všech kombinacích faktorů. Při teplotě 30 °C byla produkce sperminu i sperminu $\leq 2,0 \text{ mg.l}^{-1}$ ve všech časech odběrů bez vlivu aerobního či anaerobního prostředí.

5.3.2 *Enterococcus faecium* 5BM1

Dekarboxylázová aktivita bakteriálního kmene *Enterococcus faecium* 5BM1 byla sledována za stejných podmínek jako u kmene *E. faecium* M2C. Nejvyšší

maximální hodnoty a podmínky, při kterých bylo těchto hodnot dosaženo, jsou uvedeny v Tab. 8.

Tab. 8. Maximální produkce BA u *Enterococcus faecium* 5BM1.

| <i>Enterococcus faecium</i> 5BM1 | BA mg.l ⁻¹ | Teplota (°C) | pH | NaCl (w/v) | an/aerobně |
|----------------------------------|-----------------------|--------------|----|------------|------------|
| tyramin | 1729,7 | 30 | 5 | 0 | AN |
| fenyletylamin | 924,6 | 30 | 5 | 2 | AN |
| histamin | 2,6 | 30 | 5 | 0 | A |
| tryptamin | 23,2 | 30 | 5 | 0 | AN |
| putrescin | 24,3 | 30 | 7 | 2 | AN |
| kadaverin | 17,8 | 6 | 6 | 0 | AN |
| spermin | 166,9 | 30 | 7 | 3 | AN |
| spermidin | 4,5 | 30 | 5 | 1 | A |

Vzhledem k tomu že výsledky i trendy zjištěné u tohoto kmene byly statisticky významně shodné či obdobné ($P < 0,05$) jako u kmene *Enterococcus faecium* M2C není jim již dále věnována pozornost.

5.3.3 *Enterococcus* sp. M5a

Tato část práce přispívá k objasnění produkce BA u *Enterococcus* sp. M5a a vlivu faktorů na jím produkované BA. Nejvyšší maximální hodnoty a podmínky, při kterých bylo těchto hodnot dosaženo, jsou uvedeny v Tab. 9.

Tab. 9. Maximální produkce BA u *Enterococcus* sp. M5a.

| <i>Enterococcus</i> sp. M5a | BA mg.l ⁻¹ | Teplota (°C) | pH | NaCl (w/v) | an/aerobně |
|-----------------------------|-----------------------|--------------|----|------------|------------|
| tyramin | 1700,0 | 30 | 7 | 1 | AN |
| fenyletylamin | 728,6 | 30 | 5 | 0 | AN |
| histamin | 13,2 | 6 | 6 | 0 | AN |
| tryptamin | 18,3 | 30 | 7 | 6 | A |
| putrescin | 18,6 | 30 | 5 | 1 | AN |
| kadaverin | 42,7 | 12 | 7 | 3 | A |
| spermin | 131,7 | 30 | 5 | 6 | A |
| spermidin | 4,0 | 12 | 7 | 3 | A |

Vliv teploty na produkci BA u *Enterococcus* sp. M5a

Nejvýznamnějším BA dle rozsahu produkce byl opět tyramin. Maximální vyprodukované množství bylo po 12 hodinách kultivace při 30 °C (1700,0 mg.l⁻¹). Největší produkce tyraminu byla při 30 °C, s klesající teplotou se produkce významně snižovala. Množství TYM po 48 hodinové kultivaci

Enterococcus sp. M5a bylo při 6 i 12 °C řádově podobné, při 30 °C v závislosti na dalších testovaných faktorech v rozmezí 897,9–1700,0 mg.l⁻¹. Po 15 dnech kultivace bylo výrazné zvýšení tyraminu pouze při kultivaci 12 °C (1143,0 mg.l⁻¹).

Dalším ze sledovaných BA u *Enterococcus* sp. M5a byl PHE. Po 24 hodinové kultivaci, při teplotě 6 a 12 °C bylo detekované množství PHE pod 2 mg.l⁻¹ a při 30 °C byla produkce PHE v širokém rozmezí (34,6–525,7 mg.l⁻¹). Produkce PHE se při teplotách 6 a 12 °C výrazně nenavýšovala. Po 48 hodinové kultivaci a 30 °C byla produkce PHE ≤728,5 mg.l⁻¹. K výraznějšímu navýšení produkce fenyletylaminu došlo pouze při 12 °C a to až po 432 hodinách kultivace (PHE≤36,9 mg.l⁻¹).

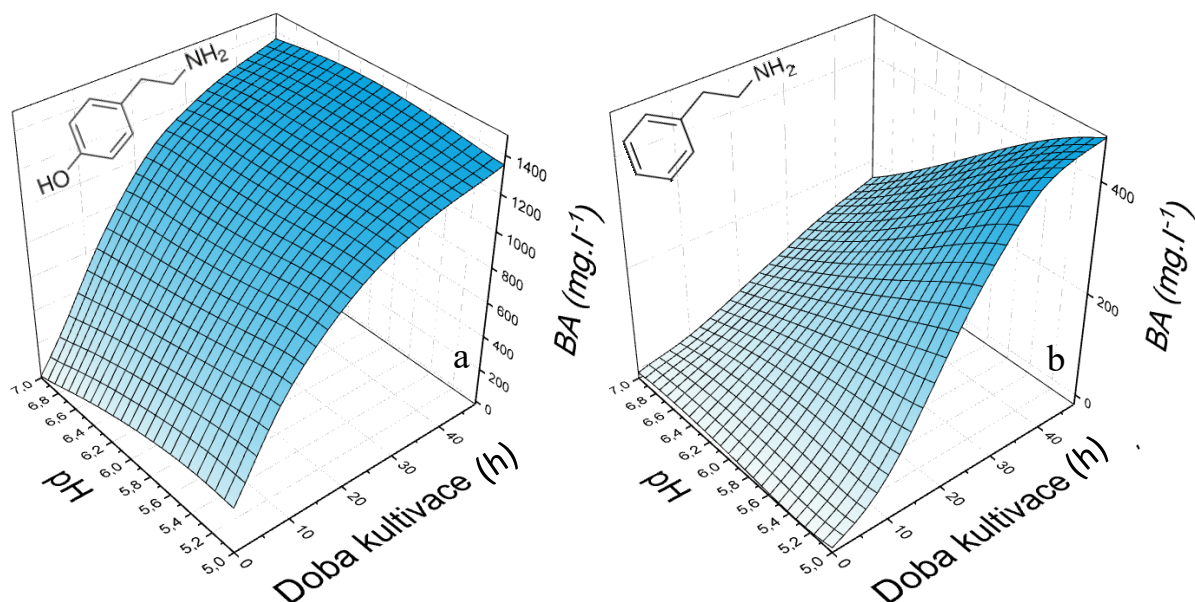
Putrescin byl do 48 hodin kultivace inokulovaného média kmenem *Enterococcus* sp. M5a produkován při 6, 12 i 30 °C v rozsahu 4,1–7,4 mg.l⁻¹. Nevyšší množství putrescinu 18,6±0,2 mg.l⁻¹ bylo vyprodukováno při 30 °C po 48 hodinách kultivace. Po 360 hodinách kultivace se hodnoty u teplot 6 a 12 °C sledovaného putrescinu nezvyšovaly.

Histamin a kadaverin byly ve všech časech kultivace produkovány pod 2 mg.l⁻¹. Produkce byla navýšena až po 360 hodinách při 6 °C u CAD na hodnoty 13,8±0,1 mg.l⁻¹, u HIS na hodnoty 13,2±0,1 mg.l⁻¹. Při 12 °C byl produkován pouze kadaverin v koncentraci 42,6±0,3 mg.l⁻¹.

Polyamin spermidin byl produkován po 24 hodinové kultivaci při teplotě 6, 12 a 30 °C v množství ≤ 2 mg.l⁻¹. Produkce SPD neměla zvyšující se charakter při 48 ani 360 hodinové kultivaci. Oproti tomu produkce sperminu u sledovaného kmene *Enterococcus* sp. M5a pozorována byla. Po 24 hodinové kultivaci při 6 i 12 °C bylo detekované množství SPM pod 11,2±0,1 mg.l⁻¹ a při 30 °C bylo množství SPM v širokém rozmezí 2,0 – 7,0 mg.l⁻¹. V prostředí 6 a 12 °C se pohybovala produkce po 48 hodinách kultivace v rozmezí 7,9–21,6 mg.l⁻¹. V dalších dnech se produkce sperminu nezvyšovala, naopak spermin byl postupně spotřebováván.

Vliv pH na produkci BA u *Enterococcus* sp. M5a

Při 6 i 12 °C byl trend produkce tyraminu v závislosti na pH podobný (Příloha II, Obr. 6). V rozmezí hodnot pH 5 – 6 byla produkce nejvýznamnější. Maximální produkce byla 1012,1±12,9 mg.l⁻¹ při 12 °C a při 6 °C dosahovala 199,8±3,9 mg.l⁻¹. Během kultivace při 30 °C nebyl vliv pH na produkci tyraminu příliš patrný (Obr. 17). Při pH 5–7 byla produkce 1455,8±33,7 mg.l⁻¹.



Obr. 17. Kinetika produkce tyraminu (a) a fenyletylaminu (b) při 30 °C u *Enterococcus* sp. M5a v závislosti na pH.

Velmi důležitým faktorem při produkci fenyletylaminu byla s pH i teplota. Při 6 a 12 °C byla největší produkce PHE při pH 6 (Příloha II, Obr. 6). Toto pH se dá u *Enterococcus* sp. M5a považovat za optimální pro produkci PHE. Při snížení nebo zvýšení pH byl patrný výrazný úbytek PHE v závislosti na čase kultivace. Při pH 6 i 7 byla detekována koncentrace PHE během celé doby kultivace $\leq 2,0 \text{ mg.l}^{-1}$. Při 30 °C však produkce fenyletylaminu rostla se snižujícím se pH až k hodnotě $729 \pm 3,6 \text{ mg.l}^{-1}$ po 48 hodinové kultivaci. Tato hodnota produkce byla oproti pH 7 čtyřnásobná.

Změna pH neměla vliv na produkci kadaverinu při teplotách 6 a 12 °C u *Enterococcus* sp. M5a (Příloha II, Obr. 7). Při 30 °C a pH 7 množství kadaverinu rostlo velmi mírně. V kyselějším prostředí byla produkce významně ovlivněna růstem sledovaného kmene (Obr. 13). Po 48 hodinách kultivace se množství produkovaného kadaverinu zvyšovalo. Významnější produkce byla zjištěna v kyselějším prostředí. Při teplotách 6 a 12 °C byla produkce po 360 hodinách $5 \pm 0,1 \text{ mg.l}^{-1}$.

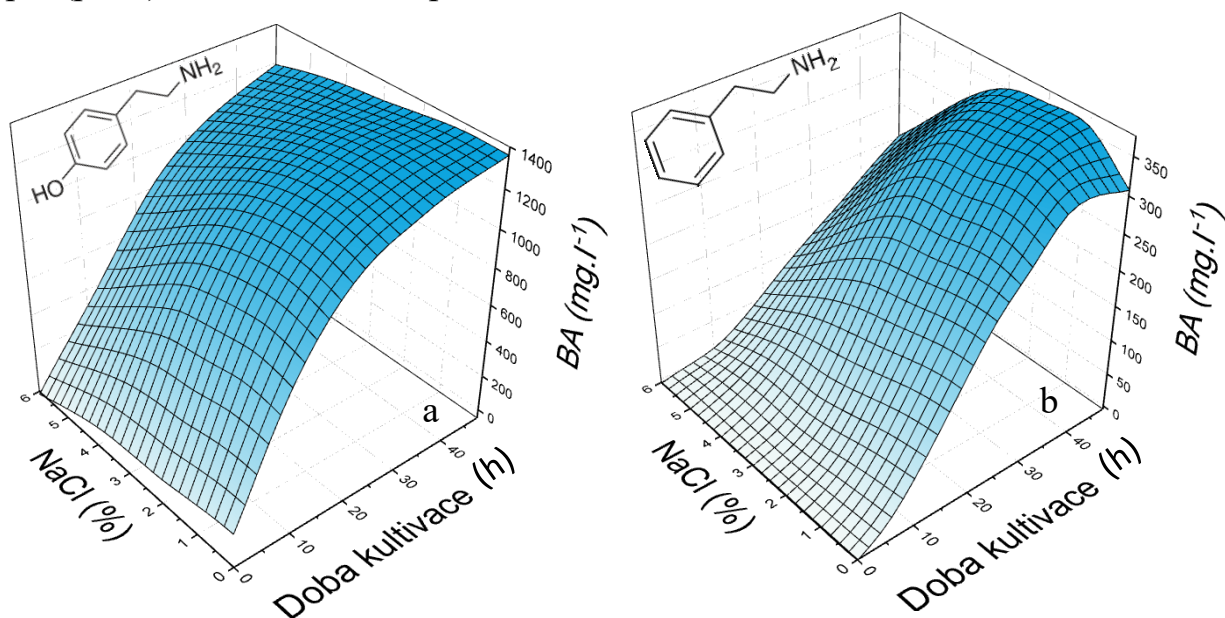
Dalším BA produkovaným *Enterococcus* sp. M5a byl putrescin. Při teplotách 6 a 12 °C nebyl významný rozdíl v produkci putrescinu ani za sledovaných hodnot pH (Příloha II, Obr. 8). Při 30 °C byla zjištěna velmi nízká produkce, která byla mírně ovlivněna změnou pH.

Produkce polyaminu sperminu se při teplotách 6 a 12 °C v závislosti na pH výrazně neměnilo (Příloha II, Obr. 9). K mírné změně došlo po dvouset hodinové kultivaci při pH 5, kdy vzrostlo množství sperminu 2,5 násobně oproti médiím s pH 7, kde se nárůst produkce zastavil. Při 30 °C nedošlo vlivem pH k ovlivnění produkce sperminu. Je pravděpodobné, že se množství sperminu při kyselějším pH snižuje a spermin se tedy přeměňuje pomocí spermintransferáz a polyaminoxidáz. Koncentrace sperminu je při dekarboxylačních reakcích

v buňkách desetkrát vyšší než koncentrace putrescinu (Chong *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2017).

Vliv NaCl na produkci BA u *Enterococcus* sp. M5a

Nejvyšší stanovené množství TYM vyprodukované *Enterococcus* sp. M5a bylo sledováno v médiu po kultivaci při 30 °C po 24 a 48 hodinách, při koncentraci 1 a 2 % (w/v) NaCl, kdy byl tyramin detekován v množství $1389,1 \pm 27,1 \text{ mg.l}^{-1}$. Z grafu (Obr. 16) je patrné, že koncentrace NaCl nad 5 % (w/v) inhibovala produkci tyraminu, což patrně souvisí s inhibicí růstu sledovaného kmene. Při 12 °C po 400 hodinách kultivace byla nejvyšší produkce tyraminu v médiu s přidavkem NaCl o koncentraci 1 % (w/v), $539,6 \pm 9,2 \text{ mg.l}^{-1}$. Ve stejném čase odběru byla při 6 °C detekována nejvyšší produkce opět v médiu s 1% (w/v) přidavkem NaCl ($161,8 \pm 2,2 \text{ mg.l}^{-1}$) (Příloha II, Obr. 10). Vyšší hodnoty produkce byly dosaženy vždy v prostředí s nejnižším pH (pH 5) a za anaerobních podmínek.



Obr. 16. Kinetika produkce tyraminu (a) a fenyletylaminu (b) při 30 °C u *Enterococcus* sp. M5a v závislosti na koncentraci NaCl.

Při 6 °C nebyla pozorována produkce fenyletylaminu. Při 12 °C měla produkce při zvyšující se koncentraci NaCl klesající tendenci. Při 30 °C produkce PHE rostla s klesající koncentrací přidaného NaCl. V médiích s koncentrací > 3 % (w/v) byl jasně znatelný úbytek PHE (Obr. 16). Maximální produkce PHE byla detekována v médiu s přidavkem NaCl 3 % (w/v), konkrétně $365,2 \pm 9,1 \text{ mg.l}^{-1}$.

Produkce kadaverinu kmenem M5a nebyla významně ovlivněna množstvím přidaného NaCl (Příloha II, Obr. 11). Vzhledem k tomu, že kadaverin je produkován převážně G- bakteriemi (Buňková *et al.*, 2010), byla jeho produkce nízká (do $7,0 \pm 0,1 \text{ mg.l}^{-1}$).

Putrescin byl při všech sledovaných koncentracích NaCl u všech teplot kultivace produkován omezeně. Při 30 °C lze pozorovat podpurný vliv na produkci putrescinu při koncentracích NaCl 2 – 4 % (w/v), kdy bylo pozorováno mírné navýšení produkce putrescinu. Nicméně rozsah samotné produkce není výrazný.

Vliv přístupu kyslíku na produkci BA u Enterococcus sp. M5a

Dalším sledovaným faktorem ovlivňujícím produkci biogenních aminů u *Enterococcus sp. M5a in vitro* byl přístup O₂.

Maximální vyprodukované množství tyraminu bylo pozorováno po 12 hodinách kultivace při 30 °C za anaerobních podmínek $\leq 686,3 \text{ mg.l}^{-1}$ a za přístupu O₂ $\leq 548,8 \text{ mg.l}^{-1}$. Množství TYM po 24 hodinové kultivaci u *Enterococcus sp. M5a* bylo při nižších teplotách za aerobních podmínek třikrát vyšší než za anaerobní kultivace. Pozitivní vliv aerobního prostředí na produkci tyraminu byl jednoznačně patrný pouze při teplotě 6 °C. Při kultivační teplotě 12 °C lze sledovat trend opačný. Po 48 hodinové kultivaci bylo množství vyprodukovaného TYM při 6 °C za aerobních podmínek vyšší než za anaerobních. Při kultivační teplotě 12 i 30 °C byl trend produkce tyraminu v závislosti na O₂ opačný. Při 12 °C byla vždy produkce za anaerobních podmínek vyšší (TYM_{AN} $\leq 53,7 \text{ mg.l}^{-1}$; TYM_A $\leq 43,2 \text{ mg.l}^{-1}$), 30 °C (TYM_{AN} $\leq 1407,3 \text{ mg.l}^{-1}$; TYM_A $\leq 1327,5 \text{ mg.l}^{-1}$). Po 360 hodinové kultivaci bylo při 6 i 12 °C množství vyprodukovaného TYM vyšší v anaerobním prostředí.

Při 30 °C bylo po 12 hodinách kultivace za anaerobních podmínek již patrné navýšení produkce o více jak 30 % PHE a i po další kultivaci byl trend s aerobní kultivací shodný. Při 12 °C byla do 300 hodiny kultivace produkce bez závislosti na množství O₂ shodná. Po 300 hodinách bylo možné sledovat rychlejší trend produkce u anaerobní kultivace, a to trojnásobně vyšší. Při sledované teplotě 6 °C byla produkce PHE v závislosti na O₂ pod mezí detekce.

Kadaverin byl po 24 i 48 hodinách kultivace u *Enterococcus sp. M5a* při 6 °C bez vlivu O₂ na produkci. Při 12 °C byla produkce výraznější u anaerobní kultivace o 10 % (CAD_{AN} $\leq 5,4 \text{ mg.l}^{-1}$). Po 360 hodinách kultivaci bylo množství vyprodukovaného CAD při 6 i 12 °C v aerobním prostředí nevýznamné. Při 30 °C nebyla nalezena korelace mezi množstvím O₂ a produkcí kadaverinu.

Významnější změny v závislosti na přístupu O₂ u *Enterococcus faecium M5a* a jeho produkce histaminu byla pozorována při 6 °C po 144 hodinách kultivace, při pH 7 (HIS_{AN} $\leq 5,5 \text{ mg.l}^{-1}$; HIS_A $\leq 4,5 \text{ mg.l}^{-1}$); po kultivaci 360 hodin (HIS_{AN} $\leq 10,8 \text{ mg.l}^{-1}$; HIS_A $\leq 10,3 \text{ mg.l}^{-1}$); po kultivaci po 432 hodinách byla produkce histaminu nejvyšší (HIS_{AN} $\leq 13,2 \text{ mg.l}^{-1}$).

Vliv O₂ na spermidin nebyl pozorován (SPD $\leq 4,0 \text{ mg.l}^{-1}$), avšak změny v produkci sperminu u *Enterococcus sp. M5a* pozorovány byly. Produkce sperminu při 6 °C po 48 hodinách při pH 7 byla za anaerobních podmínek $\leq 19,4 \text{ mg.l}^{-1}$; v přítomnosti kyslíku $\leq 12,1 \text{ mg.l}^{-1}$. Anaerobní kultivace měla vliv na

zvyšování produkce sperminu při všech kombinacích faktorů. Po 144 hodinách kultivace při 6 °C byla hodnota spermidinu snížena výrazněji v anaerobním prostředí. Při 12 °C po 48 hodinách byla produkce polyaminů výrazně vyšší za anaerobních podmínek. Při teplotě 30 °C v závislosti na přístupu O₂ nedošlo k významnému rozptylu hodnot v produkci polyaminů.

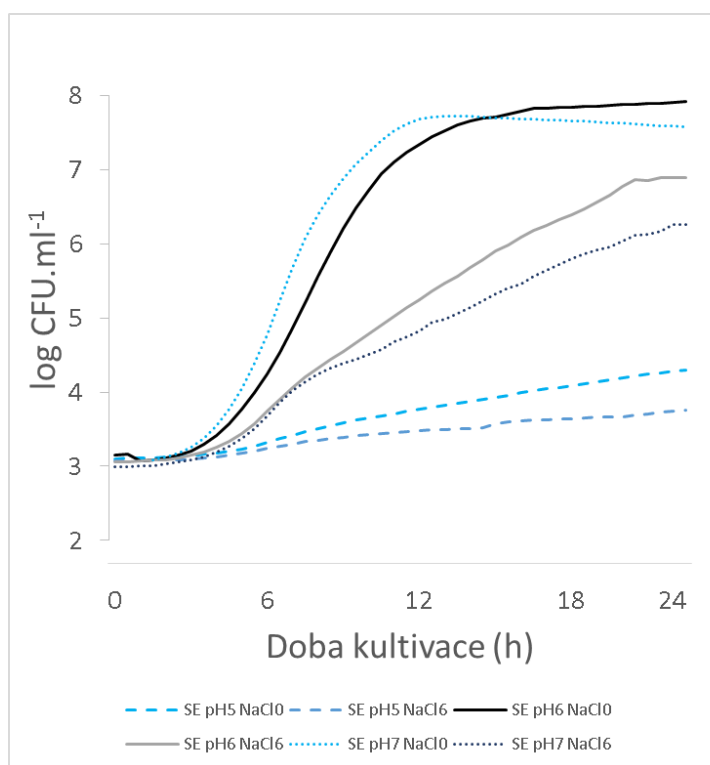
5.3.4 *Staphylococcus epidermidis* 21/2

Výsledky Experimentu I poukázaly na významný potenciál produkce BA *in vitro* u skupiny kmenů rodu *Staphylococcus*, které byly izolovány ze pstruha potočního. V tomto a dalších subexperimentech Experimentu II je tedy věnován prostor izolátům stafylokoků. Sledované faktory ovlivňující růst a produkci BA kmeny rodu *Staphylococcus* byly totožné s faktory sledovanými u enterokoků (kapitola 5.3.1 – 5.3.3; pH, teplota, NaCl, aerobní a anaerobní prostředí). Prvním ze sledovaných stafylokoků byl *Staphylococcus epidermidis* 21/2. Nejvyšší maximální hodnoty a podmínky, při kterých bylo těchto hodnot dosaženo, jsou uvedeny v Tab. 10.

Tab. 10. Maximální produkce BA u *Staphylococcus epidermidis* 21/2.

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

Délka lag fáze se u kmene *S. epidermidis* 21/2 prodlužovala s klesající se teplotou a snižujícím se pH. Koncentrace NaCl 6 % (w/v) prodloužila lag fázi až dvojnásobně. Při stejném pH, ale při nižší teplotě, byl růst *S. epidermidis* 21/2 velmi zpomalen. Jak je patrné z Obr. 17, byla lag fáze *S. epidermidis* 21/2 při 6 % (w/v) NaCl v růstovém prostředí významně prodloužena. Mnohem výraznější vliv na růst buněk mělo pH. *S. epidermidis* 21/2 vykazoval podobné chování při všech sledovaných faktorech.



Obr. 17. Růstová křivka *Staphylococcus epidermidis* 21/2 (SE) in vitro při pH 5, 6 a 7, 30 °C, za an/aerobních podmínek s přidavkem mezních kultivačních koncentrací 0 a 6 % (w/v) NaCl.

Vliv teploty na produkci BA u *Staphylococcus epidermidis* 21/2

Nejvíce produkovaným BA byl i u tohoto kmene, podobně jako u enterokoků, tyramin. Stanovená množství tyraminu po 24 hodinové kultivaci byla u *S. epidermidis* 21/2 při 6 °C v rozmezí 96,0–756,7 mg.l⁻¹, při 12 °C 275,9–870,1 mg.l⁻¹ a při 30 °C 1190,0–1511,2 mg.l⁻¹. Po 48 hodinové kultivaci bylo množství vyprodukovaného tyraminu při 6 °C 331,7–756,9 mg.l⁻¹, při 12 °C 312,6–1169,4 mg.l⁻¹ a při 30 °C v rozmezí 1094,1–1658,6 mg.l⁻¹. Po 360 hodinách bylo množství tyraminu při 6 i 12 °C ≤1000,0 mg.l⁻¹. Nejvyšší množství tyraminu bylo vyprodukováno při 30 °C po 48 hodinách kultivace (1792,9±18,9 mg.l⁻¹).

Obsah fenyletylaminu se po 24 hodinové kultivaci *S. epidermidis* 21/2 pohyboval při teplotě 6 °C v rozmezí 2–148,9 mg.l⁻¹, při 12 °C 54,0–192,6 mg.l⁻¹ a při 30 °C bylo množství produkovaného PHE v rozmezí 226,8–780,2 mg.l⁻¹. Produkce PHE byla nejvyšší po 48 hodinové kultivaci při 30 °C (≤780,2 mg.l⁻¹) bez ohledu na ostatní faktory. V prostředí 6 a 12 °C se pohybovala produkce v druhém dni v hodnotách 93,1–194,6 mg.l⁻¹. K výraznému navýšení produkce fenyletylaminu nedošlo při nižších teplotách ani po 360 hodinách kultivace (≤200,0 mg.l⁻¹).

Produkce putrescinu se po 24 hodinách kultivace *S. epidermidis* 21/2 při 6 °C pohybovala v rozmezí 3,0–5,2 mg.l⁻¹, při 12 °C v rozmezí 2,9–8,8 mg.l⁻¹ a při 30 °C 7,9–14,3 mg.l⁻¹. Po 48 hodinové kultivaci se množství produkovaného

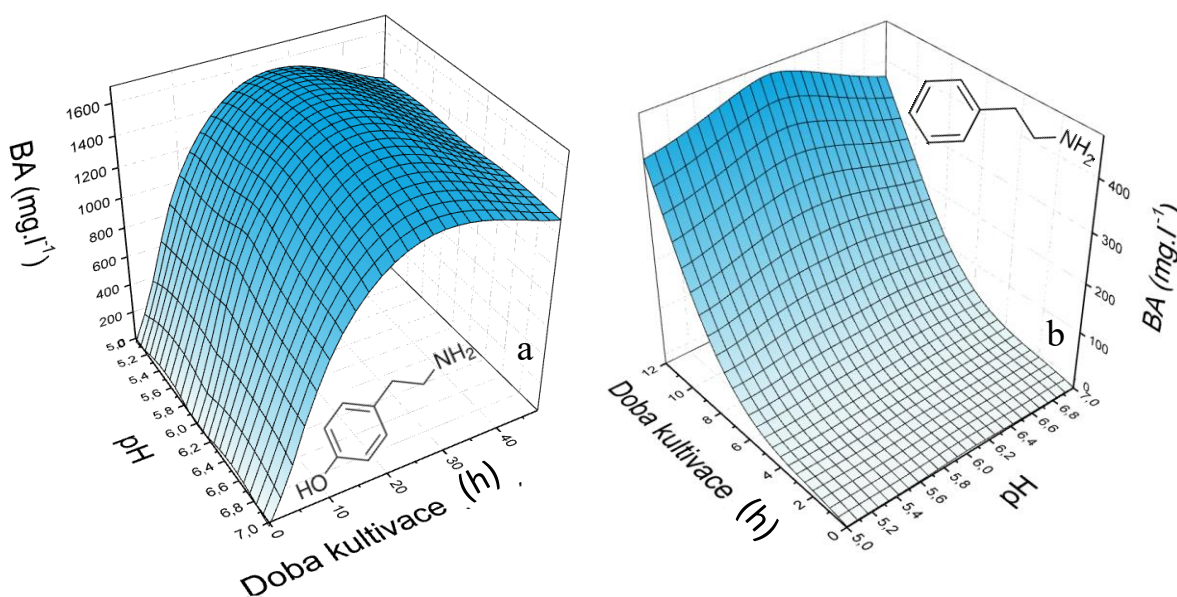
putrescinu výrazně neměnilo. Produkce byla nevýznamná jak při 6 i 12 °C ($\leq 8,0$ mg.l⁻¹), tak i při 30 °C ($12,4 \pm 0,2$ mg.l⁻¹). Po 360 hodinách kultivace při 6 a 12 °C byly hodnoty BA v rozmezí 2,0–4,5 mg.l⁻¹.

Histamin a kadaverin byly ve většině případů kultivace produkovány pod hodnotami 1–3 mg.l⁻¹. V čase se koncentrace histaminu a kadaverinu příliš neměnily. Výjimkou byla produkce za anaerobních podmínek a při pH 5. Při těchto kombinacích byla produkce kadaverinu při 30 °C po 12 hodinách kultivace 14,1 mg.l⁻¹, při 12 °C po 360 hodinách 17,6 mg.l⁻¹.

Polyamin spermidin byl produkován po 24 hodinové kultivaci při teplotách 6, 12 a 30 °C v nízkých koncentracích ($\leq 4,0$ mg.l⁻¹). Produkce SPD měla slabý růstový trend pouze při 30 °C k maximální hodnotě 10,8 mg.l⁻¹. Spermin byl produkován při teplotách 6 °C i 12 °C. Produkce po 24 a 48 hodinové kultivaci při 30 °C nepřesahovala hodnotu: $\leq 4,9$ mg.l⁻¹. Po 360 hodinách bylo množství sperminu při 6 i 12 °C $\leq 7,6$ mg.l⁻¹.

Vliv pH na produkci BA u *Staphylococcus epidermidis* 21/2

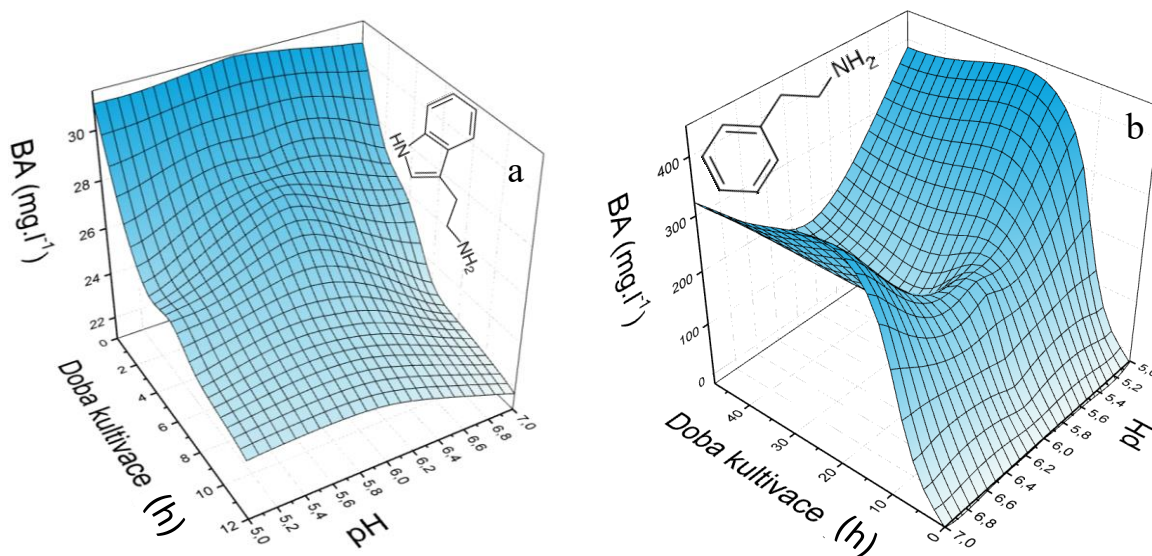
U nejvyššího stanoveného množství TYM, produkováného kmenem *S. epidermidis* 21/2 nebyl sledován výraznější vliv pH (Obr. 18a), při žádné ze sledovaných teplot kultivace. U fenyletylaminu lze poznamenat, že při 30 °C bylo pro produkci nejvýznamnější pH 6. Při ostatních sledovaných teplotách byl vliv pH na produkci obdobný.



Obr. 18. Kinetika produkce tyraminu (a) a fenyletylaminu (b) při 30 °C u *Staphylococcus epidermidis* 21/2 v závislosti na pH.

Dalším sledovaným BA byl tryptamin (Obr. 19a). Množství tryptaminu bylo v závislosti na pH při 30 °C redukováno nejvýznamněji při pH 5. Redukce tryptaminu rostla s rostoucím pH, kdy při pH 7 dosahoval úbytek až 27 %.

Fenyletylamin byl nejvýznamněji produkován při pH 5. Při pH 6 byla jeho tvorba nejnižší (Obr. 19b). V médiu s pH 7 se produkce opět zvyšovala. Při 30 °C byla nejvyšší hodnota produkovaného fenyletylaminu při pH 5 ($405,2 \pm 12,0$ mg.l⁻¹). Při teplotách nižších byl zaznamenán úbytek produkce v závislosti na klesajícím pH, kdy při pH 5 a při 6 °C byla detekována nejvyšší produkce po 360 hodinách kultivace $143,5 \pm 2,9$ mg.l⁻¹.

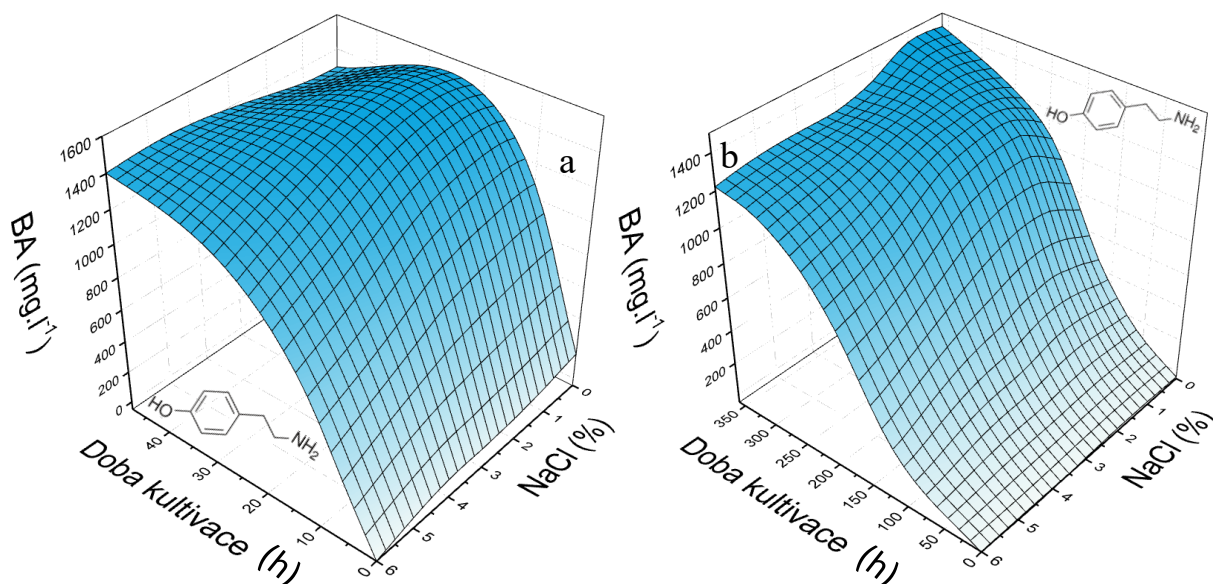


Obr. 19. Kinetika produkce tryptaminu (a) a fenyletylaminu (b) při 30 °C u *Staphylococcus epidermidis* 21/2 v závislosti na pH.

Histamin a kadaverin byly ve většině případů kultivace při teplotách 6 a 12 °C produkovány pod 3 mg.l⁻¹. V čase se koncentrace histaminu a kadaverinu příliš neměnila. U kadaverinu byla mimo tento trend kultivace při 30 °C, kde bylo patrné snižování množství kadaverinu v médiu během kultivace (Příloha II, Obr. 29). Toto snižování bylo nejvýznamnější v oblasti pH 5 a pH 7. Úbytek sperminu byl patrný při 30 °C. V oblasti pH 6 bylo patrné následné zvýšení koncentrace sperminu (Příloha II, Obr. 29), a to na hodnotu $5,8 \pm 0,1$ mg.l⁻¹. Ostatní hodnoty pH neumožnily produkci sperminu.

Vliv NaCl na produkci BA u Staphylococcus epidermidis 21/2

Nejvyšší množství TYM produkované *S. epidermidis* 21/2 v závislosti na množství NaCl bylo stanoveno v médiu po 24 hodinové kultivaci při 30 °C v rozsahu koncentrací NaCl 0 – 2 % (w/v), a to $1581,1 \pm 22,2$ mg.l⁻¹. Po 48 hodinách kultivace v médiu s přidavkem 5 % (w/v) NaCl dosahovala koncentrace TYM $1400,4 \pm 22,0$ mg.l⁻¹. Při 30 °C probíhala produkce tyraminu do 35 hodiny kultivace a to s výrazným vlivem NaCl (Obr. 20). Při 6 °C po 24 a 48 hodinách kultivace byla nejvyšší produkce v médiu s 1, 2 a 3% (w/v) NaCl $\leq 39,5$ mg.l⁻¹. Po 360 hodinách kultivace byl sledován významný nárůst tyraminu v prostředí bez NaCl nebo s 1 % (w/v) NaCl. Maximální produkce TYM byla detekována právě při 1% (w/v) přidavku NaCl ($\leq 1512,6 \pm 65,1$ mg.l⁻¹).

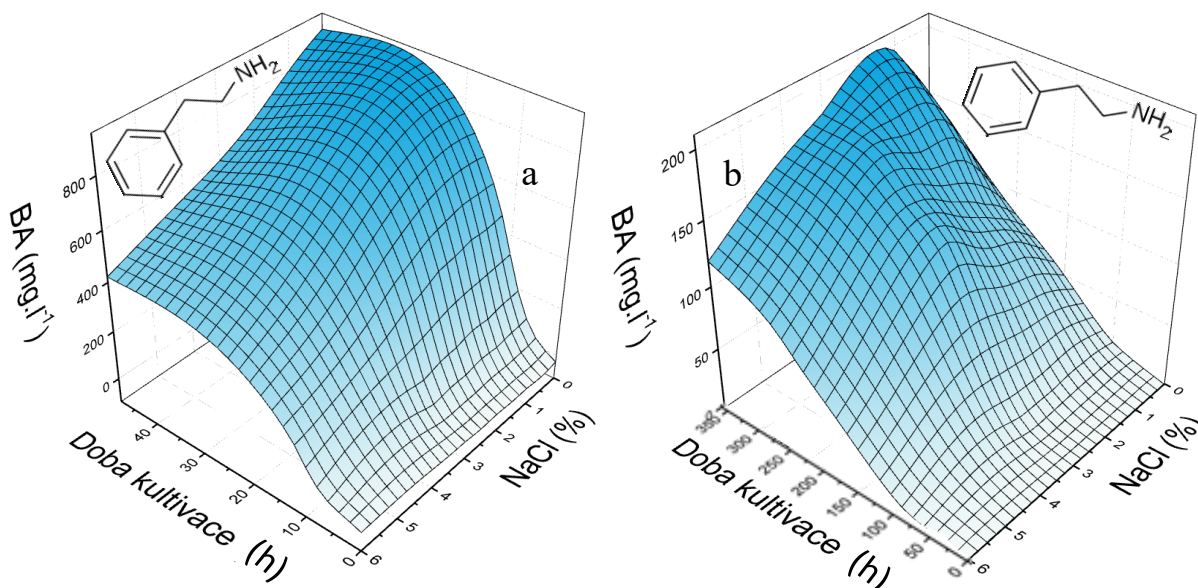


Obr. 20. Kinetika produkce tyraminu při 30 °C (a) a 6 °C (b) u *Staphylococcus epidermidis* 21/2 v závislosti na koncentraci NaCl.

Dalším ze sledovaných BA u *S. epidermidis* 21/2 byl fenyletylamin. Při všech sledovaných teplotách (6, 12 i 30 °C) vykazoval kmen výraznou produkci, která byla významně ovlivněna množstvím přidaného NaCl do růstového prostředí. Při 6 i 12 °C bylo po 24 hodinové kultivaci množství vyprodukovaného PHE při 6 % (w/v) NaCl nejnižší. Dále koncentrace PHE rostla se snižující se koncentrací NaCl (Obr. 21). Podobný vliv na produkce fenyletylaminu měl chlorid sodný při všech teplotách kultivace. Při 6 °C po 360 hodinách kultivace bylo množství vyprodukovaného PHE při 1 % (w/v) NaCl $\leq 158,7 \text{ mg.l}^{-1}$, při 0 a 3 % (w/v) NaCl $\leq 179,4 \text{ mg.l}^{-1}$. Tyto uvedené hodnoty fenyletylaminu byly významně ovlivněny kyselým prostředím.

Při teplotě 30 °C po 24 hodinách bylo množství fenyletylaminu snižováno v závislosti na rostoucí koncentraci NaCl, avšak maximální produkce PHE byla stanovena v médiu bez NaCl ($\leq 631,3 \text{ mg.l}^{-1}$). Tento trend byl zachován do 40 hodin kultivace, kdy došlo k vrcholu produkce $866,5 \pm 11,1 \text{ mg.l}^{-1}$.

Polyaminy putrescin, spermidin a spermin byly dalšími sledovanými produkty dekarboxylace *S. epidermidis* 21/2. Při teplotách pod 12 °C byla změna koncentrace putrescinu (Příloha II, Obr. 30) v médiu v závislosti na koncentraci NaCl nevýrazná ($P < 0,05$). Ve většině případů byla produkce $\leq 5,5 \text{ mg.l}^{-1}$. Množství spermidinu a sperminu v médiu se v závislosti na NaCl neměnilo.



Obr. 21. Kinetika produkce fenyletylaminu při 30 °C (a) a 6 °C (b) u *Staphylococcus epidermidis* 21/2 v závislosti na koncentraci NaCl.

Produkce tryptaminu byla vyšší pouze u koncentrace 6 % (w/v) NaCl, kdy byl patrný nárůst koncentrace tryptaminu $21,5 \pm 1,1 \text{ mg.l}^{-1}$ při 30 °C. Při 6 a 12 °C byla produkce tryptaminu $\leq 5,5 \text{ mg.l}^{-1}$ (Příloha II, Obr. 31).

Množství kadaverinu bylo při 30 °C redukováno. Nejvýznamněji se redukce projevila při 6% (w/w) přídavku NaCl. S klesající koncentrací NaCl se snižoval úbytek kadaverinu na (Příloha II, Obr. 31).

Vliv přístupu kyslíku na produkci BA u Staphylococcus epidermidis (21/2)

Závislost vztahu O₂ a produkce BA *in vitro* byla sledována i u *Staphylococcus epidermidis* 21/2.

Přístup kyslíku v prvních hodinách kultivace při 30 °C neovlivňoval produkci tyraminu. Po 24 i 48 hodinách kultivace množství TYM u *S. epidermidis* 21/2 nepřesahovalo při 6 i 12 °C v anaerobním i anaerobním prostředí $\leq 22,2 \text{ mg.l}^{-1}$. K výrazným změnám v produkci tyraminu docházelo po 24 hodinách kultivace při 30 °C anaerobně, kdy množství vyprodukovaného tyraminu bylo $\leq 1003,9 \text{ mg.l}^{-1}$, avšak při aerobní kultivaci pouze $\leq 657,1 \text{ mg.l}^{-1}$. Při 30 °C po 48 hodinách anaerobně byly hodnoty produkce TYM $\leq 1198,8 \text{ mg.l}^{-1}$ téměř totožné jako po 24 hodinách, avšak při aerobní kultivaci produkce stále rostla až na hodnoty $\leq 936,0 \text{ mg.l}^{-1}$.

Ke zvýšení produkce PHE došlo u *S. epidermidis* 21/2 při 30 °C v anaerobním prostředí o 20 % po 12 hodinách kultivace. Po 48 hodinové kultivaci bylo množství vyprodukovaného PHE při 30 °C za anaerobní kultivace zvýšeno o 10 %, což odpovídalo $55,0 \text{ mg.l}^{-1}$. Při kultivaci ve 12 °C byla produkce po 360 hodinách vyšší při anaerobní kultivaci o 20 % a při 6 °C byla produkce vyšší 2,5 násobně oproti aerobní kultivaci ($114,8 \pm 2,1 \text{ mg.l}^{-1}$).

Dalším ze sledovaných BA u *S. epidermidis* 21/2 byl putrescin. Maximální vyprodukované množství bylo po 12 hodinách kultivace, při pH 7 a 30 °C za anaerobní kultivace $\leq 17,7 \text{ mg.l}^{-1}$. Za stejných podmínek při aerobní kultivaci byla produkce $\leq 10,1 \text{ mg.l}^{-1}$. Další kultivací již nedocházelo k navýšení množství produkovaného putrescinu vlivem aerobního či anaerobního prostředí.

Kadaverin nebyl po 24 i 48 hodinách kultivace inokulovaného média *S. epidermidis* 21/2 produkován rozdílně v závislosti na anaerobním či aerobním prostředí.

Výrazný vliv O_2 na sledované polyaminy spermidin a spermin u *Staphylococcus epidermidis* 21/2 nebyl pozorován ani po 360 hodinách kultivace.

5.3.5 *Staphylococcus hominis* 20/2

Tato část práce přispívá k objasnění produkce BA u *Staphylococcus hominis* 20/2 a vlivu faktorů na jím produkované BA. Nejvyšší maximální hodnoty a podmínky, při kterých bylo těchto hodnot dosaženo, jsou uvedeny v Tab. 11.

Tab. 11. Maximální produkce BA u *Staphylococcus hominis* 20/2.

| <i>Staphylococcus hominis</i> 20/2 | BA mg.l^{-1} | Teplota (°C) | pH | NaCl (w/v) | an/aerobně |
|------------------------------------|-----------------------|--------------|----|------------|------------|
| tyramin | 1678,0 | 30 | 7 | 0 | A |
| fenyletylamin | 856,4 | 30 | 7 | 0 | AN |
| histamin | 6,3 | 30 | 5 | 2 | AN |
| tryptamin | 38,8 | 30 | 5 | 1 | AN |
| putrescin | 25,7 | 30 | 5 | 2 | AN |
| kadaverin | 27,7 | 30 | 7 | 0 | A |
| spermin | 57,6 | 30 | 7 | 2 | A |
| spermidin | 5,9 | 30 | 6 | 2 | A |

Vliv teploty na produkci BA u *Staphylococcus hominis* 20/2

Stanovená množství tyraminu po 24 hodinové kultivaci u *Staphylococcus hominis* byla v závislosti na kombinaci dalších faktorů při 6 °C v rozsahu 22,6–27,3 mg.l^{-1} , při 12 °C 29,0–83,3 mg.l^{-1} a při 30 °C 367,6–1260,4 mg.l^{-1} . Po 48 hodinové kultivaci bylo množství vyprodukovaného TYM při 6 °C 51,4–128,5 mg.l^{-1} , při 12 °C 49,3–222,3 mg.l^{-1} a při 30 °C v rozmezí 813,6–1678,0 mg.l^{-1} . Po 360 hodinách kultivace bylo rozmezí vyprodukovaného tyraminu při 6 °C 59,0–159,4 mg.l^{-1} a při 12 °C 99,4–264,7 mg.l^{-1} . Nejvyšší koncentrace tyraminu byla vyprodukována při 30 °C po 48 hodinách kultivace ($1678,0 \pm 22,6 \text{ mg.l}^{-1}$).

Produkce fenyletylaminu u *S. hominis* 20/2 rostla úměrně s rostoucí teplotou kultivace. Po 24 hodinové kultivaci při teplotě 6 a 12 °C byla produkce v rozmezí 2–9,6 mg.l^{-1} . Při 30 °C bylo množství produkovaného PHE v rozmezí

12,4–363,2 mg.l⁻¹. V obou případech byl rozsah produkce podmíněn i dalšími faktory, které kultivaci ovlivnily. Produkce PHE byla nejvyšší po 48 hodinové kultivaci při 30 °C, kdy dosahovala 856,4±2,2 mg.l⁻¹. V supernatantech po 48 hodinové kultivaci *S. hominis* 20/2 při 6 a 12 °C se pohybovala produkce v násobně nižších hodnotách (≤9,6 mg.l⁻¹). K výraznému navýšení produkce fenyletylaminu při těchto teplotách nedošlo ani po 360 hodinách kultivace.

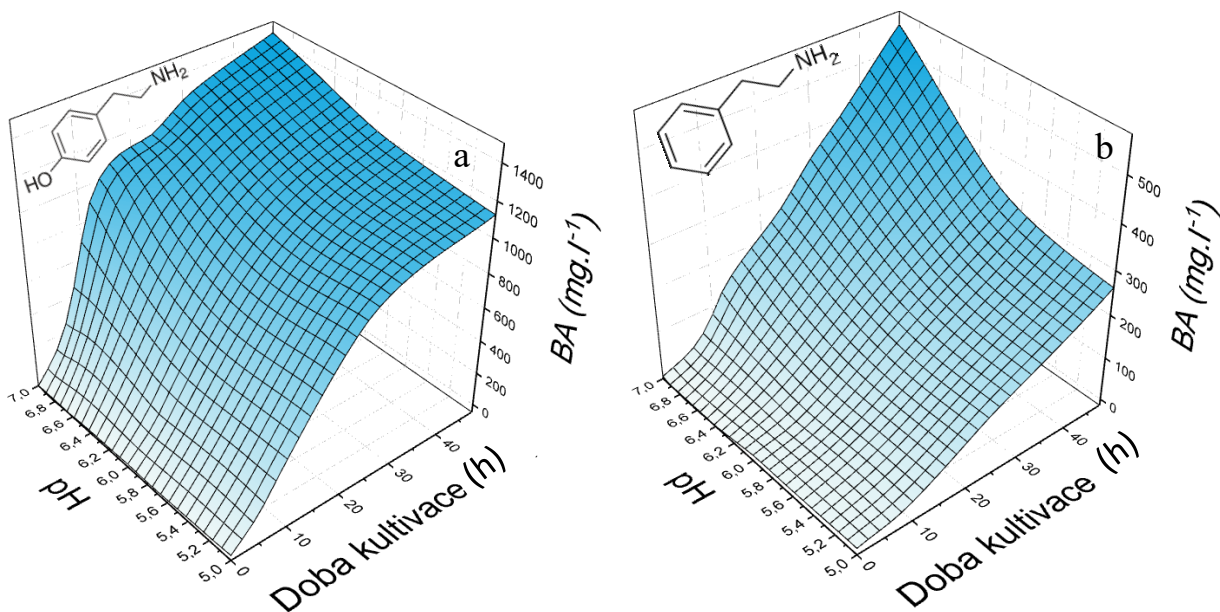
Putrescin byl po 24 hodinách kultivace *S. hominis* 20/2 produkován v množství nepřesahujícím 8,2 mg.l⁻¹, při 12 °C ≤15,9 mg.l⁻¹ a při 30 °C ≤17,0 mg.l⁻¹. Po 48 hodinové kultivaci se množství produkovaného putrescinu výrazněji neměnilo. Po 360 hodinách kultivace byly hodnoty tohoto BA ≤19,9 mg.l⁻¹.

Histamin a kadaverin byly ve většině případů produkovány v nízkých koncentracích (HIS ≤3 mg.l⁻¹). V čase kultivace se obsah histaminu a kadaverinu v závislosti na teplotě příliš neměnil. Koncentrace kadaverinu v čase rostla při obou testovaných nižších teplotách (6 i 12 °C) do 144. hodiny kultivace (≤15,5 mg.l⁻¹). Při odběru v čase po 144 hodinách došlo k poklesu kadaverinu na polovinu (7,1 mg.l⁻¹).

Polyamin spermidin byl produkován po 24 hodinové kultivaci při všech testovaných teplotách v nízkých koncentracích (většinou ≤2,0 mg.l⁻¹). Produkce SPD měla slabý růstový trend. Pouze při 30 °C byl malý nárůst k hodnotě až 3,9 mg.l⁻¹. Spermin byl produkován při teplotách 6 °C i 12 °C. Po 24 hodinové kultivaci *S. hominis* 20/2 byla produkce při 6 i 12 °C ≤5,2 mg.l⁻¹, při 30 °C ≤19,6 mg.l⁻¹. Po 360 hodinách bylo rozmezí vyprodukovaného sperminu u obou sledovaných teplot (6 a 12 °C) téměř shodné (18,5–39,4 mg.l⁻¹). Po 144 hodinách kultivace docházelo k úbytku sperminu. Po 360 hodinové kultivaci bylo množství sperminu při 6 i 12 °C ≤8,2 mg.l⁻¹.

Vliv pH na produkci BA u Staphylococcus hominis 20/2

Klesající pH způsobilo pokles produkce tyraminu při všech testovaných teplotách (Obr. 22). Po 48 hodinách kultivace byla produkce při 30 °C a pH 7 1280,7±12,6 mg.l⁻¹, při pH 5 byla produkce nižší, dosahující hodnoty 1068±71,6 mg.l⁻¹. Při 6 i 12 °C byl trend produkce shodný. Po 360 hodinách kultivace při 12 °C a pH 7 byla koncentrace tyraminu 947,2±31,1 mg.l⁻¹ a při pH 5 dosahovala 412,4±11,1 mg.l⁻¹. V rámci kultivace při 6 °C byl rozdíl produkce tyraminu mezi pH 7 a pH 6 Δ 30,0±2,1 mg.l⁻¹.



Obr. 22. Kinetika produkce tyraminu (a) a fenyletylaminu (b) při 30 °C u *Staphylococcus hominis* 20/2 v závislosti na pH.

Na významných změnách produkce PHE se jako další z faktorů podílela teplota. Při 30 °C docházelo při pH 6 – 7 k dvojnásobné produkci fenyletylaminu ($576,0 \pm 5,3 \text{ mg.l}^{-1}$) oproti pH 5, kdy maximální produkce PHE byla $246,0 \pm 2,1 \text{ mg.l}^{-1}$ (Obr. 22). Při 6 i 12 °C bylo možné sledovat podobný trend v produkci fenyletylaminu, tedy, že při pH 7 byla produkce nejvýraznější a s klesající hodnotou pH se produkce snižovala. Na konci kultivace (po 360 hodinách) byl rozdíl v produkci fenyletylaminu dvojnásobný.

Koncentraci kadaverinu v růstovém prostředí také ovlivňovalo pH. Při většině testovaných kombinací faktorů a teplotě kultivace 30 °C docházelo k jeho úbytku. Nejpatrnější úbytek kadaverinu byl sledován při 5 pH po 48 hodinové kultivaci (Příloha II, Obr. 22). Při kultivačních teplotách 6 a 12 °C bylo možné sledovat jednotný trend, kdy s rostoucím pH rostla i koncentrace kadaverinu. Po 240 hodinové kultivaci při pH 5 množství kadaverinu v kultivačním médiu naopak ubývalo.

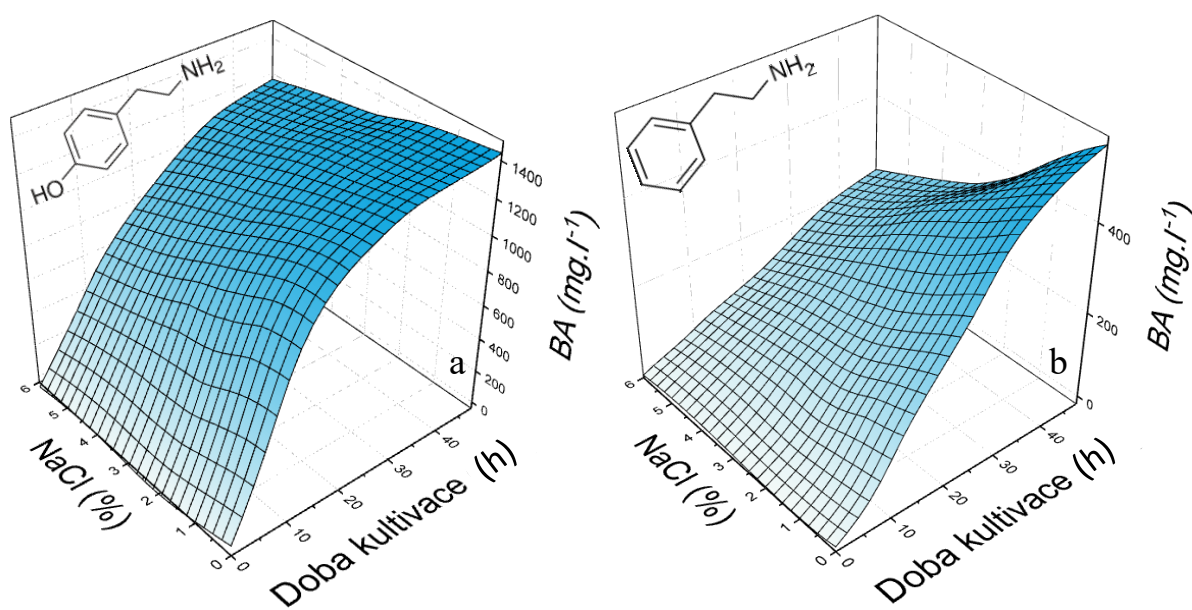
Produkce putrescinu při teplotách 6 i 12 °C byla ovlivněna pH stejným způsobem (Příloha II, Obr. 23) jako produkce kadaverinu. Při zmíněných teplotách a vyšších hodnotách zkoušeného pH byl patrný mírný nárůst putrescinu. V kyselějším prostředí byl do 150. hodiny kultivace vidět slabý pokles, který se však další dobou kultivace vyrovnal. Při teplotě 30 °C byl v médiích sledován pokles množství putrescinu bez ohledu na nastavené pH.

Vliv pH na produkci spermidinu kmenem *S. hominis* 20/2 nebyl pozorován při obou nižších testovaných teplotách (při 6 ani 12 °C). Při 30 °C bylo možné pozorovat pokles spermidinu v médiu pouze při $\text{pH} \geq 6$, a to až po 48 hodinách kultivace (Příloha II, Obr. 24).

Oproti tomu další polyamin, spermidin, vykazoval v médiu jiný trend. Při 6 °C bylo možné pozorovat významnější nárůst sperminu při pH 5, kdy po 140 hodinách kultivace bylo dosaženo produkce $23,5 \pm 0,6 \text{ mg.l}^{-1}$. S rostoucím pH se produkce prudce snižovala (Příloha II, Obr. 25), a také po 140 hodinách kultivace bylo možné sledovat značný úbytek v obsahu sperminu v bujónu.

Vliv NaCl na produkci BA u Staphylococcus hominis 20/2

Byl sledován vliv koncentrace NaCl na produkci BA u *S. hominis* 20/2. Mezi nejvýznamnější amin u *S. hominis* 20/2 patřil tyramin, co se týče rozsahu jeho produkce. S rostoucí koncentrací NaCl klesala produkce tyraminu při všech kultivačních teplotách (Obr. 23). Při 6 °C byl patrný trend produkce tyraminu v závislosti na koncentraci NaCl (Příloha II, Obr. 26). Produkce při 6 °C byla inhibována přidavky soli nad 2 % (w/v), a to až o 40 %. Maximální produkce tyraminu při 6 °C byla $159,4 \pm 1,9 \text{ mg.l}^{-1}$, při 12 °C byla produkce $581,6 \pm 9,9 \text{ mg.l}^{-1}$ a při 30 °C $1678,0 \pm 31,0 \text{ mg.l}^{-1}$. Přidavky NaCl v koncentracích nad 3 % (w/v) způsobily pokles produkce tyraminu v médiích po kultivaci při 30 °C.



Obr. 23. Kinetika produkce tyraminu (a) a fenyletylaminu (b) při 30 °C u *Staphylococcus hominis* 20/2 závislosti na koncentraci NaCl.

Dalším sledovaným BA byl fenyletylamin. Produkce při 6 °C u *S. hominis* 20/2 se pohybovala v maximálních hodnotách po 360 hodinách kultivace v koncentraci $12,7 \pm 0,2 \text{ mg.l}^{-1}$ při teplotě 6 °C. Byl pozorován trend poklesu produkce s rostoucí koncentrací NaCl, a to u všech sledovaných teplot kultivace. Při 30 °C byla maximální produkce PHE po 48 hodinách kultivace $679,9 \pm 4,2 \text{ mg.l}^{-1}$.

Při 6, 12 a 30 °C měla koncentrace NaCl vliv na produkci kadaverinu u kmene *S. hominis* 20/2. Se zvyšující se koncentrací NaCl při 6 °C docházelo k postupnému snižování produkce po 144 hodinách kultivace. V delším časovém

období potom docházelo k úbytku kadaverinu, a to při všech koncentracích NaCl. Nevyšší hodnota produkce byla detekována v médiích po kultivaci při 6 °C a po 144 hodinách ($16,4 \pm 1,1 \text{ mg.l}^{-1}$). Při 30 °C byla nejvyšší dosažená hodnota produkce kadaverinu po 36 hodinách kultivace $27,7 \pm 1,5 \text{ mg.l}^{-1}$, vždy při nejnižší koncentraci NaCl v bujónu (Příloha II, Obr. 27).

Během kultivace *S. hominis* 20/2 nedocházelo k výrazným změnám v množství sperminu v závislosti na koncentraci NaCl. Polyamin spermidin byl v závislosti na koncentraci NaCl výrazněji redukován jen při 6 % (w/v) NaCl (Příloha II, Obr. 28).

Vliv přístupu kyslíku na produkci BA u Staphylococcus hominis 20/2

Anaerobní prostředí mělo dle výsledků subexperimentu vliv na produkci BA u *Staphylococcus hominis* 20/2. Vyšší produkce tyraminu byla sledována při anaerobní kultivaci. Produkce tyraminu při 30 °C v anaerobním prostředí byla $1678,0 \pm 2,0 \text{ mg.l}^{-1}$. Nižší produkce byla zaznamenána při aerobní kultivaci v čase 48 hodin ($1464,3 \pm 22,4 \text{ mg.l}^{-1}$). Produkce tyraminu kopírovala růstovou křivku *S. hominis* 20/2. Při 12 °C nebyl pozorován významný rozdíl produkce v aerobním či anaerobním prostředí v počátku kultivace. Po 360 hodinách kultivace však byla produkce za anaerobního prostředí vyšší oproti aerobnímu prostředí, a to více jak dvojnásobně. Při 6 °C byl rozdíl v produkci tyraminu v anaerobním i aerobním prostředí minimální $156,4 \pm 5,0 \text{ mg.l}^{-1}$.

Dalším sledovaným BA u *S. hominis* 20/2 byl fenyletylamin. K výraznějšímu rozdílu v produkci došlo až po 24 hodinové kultivaci při 30 °C, kdy byl patrný trend vyšší produkce v anaerobním prostředí. Po 48 hodinové kultivaci byla produkce fenyletylaminu v anaerobním prostředí $856,4 \pm 2,5 \text{ mg.l}^{-1}$, v aerobním dosahovala $761,2 \pm 2,0 \text{ mg.l}^{-1}$. Při 6 i 12 °C byla produkce $\leq 10,5 \text{ mg.l}^{-1}$ bez významného vlivu O₂ na produkci. Produkce putrescinu při všech sledovaných teplotách byla vždy za anaerobní kultivace vyšší než za aerobní. Tvorba kadaverinu a histaminu u *S. hominis* 20/2 nebyla výrazně ovlivněna přístupem kyslíku bez ohledu na teplotu kultivace. Stejně tomu bylo i u polyaminů sperminu a spermidinu.

5.3.6 *Staphylococcus pasteurii* 19/1

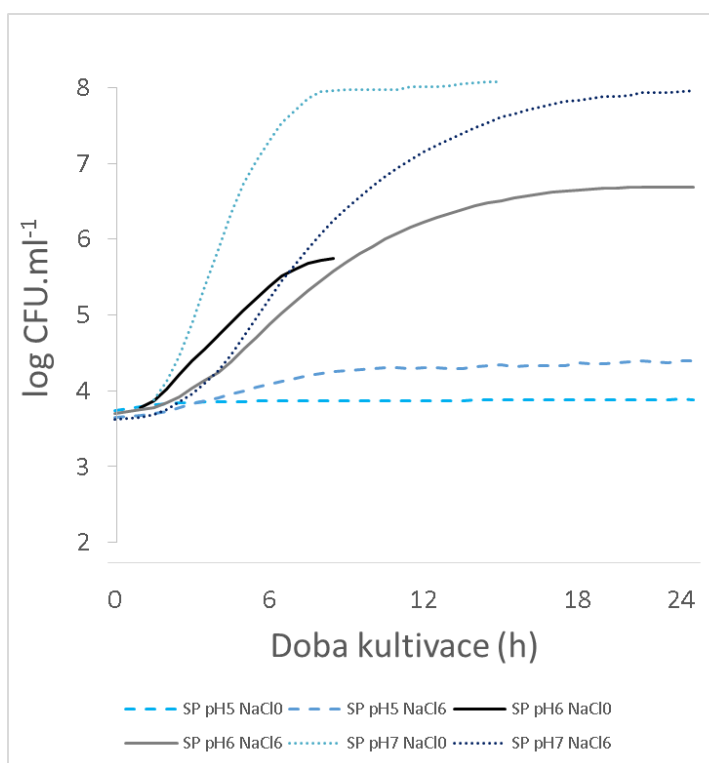
Nejvyšší maximální hodnoty produkce jednotlivých biogenních aminů u *Staphylococcus pasteurii* 19/1 a podmínky, při kterých bylo těchto hodnot dosaženo, jsou uvedeny v Tab. 12.

Byl vyhodnocen trend růstu kmene v závislosti na testovaných faktorech. Délka lag fáze se prodlužovala se snižující se teplotou i pH. Avšak koncentrace NaCl výrazně lag fázi neprodloužila. Při stejném pH, ale při nižší teplotě, byl růst *S. pasteurii* 19/1 velmi zpomalen.

Tab. 12. Maximální produkce BA u *Staphylococcus pasteurii* 19/1.

| <i>Staphylococcus pasteurii</i> 19/1 | BA mg.l ⁻¹ | Teplota (°C) | pH | NaCl (w/v) | an/aerobně |
|--------------------------------------|-----------------------|--------------|----|------------|------------|
| tyramin | 1875,5 | 30 | 7 | 1 | A |
| fenyletylamin | 791,2 | 30 | 5 | 1 | AN |
| histamin | 5,3 | 30 | 5 | 2 | AN |
| tryptamin | 56,5 | 12 | 7 | 0 | A |
| putrescin | 55,5 | 30 | 5 | 0 | AN |
| kadaverin | 20,7 | 30 | 7 | 1 | AN |
| spermin | 52,6 | 6 | 5 | 1 | AN |
| spermidin | 15,3 | 30 | 5 | 1 | A |

Jak je patrné z Obr. 24, byla lag fáze růstu *S. pasteurii* 19/1 prodloužena dvojnásobně při koncentraci NaCl 6 % (w/v). *S. pasteurii* 19/1, stejně jako předchozí kmen *S. hominis* 20/2 vykazovaly podobné chování při všech sledovaných faktorech.



Obr. 24. Část růstové křivky *Staphylococcus pasteurii* 19/1 (SP) in vitro při pH 5, 6 a 7, 30 °C, za an/aerobních podmínek s přidavkem různých koncentrací 0, 3 a 6 % (w/v) NaCl.

Vliv teploty na produkci BA u *Staphylococcus pasteurii* 19/1

Sledované teploty (6, 12 a 30 °C) byly vybrány tak, aby co nejvíce napodobily podmínky, které provázejí výrobu a zpracování ryb a tedy mohou ovlivnit produkci BA.

Nejvýznamnějším BA v množství produkce závislé na teplotě byl, stejně jako u dalších testovaných kmenů, tyramin. Stanovená množství tyraminu po 24 hodinové kultivaci u *S. pasteurii* 19/1 byla při 6 °C 2,0–23,7 mg.l⁻¹, při kultivaci ve 12 °C 2,0–41,3 mg.l⁻¹ a při 30 °C 847,5–1866,7 mg.l⁻¹. Při další kultivaci množství tyraminu rostlo v závislosti na ostatních sledovaných faktorech a v závislosti na růstu kmene. Po 48 hodinové kultivaci bylo množství vyprodukovaného tyraminu při 6 °C 11,7–27,5 mg.l⁻¹, kdy dvojnásobné produkce dosahoval *S. pasteurii* 19/1 při 12 °C. Po třistašedesáti hodinové kultivaci byla produkce tyraminu při 6 °C 96,3–712,4 mg.l⁻¹ a při 12 °C 110,4–907,9 mg.l⁻¹ v závislosti na ostatních sledovaných kombinacích faktorů. Nejvyšší množství tyraminu bylo vyprodukováno při 30 °C po 30 hodinách kultivace (1875,5±70,6 mg.l⁻¹). Z těchto výsledků je patrné že větší vliv než teplota měly na produkci jiné sledované faktory, jejichž kombinace je společně s rozsahem produkce BA popsána níže.

Fenyletylamin byl u *S. pasteurii* 19/1 po 24 hodinové kultivaci při teplotě 6 °C produkován ve shodném rozmezí jako při 12 °C (2–2,6 mg.l⁻¹). Ostatní sledované faktory ve spojení s teplotou 30 °C výrazněji navyšovaly objem produkce PHE (6,8–507,2 mg.l⁻¹). Produkce PHE byla nejvyšší po 48 hodinové kultivaci při 30 °C (≤791,2 mg.l⁻¹). V prostředí 6 a 12 °C se pohybovala produkce v druhém dni ve výrazně nižších hodnotách (≤5,5 mg.l⁻¹). K výraznému navýšení produkce PHE nedošlo ani po 360 hodinách kultivace při těchto teplotách (≤32,8 mg.l⁻¹),

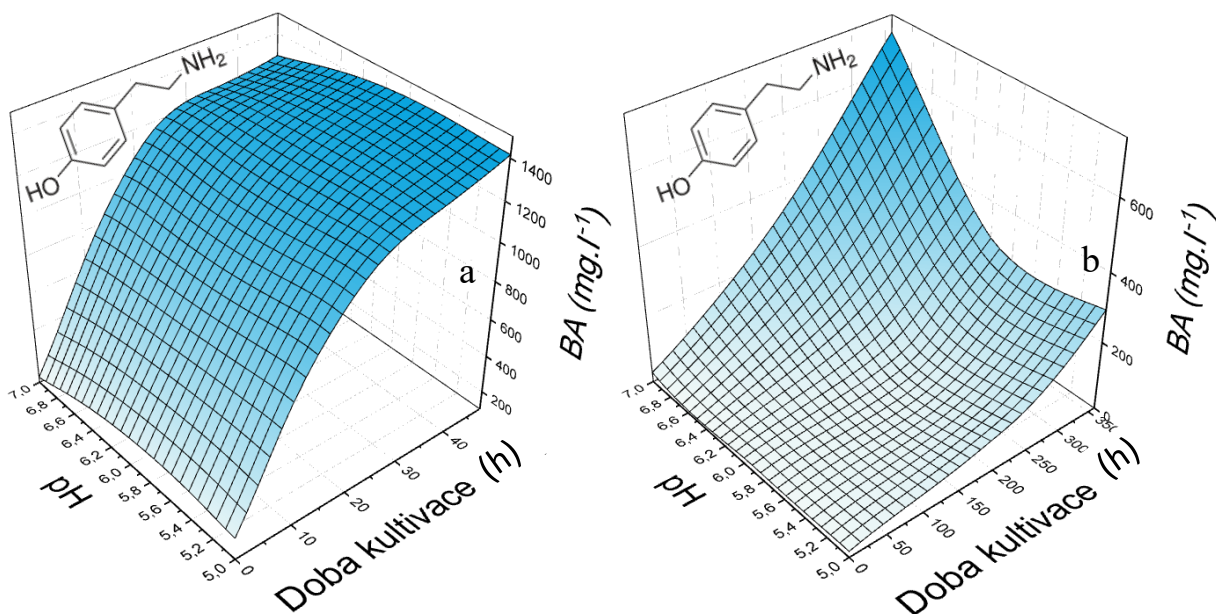
Putrescin byl po 24 hodinách kultivace *S. pasteurii* 19/1 při 6 °C i 12 °C detekován v nízké koncentraci (≤5,5 mg.l⁻¹), při 30 °C byly hodnoty produkovaného putrescinu řádově vyšší (19,5–42,5 mg.l⁻¹). Po 48 hodinové kultivaci se množství produkovaného putrescinu výrazněji neměnilo. Po 360 hodinách kultivace byly hodnoty produkovaného putrescinu při 6 a 12 °C v rozmezí 3,0–6,5 mg.l⁻¹.

Histamin a kadaverin byly ve většině případů kultivace produkovány pod 3 mg.l⁻¹. V čase se koncentrace histaminu a kadaverinu příliš neměnila. Vyjímkou byly produkce za anaerobních podmínek a při pH 5. Při této kombinaci faktorů byla produkce po 12 hodinách a 30 °C kultivace 5,2 mg.l⁻¹ (histamin) a 19,9 mg.l⁻¹ (kadaverin).

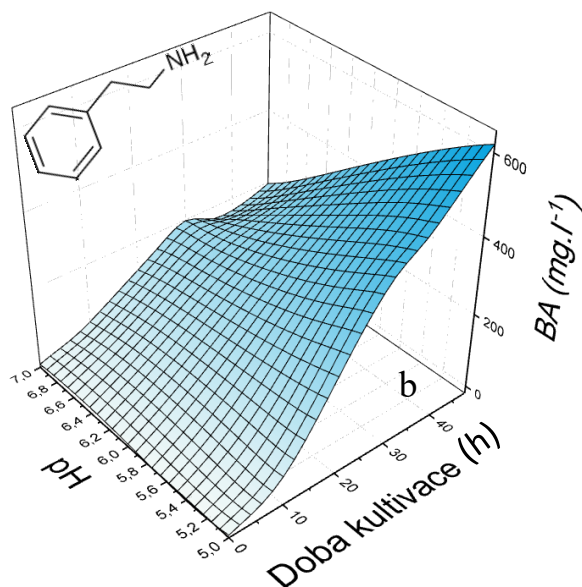
Polyamin spermidin byl produkován po 24 hodinové kultivaci při všech teplotách v nízkých koncentracích (≤4,0 mg.l⁻¹). Produkce SPD měla slabý rostoucí trend. Spermin byl produkován při teplotách 6 °C i 12 °C. Produkce po 24 a 48 hodinové kultivaci 30 °C nepřesahovala hodnotu ≤7,9 mg.l⁻¹. Po 360 hodinách bylo obsah sperminu v růstovém prostředí při 12 °C 11,5 – 36,3 mg.l⁻¹ a při 6 °C 18,5–39,4 mg.l⁻¹, tedy patrně vyšší.

Vliv pH na produkci BA u *Staphylococcus pasteurii* 19/1

Nejvyšší stanovené množství TYM produkované *Staphylococcus pasteurii* 19/1 bylo stanoveno v médiích po 48 hodinové kultivaci při 30 °C a pH 5 (1496,5±44,6 mg.l⁻¹). Z grafů (Obr. 25) je patrné, že nejvhodnější pH pro tvorbu tyraminu při teplotě 30 °C bylo spíše kyselé prostředí (pH 5). Zatímco při nižší teplotě kultivace byla produkce tyraminu podpořena při pH 7.



Obr. 25. Kinetika produkce tyraminu při 30 °C (a) a 6 °C (b) u *Staphylococcus pasteurii* 19/1 v závislosti na pH.



Obr. 26. Kinetika produkce fenyletylaminu při 30 °C u *Staphylococcus pasteurii* 19/1 v závislosti na pH.

Změna pH měla výrazný vliv na produkci PHE u *S. pasteurii* 19/1, jak je patrné z grafu (Obr. 26). Při 30 °C množství PHE rostlo mírně při pH 7 a výrazněji s klesající hodnotou pH média. Při pH 5 byla hodnota produkce

šestinásobná oproti produkci při pH 7. Po 20. hodině kultivace je tento jev ještě výraznější. Oproti tomu produkce PHE při kultivační teplotě 6 °C a pH 7 měla rostoucí charakter po 250 hodinách kultivace, kdy došlo k dvojnásobnému nárůstu tohoto aminu.

Změna pH neměla jednoznačný vliv na produkci kadaverinu u *S.pasteuri* 19/1. Při 30 °C množství kadaverinu v médiu mírně rostlo během prvních 20 hodin kultivace, poté v průběhu další kultivace množství kadaverinu bez ohledu na pH klesalo. Produkce kadaverinu při kultivační teplotě 6 °C měla rostoucí charakter pouze od 150. hodiny kultivace v růstovém médiu při všech hodnotách pH.

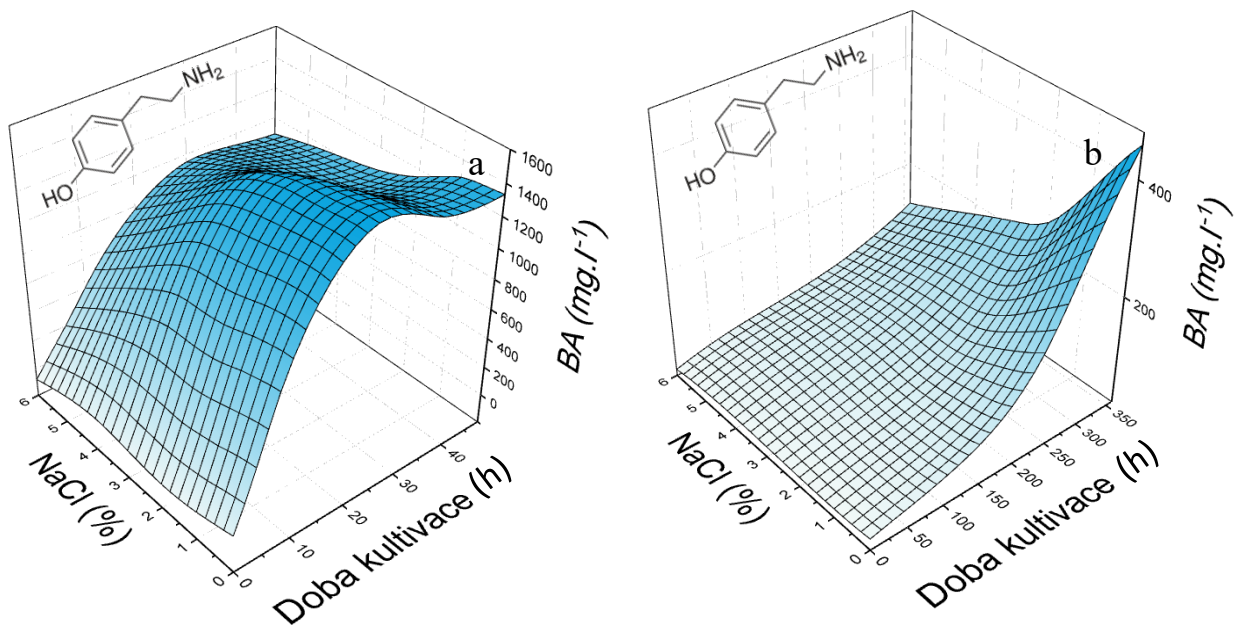
Jednoznačný trend nelze sledovat při produkci putrescinu u *S. pasteurii* 19/1 v závislosti na pH. Během kultivace při pH 5 při 30 °C množství putrescinu v médiu mírně rostlo. Po 30 hodinách kultivace množství putrescinu klesalo výrazněji při pH 7, až o 20 %. Produkce PUT při kultivační teplotě 6 °C měla rostoucí charakter pouze do 250. hodiny kultivace a v exponenciální fázi, při hladovění buněk začalo množství putrescinu klesat při všech hodnotách pH.

Změna pH neměla vliv na produkci sperminu při 30 °C u *S. pasteurii* 19/1. Při nižších teplotách se v průběhu kultivace projevil trend při pH 6, kdy byl na začátku kultivace patrný úbytek sperminu do 150. hodiny kultivace. Dále se spermin tvořil stejně jako při pH 7 a 5.

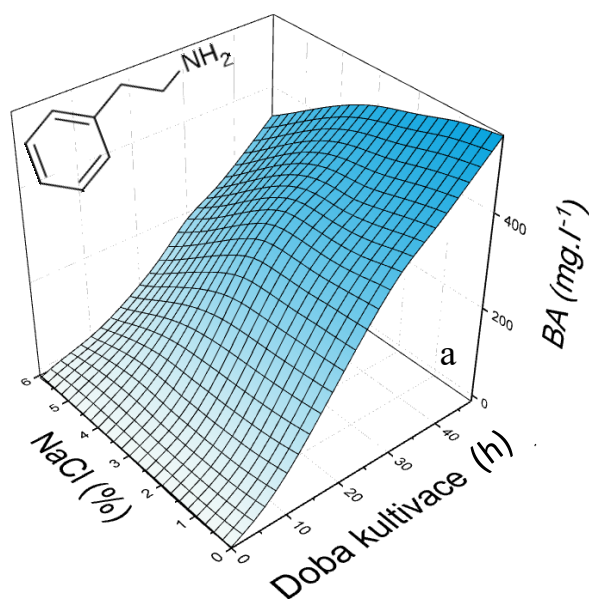
Vliv NaCl na produkci BA u *Staphylococcus pasteurii* 19/1

Nejvyšší stanovené množství tyraminu bylo sledováno v médiích po 24 hodinách kultivace při 30 °C bez přídavku NaCl ($1586,5 \pm 22,2 \text{ mg.l}^{-1}$). Z grafu (Obr. 27) je patrné, že s rostoucí koncentrací NaCl byla produkce tyraminu snížena až o 33 %, a to na vrcholu produkce po 24 hodinové kultivaci. V delším časovém úseku kultivace se tento rozdíl snižoval. Při teplotách 6 i 12 °C byla produkce TYM $\leq 482,2 \text{ mg.l}^{-1}$. Z grafu je patrný trend, kdy se s rostoucí koncentrací NaCl snižovala produkce sledovaného BA. Při koncentracích NaCl nižších než 2 % (w/v) byl v médiích pozorován prudký nárůst tyraminu (Obr. 27).

Produkce fenyletylaminu byla nejvýznamněji podporována při 30 °C bez přídavku NaCl. Z grafu (Obr. 28) je patrné, že vyšší koncentrace NaCl zpomalovala produkci PHE. Maximální produkce po 48 hodinách při 30 °C byla $599,3 \pm 18,1 \text{ mg.l}^{-1}$. I při nižších teplotách vykazoval kmen *S. pasteurii* 19/1 výraznou produkci PHE. Při teplotě 6 °C je z Obr. 28 patrné, že s rostoucí koncentrací NaCl se produkce PHE rychle snižovala. Při 6 °C došlo k mírné produkci až po 250 hodinách kultivace a pouze do koncentrace NaCl 2 % (w/v). V médiu bez NaCl byla výraznější produkce až po 300 hodinách kultivace, kdy maximum bylo dosaženo po 360 hodinách ($16,0 \pm 0,2 \text{ mg.l}^{-1}$).



Obr. 27. Kinetika produkce tyraminu při 30 °C (a) a 6 °C (b) u *Staphylococcus pasteurii* 19/1 v závislosti na koncentraci NaCl.



Obr. 28. Kinetika produkce fenyletylamin při 30 °C u *Staphylococcus pasteurii* 19/1 v závislosti na koncentraci NaCl.

S rostoucím množstvím NaCl produkce kadaverinu klesala, a to i přes to že *S. pasteurii* běžně roste při daleko vyšších koncentracích soli. Bez přidavku NaCl bylo dosaženo největší produkce kadaverinu $\leq 8 \text{ mg.l}^{-1}$. Při 12 a 30 °C koncentrace NaCl neměla vliv na produkční křivku kadaverinu u kmene *S. pasteurii* 19/1.

Produkce putrescinu nebyla výrazně ovlivňována přidavkem NaCl při 6 °C ani 12 °C. Při 30 °C byla produkce ovlivněna výrazněji (Příloha II, Obr. 19). S klesající koncentrací NaCl se zvyšovala produkce PUT. Tento trend byl

výraznější až po 12 hodinách kultivace. Maximální hodnoty produkce putrescinu bylo dosaženo při 1 % NaCl ($31,86 \pm 0,9 \text{ mg.l}^{-1}$).

Vliv přístupu kyslíku na produkci BA u Staphylococcus pasteurii 19/1

Z výsledků je patrné, že anaerobní kultivace podpořila produkci tyraminu, kdy maximální produkce při 30 °C po 48 hodinách kultivace v anaerobním prostředí ($2200,1 \pm 42,0 \text{ mg.l}^{-1}$) byla vyšší než při aerobní kultivaci ($1276,3 \pm 31,5 \text{ mg.l}^{-1}$). Lze konstatovat, že produkce tyraminu kopírovala růstovou křivku *S. pasteurii* 19/1 (Obr. 24). Při 12 °C nebyl pozorován významný rozdíl produkce v aerobním či anaerobním prostředí v počátku kultivace. Po 288 hodinách kultivace byl však patrný rozdíl v produkci. Koncentrace TYM v anaerobním prostředí ($947,2 \pm 2,1 \text{ mg.l}^{-1}$) byla více jak trojnásobná oproti aerobnímu prostředí (bez ohledu na ostatní faktory). Při teplotě 6 °C byla detekována o 20 % vyšší produkce TYM ($712,4 \pm 2,1 \text{ mg.l}^{-1}$) v anaerobním prostředí, než v růstovém prostředí s přístupem kyslíku.

Dalším sledovaným BA u *S. pasteurii* 19/1 byl fenyletylamin. K výraznějšímu rozdílu v produkci došlo až po 24 hodinové kultivaci při 30 °C, kdy už byla patrná vyšší produkce fenyletylaminu v anaerobním prostředí než v aerobním. Po 48 hodinové kultivaci byla produkce fenyletylaminu v anaerobním prostředí oproti aerobnímu dvojnásobná, kdy dosahovala $788,2 \pm 6,0 \text{ mg.l}^{-1}$. Při 6 i 12 °C byla produkce bez ohledu na přístup kyslíku nízká ($\leq 5,5 \text{ mg.l}^{-1}$).

Schopnost produkce putrescinu, kadaverinu a histaminu u *Staphylococcus pasteurii* 19/1 při 6, 12 a 30 °C nebyla ne/přítomností kyslíku výrazněji ovlivněna. Stejný závěr lze konstatovat i u vlivu O₂ na množství vytvořených polyaminů – spermidinu a sperminu.

5.3.7 Statistické hodnocení produkce biogenních aminů

Vhodným nelineárním modelem regresní analýzy pro hodnocení kinetiky produkce BA za sledování vlivu různých faktorů (teplota, pH, NaCl, O₂/-O₂) se stal tříparametrový Gompertzův model, který je graficky znázorněn v Příloze III. Byly hodnoceny pouze dva BA (fenyletylamin a tyramin), protože pouze u nich byla zjištěna dostatečně vysoká koncentrace pro statistické hodnocení. Veškerá data jsou uvedena v Příloze III. Parametry Gompertzova modelu byly v případě kultivace při 6 °C velmi nízké a nebylo možné je přesně vypočítat, a to především z toho důvodu, že i po 14–ti dnech došlo k nízké produkci BA. Tato kultivační teplota byla zvolena z důvodu zjištění a porovnání produkce BA při chladírenské teplotě a dalších teplotách (vyšší teplota, při které mohou být skladovány potraviny a optimální růstová teplota pro testovaný kmen). I když při této teplotě byl zaznamenán růst testovaných kmenů, včetně produkce BA, lze poznamenat, že tak dlouhou dobu by nebylo možné čerstvou potravinu (např. maso) při této teplotě skladovat, pokud by nebyla ošetřena jiným zákrokem zabráňujícím růstu nežádoucích mikroorganismů.

Detailní analýza statistických dat je níže popsána pro *Enterococcus faecium* M2C, analýzy ostatních kmenů byly velmi podobné. Hodnota parametru A u fenyletylaminu byla hodnocena v čase pouze u teplot 12 a 30 °C. Produkce při 6 °C byla nižší než 10 mg.l⁻¹ a s rostoucím pH se nezvyšovala. Nejvyšší množství fenyletylaminu bylo tvořeno při 30 °C, pH 6, 2 % NaCl v anaerobním prostředí. Fenyletylamin byl výrazně méně produkován při pH 7. Obecně je možno shrnout, že v prostředí 6% NaCl (w/v) se tvořilo mnohem více fenyletylaminu při pH 5 než při pH 6. Avšak v prostředí s menším množstvím přidaného NaCl byl prokázán opačný trend. Tyto závěry lze vyvodit pro aerobní i anaerobní prostředí. Množství fenyletylaminu rostlo za anaerobních podmínek více než za aerobních při 30 °C, pH 6 i 7. Na druhou stranu pro pH 5 tento trend pozorován nebyl. Vliv NaCl není tak jednoznačný, proto nelze uvést generalizovaný závěr. Bylo prokázáno, že na hladině významnosti 5 % mají všechny sledované faktory statisticky významný vliv.

Při sledování vlivu experimentálních podmínek na parametr μ – specifickou rychlost produkce biogenního aminu (mg.l⁻¹.h⁻¹) bylo zjištěno, že na rychlost produkce PHE mělo zřejmý vliv pH, maximální růstová rychlost byla nejvyšší při pH 6 a nejnižší při pH 7. Toto zjištění platilo pro aerobní i anaerobní prostředí, stejně jako pro stanovované hodnoty koncentrací NaCl. Na hladině významnosti 5 % bylo prokázáno, že vliv všech sledovaných faktorů je statisticky významný.

Byl sledován vliv experimentálních podmínek na hodnotu parametru λ – dobu, než byla poprvé pozorována produkce daného BA (h). U parametru λ byly zjištěny vyšší hodnoty při teplotě 12 °C než 30 °C. Lze konstatovat, že toto tvrzení platí pro všechny ostatní faktory. Vliv všech faktorů byl opět vyhodnocen jako statisticky významný (P<0,05).

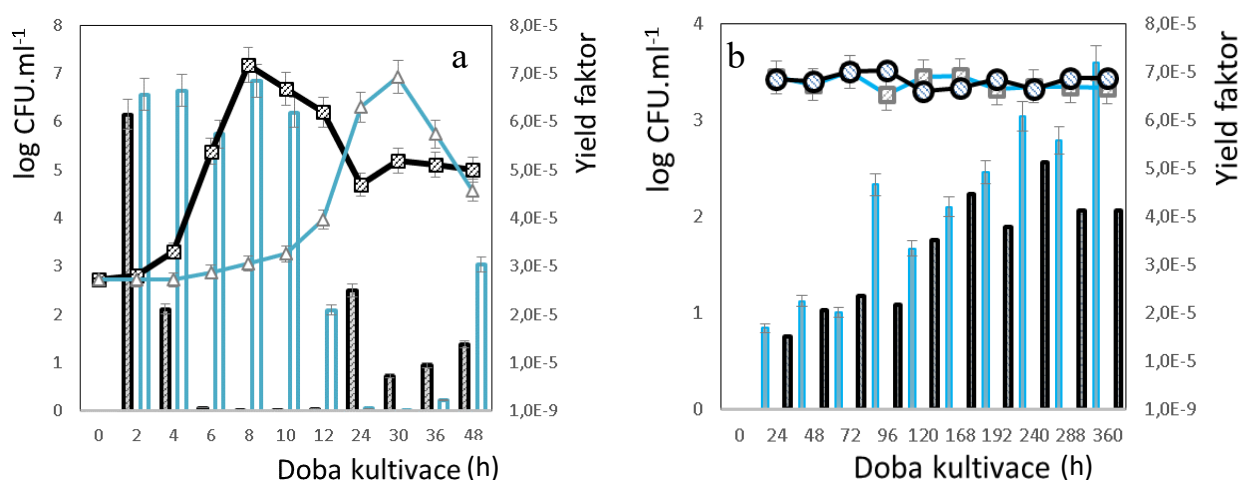
Hodnota parametru A u tyraminu byla v čase pozorována u všech tří testovaných teplot (6, 12 a 30 °C). Za zmínku stojí fakt, že tyraminu bylo vyprodukováno vždy výrazně vyšší množství než fenyletylaminu (histaminu, kadaverinu, putrescinu, sperminu a spermidinu). Absolutně nejvyšší množství tyraminu bylo naměřeno při 30 °C, pH 6, 1 % NaCl v anaerobním prostředí.

Nejnižší produkce tyraminu byla pozorována v prostředí během kultivace při 6 °C. Se zvyšujícím se pH se tyto hodnoty při teplotě 6 °C snižovaly. Zajímavý vztah byl nalezen u faktorů aerobní/anaerobní prostředí při 30 °C. V prostředí o pH 7 bylo pozorováno větší množství tyraminu za anaerobních podmínek, na rozdíl od aerobního prostředí. Kdežto při pH 5 se tvořilo více tyraminu v aerobním prostředí. Pro hodnotu pH 6 jsou vztahy nejasné. Bylo prokázáno, že na hladině významnosti 5 % mají všechny sledované faktory statisticky významný vliv.

Dále byl sledován vliv experimentálních podmínek na hodnotu parametru μ (mg.l⁻¹.h⁻¹) u TYM. Maximální růstová rychlost byla jednoznačně ovlivněna

teplotou prostředí. Bylo pozorováno, že parametr μ se zvyšuje se zvyšující teplotou nejméně o řád. Na hladině významnosti 5 % byla prokázána statistická významnost všech faktorů. Parametr λ (h) měl nejvyšší hodnotu v případě teploty 12 °C. Při teplotě 30 °C byla tato hodnota výrazněji nižší. Vliv všech sledovaných faktorů byl vyhodnocen jako statisticky významný ($P < 0,05$).

Při zpracování hodnot yield faktoru bylo zjištěno, že pokud bakterie za daných podmínek rostou, pak je produkce BA jednou buňkou nejvyšší na počátku exponenciální fáze a poté klesá (Obr. 29a). Platí to i v případě, že jsou podmínky mírně suboptimální (6 % NaCl) a lag fáze je výrazně prodloužena. V případě, že podmínky nejsou optimální pro růst buněk, pak se yield faktor v čase zvyšuje (Obr. 29b). Příklad je uveden pro kmen *Enterococcus faecium* M2C.



Obr. 29. Růstové křivky a yield faktory (sloupcový graf) u *Enterococcus faecium* M2C *in vitro* při 30 °C (a) a 6 °C (b), pH 5 za anaerobních podmínek s přidavkem 1 (černá) a 6 (modrá) % (w/v) NaCl.

5.4 Diskuze k experimentu II

Druhá část této práce se zabývala sledováním vlivu kultivační teploty, NaCl, pH a přístupu kyslíku na produkci osmi různých BA třemi kmeny enterokoků a třemi kmeny stafylokoků *in vitro*. Z výsledků je patrná důležitost sledovat produkci BA z hlediska jak kinetiky produkce, tak i statistických parametrů růstu a produkce biogenních aminů (Příloha III a IV).

Optimální podmínky kultivace pro šest studovaných kmenů byly stanoveny na základě růstových křivek a jsou v souladu s odbornou literaturou (Morandi *et al.*, 2005; Gutiérrez *et al.*, 2010; Sánchez Mainar *et al.*, 2017). Pro enterokoky i stafylokoky to bylo pH 7, bez přidavku NaCl a aerobní prostředí. Jelikož byly tyto kmeny izolovány z potravin, byly kultivovány při max. teplotě 30 °C, což je teplota simulující podmínky při porušení chladicího řetězce při distribuci a skladování potravin a zároveň teplota vhodná pro růst většiny gram pozitivních

koků. Celkový počet enterokoků byl v bujónu BHI 10^7 CFU.ml⁻¹, pro stafylokoky byla zjištěna hodnota 10^8 CFU.ml⁻¹. Za optimálních podmínek růstu sledované kmeny enterokoků a stafylokoků v médiu tvořily nejvíce tyramin a fenyletylamin. Ostatní BA byly stanoveny v množství menším než 50 mg.l⁻¹. Největší produkce jednou buňkou (yield faktor) byla pozorována na počátku exponenciální fáze. Naopak Tsai *et al.* (2005) ve své práci uvádí, že produkce histaminu je maximální až uprostřed exponenciální fáze růstové křivky histamin–produkcujících bakterií. Kim *et al.* (2002) zase publikovali, že nejvyšší množství histaminu bylo detekováno v pozdní stacionární fázi růstu bakterie *Morganella morganii* v kontaminované rybí svalovině. Mnoho autorů označuje stacionární fázi jako čas, kdy dochází k maximální dekarboxylázové aktivitě, a to především díky zvyšujícímu se stresu buněk způsobenému nedostatkem živin (Calles–Enriquez *et al.*, 2010, La Gioia *et al.*, 2011). Aktuální odborná literatura uvádí, že výsledná akumulace BA je velmi heterogenní a závislá na rodu a druhu jak kvantitativně, tak i kvalitativně (Bargossi *et al.*, 2015a,b).

Enterokoky i stafylokoky jsou schopné růstu v širokém rozmezí teplot, koncentrací soli a pH (Andrighetto *et al.*, 2001; Sarantinopoulos *et al.*, 2001; Garcia *et al.*, 2002; Gutiérrez *et al.*, 2010; Sánchez Mainar *et al.*, 2017). Optimální růstová teplota podporuje buněčný metabolismus a proliferaci buněk, stejně tak jako produkci BA. Z výsledků bylo zjištěno, že produkci BA a polyaminů kmeny rodů *Enterococcus* a *Staphylococcus* izolovaných z masa a ryb nejvíce ovlivňuje teplota. Jednoznačně bylo prokázáno, že maximální produkce byla zaznamenána při 30 °C a tato teplota statisticky významně ovlivňuje růst enterokoků i stafylokoků. U nižších teplot kultivace bylo možno predikovat vliv na zpomalení růstu buněk, avšak není možné s jistotou předvídat vliv na produkci BA jednou buňkou. Např. nejvyšší množství tryptaminu (93,9 mg.l⁻¹) bylo produkováno kmenem *S. epidermidis* 21/2 při 6 °C. Dostupná literatura neuvádí produkci tryptaminu žádným druhem rodu *Staphylococcus* v takovém množství. Dle výsledků této práce lze shrnout, že množství BA nemusí s růstem buněk v čase korelovat. Avšak dle Gardini *et al.* (2016) je přítomnost nebezpečných koncentrací BA (≥ 200 mg.l⁻¹) asociována s odpovídajícím růstem dekarboxyláza pozitivních mikroorganismů. Nicméně vysoké počty buněk produkujících dekarboxylázu nejsou dostatečnou a jedinou podmínkou k vysvětlení konečného množství BA. Pokud jsou dekarboxylační enzymy jednou syntetizovány do prostředí, produkce termostabilních BA může pokračovat i v případě, že jsou bakterie eliminovány z potravin technologickým ošetřením (Gardini *et al.*, 2016).

Pro srovnání lze využít příklad gramnegativní bakterie *Serratia marcescens*, která se také může podílet na kažení masa a ryb. Kmen *S. marcescens* CCM 303 produkuje nejvíce putrescinu a kadaverinu v teplotním rozmezí 20–30 °C. Na druhou stranu, při porovnání yield faktorů byla dekarboxylázová aktivita

jedné buňky maximální při 10 °C (Bubelová *et al.*, 2015). Pokud se jedná o vliv teploty na produkci BA v potravinách, pak např. v pacifickém sledi byla nejvyšší celková hodnota BA 1099 mg.l⁻¹ naměřena při skladování ryb při 25 °C, zatímco při 5 °C byla hodnota o řád nižší (Doeun *et al.*, 2016). Prodlužované skladování potravin v nízkých teplotách může vést k významnému hromadění BA, např. putrescinu (Paulsen a Bauer, 1997) či histaminu (Kanki *et al.*, 2007). Dle doporučení americké FDA (Food Drug Agency) by v rámci prevence tvorby histaminu měly být ryby zchlazeny ihned po výlovu na 4,4 °C (FDA, 2011). Podobně nařizuje evropská legislativa povinné chlazení ryb, produktů z ryb, korýšů a měkkýšů až k hodnotám 0 °C (Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES), 2004b). Některé bakterie mohou naopak způsobit redukcí BA v potravinách. Přítomnost *Staphylococcus xylosus* S81, startovací kultury, která netvoří biogenní aminy, ve fermentovaných masných výrobcích způsobila snížení množství tyraminu, kadaverinu a putrescinu po 21 dnech skladování (Gardini *et al.*, 2001).

Výsledky této práce vypovídají o vlivu pH na produkci BA. Zatímco nízké pH způsobilo omezení růstu sledovaných bakterií rodu *Enterococcus* a *Staphylococcus*, dekarboxylázová aktivita testovaných kmenů byla podpořena. V průběhu experimentu bylo zjištěno, že produkce BA u kmenů *E. faecium* byla významně ovlivněna hodnotou pH prostředí. Sledované kmeny *E. faecium* M2C a 5BM1 produkovaly významnější množství TYM a PHE při pH 5 – 6, kdy s rostoucí teplotou rostla produkce v oblasti pH 6, zatímco při teplotách kultivace pod 12 °C byla produkce TYM i PHE vyšší při pH 5. Při 30 °C nemělo pH významný vliv na produkci TYM u *Enterococcus* sp. Avšak při 6 °C byl patrný trend navýšení produkce tyraminu i fenyletylaminu při pH 6. Při vyšší teplotě bylo patrné, že s rostoucím pH klesala produkce PHE. Na produkci CAD, SPM a SPD pH nemělo významný vliv při teplotách pod 12 °C. Při 30 °C byl patrný úbytek sperminu v kyselejších prostředí (pH 5), který se zde zřejmě přeměňuje pomocí spermintransferáz a polyaminoxidáz na putrescin (Benkerroum, 2016; del Rio *et al.*, 2016). Del Rio *et al.* (2016) taktéž popisují pozitivní vliv nižšího pH na produkci putrescinu.

U jednotlivých druhů stafylokoků byly trendy produkce BA mnohem odlišnější. Kmen *S. pasteurii* 19/1 produkoval při vyšším pH (pH 7) 2,5krát více TYM než při pH 5. Avšak fenyletylamin byl produkován 6krát více při pH 5 oproti pH 7 (při 30 °C). Produkce kadaverinu a putrescinu nebyla ovlivněna změnou pH. *S. hominis* 20/2 vykazoval klesající produkci BA s poklesem pH. U produkčního kmene *S. epidermidis* 21/2 nebyl pozorován vliv pH na produkci TYM. Produkce tryptaminu byla nejvýznamněji ovlivněna při pH 6, kdy byla velmi výrazně snížena jeho produkce až o 50 %. Produkce histaminu a kadaverinu nebyla hodnotou pH významněji ovlivněna, rovněž ani na produkci polyaminů nemělo pH velký vliv. Nejnovější literatura popisuje rod *Staphylococcus* jako významného producenta tyraminu a fenyletylaminu

(Lauková *et al.*, 2017). Benavent *et al.* (2016) označili druh *S. epidermidis* (izolovaný z vína) za producenta histaminu, putrescinu a kadaverinu. *S. epidermidis* snáší velmi nízké hodnoty pH. Tyramin, putrescin a kadaverin jsou běžně sledované BA ve fermentovaných masných výrobcích a jejich produkce ($\geq 1000 \text{ mg.l}^{-1}$) je běžná již po 8 hodinách kultivace (Benavent *et al.*, 2016).

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

Součástí experimentu bylo sledování vlivu NaCl na produkci BA. Chlorid sodný je obsažený téměř v každé fermentované potravíně. Běžně potraviny živočišného původu obsahují 2 – 3 % NaCl (Marth a Steele, 2001). Koncentrace soli významně ovlivňuje nejen růst mikroorganismů, ale také schopnost buněk produkovat BA. Nejvíce byly sledované BA produkovány v médiu s přidávkem NaCl do 3 % (w/v). Avšak produkce jednou buňkou byla vyšší v médiu nad 3 % NaCl (w/v). U *S. pasteurii* byla se zvyšující se koncentrací NaCl snížena produkce tyraminu o 33 % při 30 °C a se snižující se teplotou a zvyšující koncentrací NaCl produkce klesala až osminásobně. Koncentrace nad 3 % NaCl (w/v) zpomalovala produkci všech BA. Obecně je známo, že zvyšující se koncentrace NaCl přispívá k redukcii množství BA v potravinách, zejména tím, že snižuje počet mikroorganismů a také metabolickou aktivitu dekarboxyláza pozitivních bakterií. Na druhou stranu Gardini *et al.* (2016) popisují, že se zvyšování obsahu soli v potravinách neslučuje s aktuálním trendem snižování obsahu soli v potravinách. Dle studie Bargossi *et al.* (2015b) nebyla zjištěna výrazná ztráta aktivity u čisté tyrozindekarboxylázy až do 10 %. Produkce BA v médiích s vyšší koncentrací NaCl byla rovněž zjištěna i v dalších studiích (Greif *et al.*, 2006; Emborg a Dalgaard, 2008). Zvýšenou produkci tyraminu v médiu s vyšší koncentrací NaCl lze vysvětlit tím, že Na^+ se podílejí na regulaci intracelulárního pH. Tyto ionty jsou důležité v antiportovém systému, takže hrají zásadní roli v dekarboxylační cestě tyraminu. Dekarboxylační reakce slouží buňkám jako alternativní zdroj energie i v nepříznivých podmínkách kultivace (Molenaar *et al.*, 1993; Pessione *et al.*, 2009). Oproti tomu Gardini *et al.* (2001; 2008) zaznamenali vyšší produkci *in vitro* při nižších koncentracích NaCl.

U laktokoků byla zjištěna nejvyšší produkce tyraminu při 2 % NaCl (w/v), na druhou stranu aero/anaerobióza množství tyraminu v prostředí vůbec neovlivňovala (Buňková *et al.*, 2011). Koncentrace NaCl, která je nezbytná pro kontrolu histamin–produkcujících kmenů druhů *Photobacterium phosphoreum* a *Morganella morganii*, je více než 5 % (Emborg a Dalgaard, 2008).

Dále byl sledován vliv an/aerobního prostředí při kultivaci na tvorbu BA. V prvních hodinách kultivace nebyl zaznamenán vliv prostředí na produkci žádného ze sledovaných BA u fakultativně anaerobních enterokoků. K výraznějšímu navýšení produkce došlo při 30 °C až po 48 hodinách anaerobní kultivace u obou testovaných kmenů *E. faecium*. Při teplotách nižších než 12 °C nedocházelo k patrnému vlivu O₂ na produkci TYM. Produkce PHE po 360 hodinách kultivace byla navýšena pouze při anaerobní kultivaci na 30–ti násobek. Putrescin, spermin a spermidin byly produkovány spíše za aerobních podmínek, a to pouze při kultivaci při 6 °C. Množství vyprodukovaného TYM i PHE bylo vždy v anaerobním prostředí vyšší minimálně o 10 %. U rodu *Staphylococcus* byla produkce BA vyšší pouze pro TYM v anaerobním prostředí. Při sledování modelových podmínek anaerobního prostředí na produkci BA u *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus brevis* (Marcobal *et al.*, 2006), *Lactobacillus curvatus* (Bover–Cid *et al.*, 2008), *Lactococcus lactis* (Buňková *et al.*, 2011), *Enterococcus durans* (Buňková *et al.*, 2012) byla zjištěna vyšší produkce těchto toxických sloučenin v podmínkách bez přístupu O₂. Lze tedy odvodit závěry, že BA jsou produkovány více v anaerobním prostředí, což potvrzuje např. studie Doeun *et al.* (2016), kde byl pozorován nárůst tyraminu (90 mg.l⁻¹) a sperminu (62 mg.l⁻¹) ve vakuově baleném sledí od čtrnáctého dne skladování při 5 °C. Již dlouho je známo, že koncentrace tyraminu, putrescinu a kadaverinu se v průběhu skladování masa běžně zvyšuje, kdežto množství sperminu a spermidinu zůstává konstantní (Sayem–El–Daher *et al.*, 1985). Navíc, zvýšení putrescinu je v dobré korelaci s rozvojem aerobní mezofilní i psychrotrofní mikroflóry, zatímco kadaverin se významně zvyšuje pouze v poslední fázi kažení masa.

Vliv na produkci BA má zajisté i přídavek prekurzorů. V této práci byla sledována produkce BA v médiu BHI s přídavkem prekurzorů (aminokyselin argininu, ornitinu, histidinu, tyrozinu, lyzinu) v koncentraci 0,2 % (w/v). U enterokoků izolovaných z rozličných rostlinných materiálů však bylo prokázáno, že tyramin je tvořen v médiu BHI i v případě, že nebyl přidán tyrozin. V případě přídavku 0,1 % (w/v) tyrozinu se produkce tyraminu do média zvýšila zhruba sedmkrát (Gatto *et al.*, 2016).

Ke statistickému zpracování naměřených dat byl použit nelineární tříparametrový model dle Gompertze. Bylo zjištěno, že studované kmeny rodu *Enterococcus* a *Staphylococcus* produkují za změny teploty, pH a koncentrace NaCl a O₂ statisticky významná množství pouze dvou biogenních aminů – fenyletylaminu a tyraminu. Pro fenyletylamin platí, že statisticky významně více

je produkován při pH 5 a 6 % (w/v) NaCl než při optimálním pH 7, zatímco při nižší koncentraci NaCl je produkce vyšší při optimálním pH. Co se týká ostatních sledovaných BA (histamin, kadaverin, putrescin, spermin, spermidin a tryptamin) nebyl v čase pozorován žádný rostoucí trend (max. průměrné koncentrace byly menší než 50 mg.l^{-1}).

ZÁVĚR

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

Bylo zjištěno, že maso králíka a ryb může být kontaminováno mikroflórou s bohatou produkcí biogenních aminů, což může podstatně ohrozit bezpečnost těchto surovin. Nejčastěji byla zjištěna produkce tyraminu, fenyletylaminu, kadaverinu a putrescinu. Produkce histaminu byla zjištěna u jednoho kmene *Staphylococcus warneri*. Poprvé byla potvrzena produkce putrescinu, fenyletylaminu, kadaverinu a tyraminu u *S. haemolyticus*. Produkce sperminu a spermidinu nebyla zjištěna u žádného z testovaných kmenů. Poprvé byla také odhalena produkce kadaverinu u izolátů *Enterococcus* sp. a *Enterococcus faecium*. Pouze dva izoláty *E. faecium* (M1b; M7C) lze označit jako dekarboxyláza negativní.

Všechny studované enterokoky produkovaly převážně tyramin, fenyletylamin a putrescin. Tyramin byl produkován ve velmi vysokých množstvích, celkem 12 kmenů tvořilo více než 1000 mg.l^{-1} . Fenyletylamin produkovalo 9 kmenů enterokoků do $50\text{--}100 \text{ mg.l}^{-1}$. Putrescin nad 100 mg.l^{-1} produkovaly dva kmeny *Enterococcus faecium*. Bylo zjištěno, že se produkce aminů liší v rámci kmenů stejného druhu.

Všechny tři kmeny sledovaných enterokoků (*Enterococcus faecium* M2C; *Enterococcus faecium* 5BM1; *Enterococcus* sp. M5a) vykazovaly podobné chování při všech sledovaných faktorech ovlivňujících růst. Množství produkováných aminů záviselo na daných faktorech.

Sledované kmeny *Enterococcus faecium* 5BM1 a M2C byly schopné produkce tyraminu, sperminu, fenyletylaminu, kadaverinu a putrescinu. Dekarboxylázová aktivita kmene *E. faecium* 5BM1 byla vyšší při $30 \text{ }^\circ\text{C}$ než při $6 \text{ }^\circ\text{C}$. 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 aminokyselin při chladírenských teplotách $6 \text{ }^\circ\text{C}$ a nízkém pH 5.

Bylo zjištěno, že stafylokoky jsou významnějšími producenty biogenních aminů (tyraminu, fenyletylaminu, kadaverinu a putrescinu) než enterokoky, které produkují tyramin a fenyletylamin, ojedinele putrescin. Ve skupině stafylokoků bylo testováno pět různých druhů – *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. hominis*, *S. pasteurii*, *S. warneri*. Nejvyšší produkce biogenních aminů byla zaznamenána u *S. warnerii* a *S. hominis*. Nicméně ostatní tři druhy byly

vyjímečně také schopny významné produkce biogenních aminů ($\geq 100 \text{ mg.l}^{-1}$). Množství vyšší než jsou bezpečnostní limity, byla zjištěna pro tyramin, kadaverin, putrescin u všech studovaných druhů stafylokoků. Na druhou stranu, žádný ze studovaných kmenů stafylokoků a enterokoků neprodukoval za daných podmínek kultivace ($30 \text{ }^\circ\text{C}/48 \text{ hodin}$) histamin, tryptamin, spermin a spermidin v koncentracích vyšších než 2 mg.l^{-1} .

Na základě statistického vyhodnocení výsledků lze konstatovat, že:

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

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

PŘÍNOS PRÁCE PRO VĚDU A PRAXI

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

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

V oblasti praktického použití lze vidět přínos dizertační práce zejména v následujících aspektech:

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

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- ALVES, Juliane, Elisa Yoko HIROOKA a Tereza Cristina Rocha Moreira de OLIVEIRA. 2016. Development of a multiplex real-time PCR assay with an internal amplification control for the detection of *Campylobacter spp.* and *Salmonella spp.* in chicken meat. *LWT – Food Science and Technology*. **72**, 175-181. DOI: 10.1016/j.lwt.2016.04.051. ISSN 00236438.
- ANCÍN-AZPILICUETA, Carmen, Ana GONZÁLEZ-MARCO a Nerea JIMÉNEZ-MORENO. 2008. Current Knowledge about the Presence of Amines in Wine. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. **48**(3), 257-275. DOI: 10.1080/10408390701289441. ISSN 1040-8398.
- ANDRIGHETTO, Christian, Edo KNIJFF, Angiolella LOMBARDI, Sandra TORRIANI, Marc VANCANNEYT, Karel KERSTERS, Jean SWINGS a Franco DELLAGLIO. 2001. Phenotypic and genetic diversity of enterococci isolated from Italian cheeses. *Journal of Dairy Research*. **68**(2), 303-316. DOI: 10.1017/S0022029901004800. ISSN 00220299.
- ASKAR, Abbas, a Howard TREPTOW, 1986. Biogene Amine in Lebensmitteln — Vorkommen, Bedeutung und Bestimmung. 197 Seiten, 34 Abb., 47 Tab. Verlag Eugen Ulmer. Stuttgart 1986. Preis. *Food / Nahrung*. **32**(4), 420-420. DOI: 10.1002/food.19880320433. ISSN 0027769x.
- BANDOUNAS, Luaine *et al.*, 2011. Redundancy in putrescine catabolism in solvent tolerant *Pseudomonas putida* S12. *Journal of Biotechnology*. **154**(1), 1-10. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2011.04.005. ISSN 01681656.
- BARDOT, Olivier. *et al.*, 1993. PPAR-RXR Heterodimer Activates a Peroxisome Proliferator Response Element Upstream of the Bifunctional Enzyme Gene. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **192**(1), 37-45. DOI: 10.1006/bbrc.1993.1378. ISSN 0006291x.
- BARGOSSO, Eleonora, Fausto GARDINI, Veronica GATTO, Chiara MONTANARI, Sandra TORRIANI a Giulia TABANELLI. 2015a. The Capability of Tyramine Production and Correlation between Phenotypic and Genetic Characteristics of *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* Strains. *Frontiers in Microbiology*. **6**, -. DOI: 10.3389/fmicb.2015.01371. ISSN 1664-302x.
- BARGOSSO, Eleonora, Giulia TABANELLI, Chiara MONTANARI, Rosalba LANCIOTTI, Veronica GATTO, Fausto GARDINI a Sandra TORRIANI. 2015b. Tyrosine decarboxylase activity of enterococci grown in media with different nutritional potential: tyramine and 2-phenylethylamine accumulation and tyrDC gene expression. *Frontiers in Microbiology*. **6**. DOI: 10.3389/fmicb.2015.00259. ISSN 1664-302x.

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

BELGACEM, Zouhaier Ben, Hikmate ABRIOUEL, Nabil Ben OMAR, Rosario LUCAS, Magdalena MARTÍNEZ-CANAMERO, Antonio GÁLVEZ a Mohamed MANAI. 2010. Antimicrobial activity, safety aspects, and some technological properties of bacteriocinogenic *Enterococcus faecium* from artisanal Tunisian fermented meat. *Food Control*. **21**(4), 462-470. DOI: 10.1016/j.foodcont.2009.07.007. ISSN 09567135.

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

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

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

BERRY, Mark. 2007. The Potential of Trace Amines and Their Receptors for Treating Neurological and Psychiatric Diseases. *Reviews on Recent Clinical Trials*. **2**(1), 3-19. DOI: 10.2174/157488707779318107. ISSN 15748871.

BEVILACQUA, Antonio, Clelia ALTIERI, Maria Rosaria CORBO, Milena SINIGAGLIA a Labia Irène Ivette OUOBA. 2010. Characterization of Lactic Acid Bacteria Isolated from Italian Bella di Cerignola Table Olives: Selection of Potential Multifunctional Starter Cultures. *Journal of Food Science*. **75**(8), M536-M544. DOI: 10.1111/j.1750-3841.2010.01793.x. ISSN 00221147.

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

BHARDWAJ, Arun, Hittu GUPTA, Suman KAPILA, Gurpreet KAUR, Shilpa VIJ a Ravinder Kumar MALIK. 2010. Safety assessment and evaluation of probiotic potential of bacteriocinogenic *Enterococcus faecium* KH 24 strain under in vitro and in vivo conditions. *International Journal of Food Microbiology*. **141**(3), 156-164. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2010.05.001. ISSN 01681605.

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

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

BOVER-CID, Sara, Teresa HERNÁNDEZ-JOVER, M. Jesús MIGUÉLEZ-ARRIZADO a M. Carmen VIDAL-CAROU. 2003. Contribution of contaminant enterobacteria and lactic acid bacteria to biogenic amine accumulation in spontaneous fermentation of pork sausages. **216**(6), 477-482. DOI: 10.1007/s00217-003-0691-6.

BUBELOVÁ, Zuzana, František BUŇKA, Monika TAŤÁKOVÁ, Kateřina ŠTAJNOCHOVÁ, Khatantuul PUREVDORJ a Leona BUŇKOVÁ. 2015. Effects of temperature, pH and NaCl content on in vitro putrescine and cadaverine production through the growth of *Serratia marcescens* CCM 303. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*. **50**(11), 797-808. DOI: 10.1080/03601234.2015.1058097. ISSN 0360-1234.

BUDIN-VERNEUIL, Aurélie, Emmanuelle MAGUIN, Yanick AUFFRAY, Dusko S EHRlich a Vianney PICHEREAU. 2006. Genetic structure and transcriptional analysis of the arginine deiminase (ADI) cluster in *Lactococcus lactis* MG1363. *Canadian Journal of Microbiology*. **52**(7), 617-622. DOI: 10.1139/w06-009. ISSN 0008-4166.

BUŇKOVÁ, Leona, František BUŇKA, Eva POLLAKOVÁ, Tereza PODEŠVOVÁ a Vladimír DRÁB. 2011. The effect of lactose, NaCl and an aero/anaerobic environment on the tyrosine decarboxylase activity of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* and *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. *International Journal of Food Microbiology*. **147**(2), 112-119. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2011.03.017. ISSN 01681605.

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

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

- BUŇKOVÁ, Leona, František BUŇKA, Vladimír DRÁB, Stanislav KRÁČMAR a Vlastimil KUBÁŇ. 2012. Effects of NaCl, lactose and availability of oxygen on tyramine production by the *Enterococcus durans* CCDM 53. *European Food Research and Technology.*, **234**(6), 973-979. DOI: 10.1007/s00217-012-1714-y. ISSN 1438-2377.
- BURDYCHOVÁ, Radka a Tomas KOMPRDA. 2007. Biogenic amine-forming microbial communities in cheese. *FEMS Microbiology Letters.* **276**(2), 149-155. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2007.00922.x. ISSN 03781097.
- CACHALDORA, Aida, Sonia FONSECA, Inmaculada FRANCO a Javier CARBALLO. 2013. Technological and safety characteristics of Staphylococcaceae isolated from Spanish traditional dry-cured sausages. *Food Microbiology.* **33**(1), 61-68. DOI: 10.1016/j.fm.2012.08.013. ISSN 07400020.
- CALLEJÓN, Silvio, Rafael SENDRA, Sergi FERRER a Isabel PARDO. 2016. Cloning and characterization of a new laccase from *Lactobacillus plantarum* J16 CECT 8944 catalyzing biogenic amines degradation. *Applied Microbiology and Biotechnology.* **100**(7), 3113-3124. DOI: 10.1007/s00253-015-7158-0. ISSN 0175-7598.
- CALLES-ENRIQUEZ, M., B. H. ERIKSEN, P. S. ANDERSEN, F. P. RATTRAY, A. H. JOHANSEN, M. FERNANDEZ, V. LADERO a M. A. ALVAREZ. 2010. Sequencing and Transcriptional Analysis of the *Streptococcus thermophilus* Histamine Biosynthesis Gene Cluster: Factors That Affect Differential *hdcA* Expression. *Applied and Environmental Microbiology.* **76**(18), 6231-6238. DOI: 10.1128/AEM.00827-10. ISSN 0099-2240.
- CALZADA, Javier, Ana DEL OLMO, Antonia PICON, Pilar GAYA a Manuel NUNEZ. 2013. Reducing Biogenic-Amine-Producing Bacteria, Decarboxylase Activity, and Biogenic Amines in Raw Milk Cheese by High-Pressure Treatments. *Applied and Environmental Microbiology.* **79**(4), 1277-1283. DOI: 10.1128/AEM.03368-12. ISSN 0099-2240.
- CAPOZZI, Vittorio, Victor LADERO, Luciano BENEDEUCE, *et al.* 2011. Isolation and characterization of tyramine-producing *Enterococcus faecium* strains from red wine. *Food Microbiology.* **28**(3), 434-439. DOI: 10.1016/j.fm.2010.10.005. ISSN 07400020.
- CEBRIÁN, Rubén, Alberto BAÑOS, Eva VALDIVIA, Rubén PÉREZ-PULIDO, Manuel MARTÍNEZ-BUENO a Mercedes MAQUEDA. 2012. Characterization of functional, safety, and probiotic properties of *Enterococcus faecalis* UGRA10, a new AS-48-producer strain. *Food Microbiology.* **30**(1), 59-67. DOI: 10.1016/j.fm.2011.12.002. ISSN 07400020.
- CORUZZI, Gabriella, Giuseppina. MORINI, Maristella ADAMI a Daniela GRANDI. 2001. Role of histamine H-3 receptors in the regulation of gastric

functions. *Journal of Physiology and Pharmacology*. **52**(4), 539-553. ISSN 0867-5910.

COSENTINO, Sofia, Maria Barbara PISANO, Arianna CORDA, Maria Elisabetta FADDA a Carla PIRAS. 2004. Genotypic and technological characterization of enterococci isolated from artisanal Fiore Sardo cheese. *Journal of Dairy Research*. **71**(4), 444-450. DOI: 10.1017/S002202990400041X. ISSN 0022-0299.

DABROWSKI, Waldemar M. a Zdzisław E. SIKORSKI. c2005. *Toxins in food*. Boca Raton, FL: CRC Press. ISBN 0849319048.

DADÁKOVÁ, Eva, Martin KŘÍŽEK a Tamara PELIKÁNOVÁ. 2009. Determination of biogenic amines in foods using ultra-performance liquid chromatography (UPLC). *Food Chemistry*. **116**(1), 365-370. DOI: 10.1016/j.foodchem.2009.02.018. ISSN 03088146.

DAHER, N. SAYEM EL a R. E. SIMARD. 1985. Putrefactive Amine Changes in Relation to Microbial Counts of Ground Beef During Storage. *Journal of Food Protection*. **48**(1), 54-58. DOI: 10.4315/0362-028X-48.1.54. ISSN 0362-028x.

DANDRIFOSSE, Guy, Olivier PEULEN, N. El KHEFIF, Patricia DELOYER, Anne Catherine DANDRIFOSSE a Christian GRANDFILS. 2000. Are milk polyamines preventive agents against food allergy? *Proceedings of the Nutrition Society*. **59**(01), 81-86. DOI: 10.1017/S0029665100000100. ISSN 0029-6651.

DAPKEVICIUS, Maria de Lurdes Enes, M. J. Robert NOUT, Frank M. ROMBOUTS, Jacques H. HOUBEN a Wieke WYMENGA. 2000. Biogenic amine formation and degradation by potential fish silage starter microorganisms. *International Journal of Food Microbiology*. **57**(1-2), 107-114. DOI: 10.1016/S0168-1605(00)00238-5. ISSN 01681605.

DEABES, Mohamed M., Samir A. AHMED, Hayam A. MANSOUR, Laila A. MOHAMED a Doha A. SALAH EL DIN. 2013. Liquid chromatographic determination of histamine in traditionally salted, smoked and frozen fish with relation to microbial load. *Toxicology Letters*. **221**, S122-S123. DOI: 10.1016/j.toxlet.2013.05.218. ISSN 03784274.

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

DEL RIO, Beatriz, Begoña REDRUELLO, Victor LADERO, Maria FERNANDEZ, Maria Cruz MARTIN a Miguel A. ALVAREZ. 2016. Putrescine production by *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CECT 8666 is reduced by NaCl via a decrease in bacterial growth and the repression of the genes involved

in putrescine production. *International Journal of Food Microbiology*. **232**, 1-6. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2016.05.010. ISSN 01681605.

DEL RIO, Beatriz, Victor LADERO, Begoña REDRUELLO, Daniel M. LINARES, Maria FERNÁNDEZ, Maria Cruz MARTÍN a Miguel A. ALVAREZ. 2015. Lactose-mediated carbon catabolite repression of putrescine production in dairy *Lactococcus lactis* is strain dependent. *Food Microbiology*. **48**, 163-170. DOI: 10.1016/j.fm.2014.11.018. ISSN 07400020.

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

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

DUAN, Zhi, Terese Holst HANSEN, Tina Beck HANSEN, Paw DALGAARD a Susanne KNØCHEL. 2016. Predicting outgrowth and inactivation of *Clostridium perfringens* in meat products during low temperature long time heat treatment. *International Journal of Food Microbiology*. **230**, 45-57. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2016.03.019. ISSN 01681605

DUFOUR, Christelle, Guy DANDRIFOSSE, Pierre Ph. F. X. FORGET, F. VERMESSE, Nadine ROMAIN a P. LEPOINT. 1988. Spermine and spermidine induce intestinal maturation in the rat. *Gastroenterology*. **95**(1), 112-116.

EL-NOUR, Kholoud, M. Abou, E. T. Abdel, SALAM, H. M. SOLIMAN a Adel S. ORABI. 2017. Gold Nanoparticles as a Direct and Rapid Sensor for Sensitive Analytical Detection of Biogenic Amines. *Nanoscale Research Letters*. **12**(1). DOI: 10.1186/s11671-017-2014-z. ISSN 1931-7573.

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

EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL., 2013. *Antimicrobial resistance surveillance in Europe: annual report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net)*. Stockholm: ECDC. ISBN 9789291935116.

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

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

FADDA, Silvina G., Vignolo, Graciela VIGNOLO a Guillermo OLIVER. 2001. Tyramine degradation and tyramine/histamine production by lactic acid bacteria and *Kocuria* strains. *Biotechnology Letters.* 23(24), 2015-2019. DOI: 10.1023/A:1013783030276. ISSN 01415492.

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

FERENCÍK, Maroš. 1970. Formation of histamine during bacterial decarboxylation of histidine in the flesh of some marine fishes. *Journal of Hygiene Epidemiology Microbiology and Immunology.* **14**(1), 52-60. ISSN 00221732.

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

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

FOSTER, John W. 2004. *Escherichia coli* acid resistance: tales of an amateur acidophile. *Nature Reviews Microbiology.* **2**(11), 898-907. DOI: 10.1038/nrmicro1021. ISSN 1740-1526.

FOULQUIÉ, Moreno, M.R., P. Sarantinopoulos, P., Tsakalidou, E. & De Vuyst, L. 2006. The role and application of enterococci in food and health. *International Journal of Food Microbiology.* **106**(1), 1-24. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2005.06.026. ISSN 01681605.

FRANZ, Charles M.A.P. 2003. Enterococci in foods — a conundrum for food safety. *International Journal of Food Microbiology.* **88**(2-3), 105-122. DOI: 10.1016/S0168-1605(03)00174-0. ISSN 01681605.

FRANZ, Charles M.A.P. a Wilhelm Heinrich HOLZAPFEL. 2006. Enterococci. *Emerging Foodborne Pathogens*. Cambridge: Elsevier, s. 557. DOI: 10.1533/9781845691394.2.557. ISBN 9781855739635.

FRANZ, Charles M.A.P., Melanie HUCH, Hikmate ABRIOUEL, Wilhelm HOLZAPFEL a Antonio GÁLVEZ. 2011. Enterococci as probiotics and their implications in food safety. *International Journal of Food Microbiology*, **151**(2), 125-140. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2011.08.014. ISSN 01681605.

FURUTANI, Ayumi, Hisashi MATSUBARA, Satoru ISHIKAWA a Masataka SATOMI. 2013. Behavior of histamine-producing bacteria in shimesaba, raw mackerel salted and marinated in vinegar during processing and storage at various temperatures. *Fisheries Science*. **79**(4), 725-733. DOI: 10.1007/s12562-013-0643-4. ISSN 0919-9268.

GALE, E. F. 1946. The bacterial amino-acid decarboxylases. *Adv. Enzymol.* 6, 1.

GARCÍA, M.C., M.J. RODRÍGUEZ, A BERNARDO, M.E TORNADIJO a J CARBALLO. 2002. Study of enterococci and micrococci isolated throughout manufacture and ripening of San Simón cheese. *Food Microbiology*. **19**(1), 23-33. DOI: 10.1006/fmic.2001.0457. ISSN 07400020.

GARDINI, Fausto, Maria MARTUSCELLI, Marisa Carmela CARUSO, Fernanda GALGANO, Maria Antonietta CRUDELE, Fabio FAVATI, Maria Elisabetta GUERZONI a Giovanna SUZZI. 2001. Effects of pH, temperature and NaCl concentration on the growth kinetics, proteolytic activity and biogenic amine production of *Enterococcus faecalis*. *International Journal of Food Microbiology*. **64**(1-2), 105-117. DOI: 10.1016/S0168-1605(00)00445-1. ISSN 01681605.

GARDINI, Fausto, Sara BOVER-CID, Rosanna TOFALO, Nicoletta BELLETTI, Veronica GATTO, Giovanna SUZZI a Sandra TORRIANI. 2008. Modeling the Aminogenic Potential of *Enterococcus faecalis* EF37 in Dry Fermented Sausages through Chemical and Molecular Approaches. *Applied and Environmental Microbiology*. **74**(9), 2740-2750. DOI: 10.1128/AEM.02267-07. ISSN 0099-2240. Dostupné také z:

GARDINI, Fausto, Yesim ÖZOGUL, Giovanna SUZZI, Giulia TABANELLI a Fatih ÖZOGUL. 2016. Technological Factors Affecting Biogenic Amine Content in Foods: A Review. *Frontiers in Microbiology*. 7:1218. DOI: 10.3389/fmicb.2016.01218. ISSN 1664-302x.

GATTO, Veronica, Giulia TABANELLI, Chiara MONTANARI, Valentina PRODOMI, Eleonora BARGOSI, Sandra TORRIANI a Fausto GARDINI. 2016. Tyrosine decarboxylase activity of *Enterococcus mundtii*: new insights into phenotypic and genetic aspects. *Microbial Biotechnology*., **9**(6), 801-813. DOI: 10.1111/1751-7915.12402. ISSN 17517915.

GENÇCELEP, Hüseyin, Güzin KABAN a Mükerrerem KAYA. 2007. Effects of starter cultures and nitrite levels on formation of biogenic amines in sucuk. *Meat Science*. **77**(3), 424-430. DOI: 10.1016/j.meatsci.2007.04.018. ISSN 03091740.

GENNARO, Maria Carla Arla , Valentina GIANOTTI, Emílio MARENGO, Daniele PATTONO a Rosa Maria TURI. 2003. A chemometric investigation of the effect of the cheese-making process on contents of biogenic amines in a semi-hard Italian cheese (Toma). *Food Chemistry*. **82**(4), 545-551. DOI: 10.1016/S0308-8146(03)00009-8. ISSN 03088146.

GOODFELLOW, M., William Barnaby WHITMAN a Aidan C. PARTE (eds.). c2011. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. 2nd ed. New York, N.Y.: Springer. ISBN 978-0-387-95043-3.

GREIF Gabriel, GREIFOVÁ Mária a Jolana KAROVIČOVÁ. 2006. Effects of NaCl concentration and initial pH value on biogenic amine formation dynamics by *Enterobacter* spp. bacteria in model conditions. *Journal of Food and Nutrition Research* 45:21–29.

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

GUILLARD, Valérie, Olivier COUVERT, Valérie STAHL, *et al.* 2016. Validation of a predictive model coupling gas transfer and microbial growth in fresh food packed under modified atmosphere. *Food Microbiology*. **58**, 43-55. DOI: 10.1016/j.fm.2016.03.011. ISSN 07400020.

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

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

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

HERNÁNDEZ-JOVER, Teresa, María IZQUIERDO-PULIDO, M. Teresa VECIANA-NOGUÉS a M. Carmen VIDAL-CAROU. 1996. Biogenic Amine Sources in Cooked Cured Shoulder Pork. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **44**(10), 3097-3101. DOI: 10.1021/jf960250s. ISSN 0021-8561.

HOLZAPFEL, Hans-Wilhelm a J. B. Brian WOOD (eds.). 2014. *Lactic acid bacteria: biodiversity and taxonomy*. 1st ed. Chichester: Wiley Blackwell. ISBN 978-1-4443-3383-1.

HU, Yue, Zhiyong HUANG a Xia CHEN. 2014. Histamine-producing bacteria in blue scad (*Decapterus maruadsi*) and their abilities to produce histamine and other biogenic amines. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. **30**(8), 2213-2221. DOI: 10.1007/s11274-014-1642-z. ISSN 0959-3993.

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

CHAVES-LOPEZ, Clemencia, Maria DE ANGELIS, Maria MARTUSCELLI, Annalisa SERIO, Antonello PAPARELLA a Giovanna SUZZI. 2006. Characterization of the *Enterobacteriaceae* isolated from an artisanal Italian ewe's cheese (Pecorino Abruzzese). *Journal of Applied Microbiology*. **101**(2), 353-360. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2006.02941.x. ISSN 1364-5072.

CHIN, Henry K. D. a Paul Edward KOEHLER. 1986. Effect of Salt Concentration and Incubation Temperature on Formation of Histamine, Phenethylamine, Tryptamine and Tyramine During Miso Fermentation. *Journal of Food Protection*. **49**(6), 423-427. ISSN 0362-028X.

CHITTPURNA, Pradip Kumar, Umar SINGH, Dipti VERMA, Anil Kumar PINNAKA, Shanmugam MAYILRAJ a Suresh KORPOLE. 2011. *Micrococcus lactis* sp. nov., isolated from dairy industry waste. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. **61**(12), 2832-2836. DOI: 10.1099/ij.s.0.028043-0. ISSN 1466-5026.

CHONG, Cheong Yew, Fatimah ABU BAKAR, Russly Abdul RAHMAN, Jamilah BAKAR a Muhammad Zukhrufuz ZAMAN. 2014. Biogenic amines, amino acids and microflora changes in Indian mackerel (*Rastrellinger kanagurta*) stored at ambient (25–29 °C) and ice temperature (0 °C). *Journal of Food Science and Technology*. **51**(6), 1118-1125. DOI: 10.1007/s13197-012-0621-3. ISSN 0022-1155.

ICHISE, Yu-ki, Takehide KOSUGE, Maki UWATE, Taiji NAKAE a Hideaki MASEDA. 2015. Complete Genome Sequence of *Pseudomonas aeruginosa* Strain 8380, Isolated from the Human Gut. *Genome Announcements*. **3**(3), e00520-15-. DOI: 10.1128/genomeA.00520-15. ISSN 2169-8287.

IVANOVA, Natalia, Alexei SOROKIN, Iain ANDERSON, *et al.* 2003. Genome sequence of *Bacillus cereus* and comparative analysis with *Bacillus anthracis*. *Nature*. **5-1**. 423(6935), 87-91. DOI: 10.1038/nature01582. ISSN 0028-0836.

JEONG, Do-Won, Bitnara LEE, Jae-Young HER, Kwang-Geun LEE a Jong-Hoon LEE. 2016. Safety and technological characterization of coagulase-negative staphylococci isolates from traditional Korean fermented soybean foods for starter development. *International Journal of Food Microbiology*. **236**, 9-16. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2016.07.011. ISSN 01681605.

JIMÉNEZ, Esther, Susana DELGADO, Leonides FERNÁNDEZ, Natalia GARCÍA, Mar ALBÚJAR, Adolfo GÓMEZ a Juan M. RODRÍGUEZ. 2008. Assessment of the bacterial diversity of human colostrum and screening of staphylococcal and enterococcal populations for potential virulence factors. *Research in Microbiology*. **159**(9-10), 595-601. DOI: 10.1016/j.resmic.2008.09.001. ISSN 09232508.

JIMÉNEZ, Esther, Victor LADERO, Irene CHICO, *et al.* 2013. Antibiotic resistance, virulence determinants and production of biogenic amines among enterococci from ovine, feline, canine, porcine and human milk. *BMC Microbiology*. **13**(1), 288-. DOI: 10.1186/1471-2180-13-288. ISSN 1471-2180.

JØRGENSEN, Emilie A., Ulrich KNIGGE, Jørgen WARBERG a Andreas KJÆR. 2007. Histamine and the Regulation of Body Weight. *Neuroendocrinology*. 11-1, **86**(3), 210-214. DOI: 10.1159/000108341. ISSN 0028-3835.

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

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

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

KANKI, Masashi, Tomoko YODA, Teizo TSUKAMOTO a Eiichiroh BABA. 2007. Histidinedecarboxylases and their role in accumulation of histamine in tuna and dried saury. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**, 1467–1473. doi:10.1128/AEM.01907-06.

KAROVIČOVÁ, Jolana a Zlatica KOHAJDOVÁ. 2005. Biogenic Amines in Food. *Chemical Papers*. **59**(1), 70–79. ISBN 0366-6352.

KIM, S.H., R.J. PRICE, M.T. MORRISSEY, K.G. FIELD, C.I. WEI a H. AN. 2002. Histamine Production by *Morganella morganii* in Mackerel, Albacore, Mahi-mahi, and Salmon at Various Storage Temperatures. *Journal of Food*

Science. **67**(4), 1522-1528. DOI: 10.1111/j.1365-2621.2002.tb10316.x. ISSN 0022-1147.

KIMATA, Masao. 1961. The Histamine Problem. *Fish As Food*. Elsevier, s. 329. DOI: 10.1016/B978-0-12-395569-2.50016-9. ISBN 9780123955692.

KOHAJDOVÁ, Zlatica., Jolana. KAROVIČOVÁ, Gabriel. GREIF, 2008. Biogénne amíny v potravinách, *Potravinárstvo*, 2, 1, 30-49, ISSN 1337-0960.

KOMPRDA, Tomas, Radka BURDYCHOVÁ, Vlastimil DOHNAL, Olga CWIKOVÁ a Pavla SLÁDKOVÁ. 2008a. Some factors influencing biogenic amines and polyamines content in Dutch-type semi-hard cheese. *European Food Research and Technology*., **227**(1), 29-36. DOI: 10.1007/s00217-007-0688-7. ISSN 1438-2377.

KOMPRDA, Tomas, Radka BURDYCHOVÁ, Vlastimil DOHNAL, Olga CWIKOVÁ, Pavla SLÁDKOVÁ a Helena DVOŘÁČKOVÁ. 2008b. Tyramine production in Dutch-type semi-hard cheese from two different producers. *Food Microbiology*. **25**(2), 219-227. DOI: 10.1016/j.fm.2007.11.006. ISSN 07400020.

KOMPRDA, Tomáš, Pavla SLÁDKOVÁ a Vlastimil DOHNAL. 2009. Biogenic amine content in dry fermented sausages as influenced by a producer, spice mix, starter culture, sausage diameter and time of ripening. *Meat Science*. **83**(3), 534-542. DOI: 10.1016/j.meatsci.2009.07.002. ISSN 03091740.

KONINGS, Wil N., Juke, S. LOLKEMA, Henk BOLHUIS, Hendrik W. VAN VEEN, Bert POOLMAN a Arnold J. M. DRIESSEN. 1997. *Antonie van Leeuwenhoek*. **71**(1/2), 117-128. DOI: 10.1023/A:1000143525601. ISSN 00036072.

KOUTSOUMANIS, Konstantinos, Chrysoula TASSOU a George John È NYCHAS. 2010. Biogenic Amines in Foods. *Pathogens and Toxins in Foods*. American Society of Microbiology. 248. DOI: 10.1128/9781555815936.ch16. ISBN 9781555814595.

KRAUSOVÁ, Petra, Pavel KALÁČ, Martin KŘÍŽEK a Tamara PELIKÁNOVÁ. 2006. Content of biologically active polyamines in livers of cattle, pigs and chickens after animal slaughter. *Meat Science*. **73**(4), 640-644. DOI: 10.1016/j.meatsci.2006.03.005. ISSN 03091740.

KUČEROVÁ, Kateřina, Hana SVOBODOVÁ, Štěpán TŮMA, Iva ONDRÁČKOVÁ a Milada PLOCKOVÁ. 2009. Production of biogenic amines by enterococci. *Czech Journal of Science*, 27, 2: 50-55.

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*. **127**(3), 1163-1168. DOI: 10.1016/j.foodchem.2011.01.118. ISSN 03088146.

KULEY, Esmeray, Esra BALIKCI, İlyas ÖZOGUL a Derya CENGİZ. 2013. Interaction between lactic acid bacteria and food-borne pathogens on putrescine production in ornithine-enriched broth. *International Journal of Food Science*. **48**(2), 394-404. DOI: 10.1111/j.1365-2621.2012.03201.x. ISSN 09505423.

KULEY, Esmeray, Esra BALIKCI, İlyas ÖZOĞUL, Saadet GÖKDOĞAN a Fatih ÖZOĞUL. 2012. Stimulation of Cadaverine Production by Foodborne Pathogens in the Presence of *Lactobacillus*, *Lactococcus*, and *Streptococcus spp.* *Journal of Food Science*. **77**(12), M650-M658. DOI: 10.1111/j.1750-3841.2012.02825.x. ISSN 00221147.

KUNG, Hsien-Feng, Yung-Hsiang TSAI, Shih-Chih CHANG a Tang-Yao HONG. 2012. Biogenic Amine Content, Histamine-Forming Bacteria, and Adulteration of Pork in Tuna Sausage Products. *Journal of Food Protection*. **75**(10), 1814-1822. DOI: 10.4315/0362-028X.JFP-12-061. ISSN 0362028x.

LA GIOIA, Federica, Lucia RIZZOTTI, Franca ROSSI, Fausto GARDINI, Giulia TABANELLI a Sandra TORRIANI. 2011. Identification of a Tyrosine Decarboxylase Gene (*tdcA*) in *Streptococcus thermophilus* 1TT45 and Analysis of Its Expression and Tyramine Production in Milk. *Applied and Environmental Microbiology*. **77**(3), 1140-1144. DOI: 10.1128/AEM.01928-10. ISSN 0099-2240.

LADERO, Victor, Esther SÁNCHEZ-LLANA, María FERNÁNDEZ a Miguel A. ALVAREZ. 2011. Survival of biogenic amine-producing dairy LAB strains at pasteurisation conditions. *International Journal of Food Science*. **46**(3), 516-521. DOI: 10.1111/j.1365-2621.2010.02508.x. ISSN 09505423.

LADERO, Victor, María FERNÁNDEZ, Isabel CUESTA a Miguel A. ALVAREZ. 2010b. Quantitative detection and identification of tyramine-producing enterococci and lactobacilli in cheese by multiplex qPCR. *Food Microbiology*. **27**(7), 933-939. DOI: 10.1016/j.fm.2010.05.026. ISSN 07400020.

LADERO, Victor, María FERNÁNDEZ, Marina CALLES-ENRÍQUEZ, Esther SÁNCHEZ-LLANA, Elena CAÑEDO, M. Cruz MARTÍN a Miguel A. ALVAREZ. 2012. Is the production of the biogenic amines tyramine and putrescine a species-level trait in enterococci? *Food Microbiology*. **30**(1), 132-138. DOI: 10.1016/j.fm.2011.12.016. ISSN 07400020.

LADERO, Victor, Marina CALLES-ENRIQUEZ, Maria FERNANDEZ a Miguel A. ALVAREZ. 2010a. Toxicological Effects of Dietary Biogenic Amines. *Current Nutrition*. **6**(2), 145-156. DOI: 10.2174/157340110791233256. ISSN 15734013.

LAKSHMANAN, Ramamoorthi, Robinson Jeya SHAKILA a Geevaretnam JEYASEKARAN. 2002. Survival of amine-forming bacteria during the ice storage of fish and shrimp. *Food Microbiology*. **19**(6), 617-625. DOI: 10.1006/fmic.2002.0481. ISSN 07400020.

LANDETA, Gerardo, José Antonio CURIEL, Alfonso V. CARRASCOSA, Rosario Maria MUÑOZ a Blanca D DE LAS RIVAS. 2013. Characterization of coagulase-negative staphylococci isolated from Spanish dry cured meat products. *Meat Science*. **93**(3), 387-396. DOI: 10.1016/j.meatsci.2012.09.019. ISSN 03091740.

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

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

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

LAWLEY, Richard, Laurie CURTIS a Judy DAVIS. c2012. *The food safety hazard guidebook*. 2nd ed. Cambridge: RSC. ISBN 978-1-84973-381-6.

LAZARKOVA, Zuzana, Frantisek BUNKA, Leona BUNKOVA, Pavel VALASEK, Stanislav KRACMAR a Jan HRABE. 2010. Application of Different Sterilising Modes and the Effects on Processed Cheese Quality. *Czech journal of food sciences*. 28, 3, 168-176.

LECLERCQ, Roland. 1997. Enterococci acquire new kinds of resistance. *Clinical Infectious Diseases*. **24**(1), S80-S84. ISSN 10584838.

LEHANE, Leigh a June OLLEY. 2000. Histamine fish poisoning revisited: Toxicology and Clinical Aspects. *International Journal of Food Microbiology*. **58**(1-2), 1-37. DOI: 10.1016/S0168-1605(00)00296-8. ISSN 01681605.

LERKE, Peter A, Sebastian WERNER a Steve L. TAYLOR. 1978. Scombroid Poisoning – Report of an Outbreak. *Western Journal of Medicine*. **129**(5), 381-386. ISSN 0093-0415.

LEROI, Françoise, Jean-Jacques JOFFRAUD a Florent CHEVALIER. 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*. **63**(4), 502-508. ISSN 0362-028X.

LEUSCHNER, Renata G, Martina HEIDEL a Walter P HAMMES. 1998. Histamine and tyramine degradation by food fermenting microorganisms.

International Journal of Food Microbiology. **39**(1-2), 1-10. DOI: 10.1016/S0168-1605(97)00109-8. ISSN 01681605.

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

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

LINARES, Daniel M., MaCruz MARTÍN, Victor LADERO, Miguel A. ALVAREZ a María FERNÁNDEZ. 2011. Biogenic Amines in Dairy Products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. **51**(7), 691-703. DOI: 10.1080/10408398.2011.582813. ISSN 1040-8398.

LINARES, Daniel M., María FERNÁNDEZ, M. Cruz MARTÍN a Miguel A. ÁLVAREZ. 2009. Tyramine biosynthesis in *Enterococcus durans* is transcriptionally regulated by the extracellular pH and tyrosine concentration. *Microbial Biotechnology*., **2**(6), 625-633. DOI: 10.1111/j.1751-7915.2009.00117.x. ISSN 17517907.

LINDEMANN, Lothar, Martin EBELING, Nicole A. KRATOCHWIL, James R. BUNZOW, David K. GRANDY a Marius C. HOENER. 2005. Trace amine-associated receptors form structurally and functionally distinct subfamilies of novel G protein-coupled receptors. *Genomics*. **85**(3), 372-385. DOI: 10.1016/j.ygeno.2004.11.010. ISSN 08887543.

LINSALATA, Michele a Francesco RUSSO. 2008. Nutritional factors and polyamine metabolism in colorectal cancer. *Nutrition*. **24**(4), 382-389. DOI: 10.1016/j.nut.2007.12.014. ISSN 08999007.

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

LU, Shiling, Xinglian XU, Guanghong ZHOU, Zhiyuan ZHU, Yong MENG a Yuanming SUN. 2010. Effect of starter cultures on microbial ecosystem and biogenic amines in fermented sausage. *Food Control*. **21**(4), 444-449. DOI: 10.1016/j.foodcont.2009.07.008. ISSN 09567135.

LUCAS, Patrick M., Víctor S. BLANCATO, Olivier CLAISSE, Christian MAGNI, Juke S. LOLKEMA a Aline LONVAUD-FUNEL. 2007. Agmatine deiminase pathway genes in *Lactobacillus brevis* are linked to the tyrosine

- decarboxylation operon in a putative acid resistance locus. *Microbiology*. **153**(7), 2221-2230. DOI: 10.1099/mic.0.2007/006320-0. ISSN 1350-0872.
- LUCAS, Patrick. M., Wout A. M. WOLKEN, Olivier. CLAISSE, Juke S. LOLKEMA a Aline LONVAUD-FUNEL. 2005. Histamine-Producing Pathway Encoded on an Unstable Plasmid in *Lactobacillus hilgardii* 0006. *Applied and Environmental Microbiology*. **71**(3), 1417-1424. DOI: 10.1128/AEM.71.3.1417-1424.2005. ISSN 0099-2240.
- LUTEN, Joop B., Wim BOUQUET *et al.*, 1992. Biogenic amines in fishery products: standardization methods within E. C. *Quality Assurance in the Fish Industry*, Elsevier Science Publishers, 427-439. ISSN 0167-4501.
- MAGUIRE, Janet J, Fernando Perez BARRIOCANAL a Anthony P. DAVENPORT. 2002. Are vasoconstrictor responses to tyramine in human blood vessels, in vitro, mediated by the orphan trace amine receptor, TA1? *British Journal of Pharmacology*. **137**(1), 71
- MAH, Jae-Hyung a Han-Joon HWANG. 2009. Inhibition of biogenic amine formation in a salted and fermented anchovy by *Staphylococcus xylosus* as a protective culture. *Food Control*. **20**(9), 796-801. DOI: 10.1016/j.foodcont.2008.10.005. ISSN 09567135.
- MAINTZ, Laura a Natalija NOVAK. 2007. Histamine and histamine intolerance. *American Journal of Clinical Nutrition*. **85**(5), 1185-1196. ISSN 0002-9165.
- MANSON, Janet M., Stefanie KEIS, John Maynard B. SMITH a Gregory M. COOK. 2003. Characterization of a Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecalis* (VREF) Isolate from a Dog with Mastitis: Further Evidence of a Clonal Lineage of VREF in New Zealand. *Journal of Clinical Microbiology*. **41**(7), 3331-3333. DOI: 10.1128/JCM.41.7.3331-3333.2003. ISSN 0095-1137.
- MARCOBAL, Angela, Blanca DE LAS RIVAS, José María LANDETE, Laura TABERA a Rosario MUÑOZ. 2012. Tyramine and Phenylethylamine Biosynthesis by Food Bacteria. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. **52**(5), 448-467. DOI: 10.1080/10408398.2010.500545. ISSN 1040-8398.
- MARCOBAL, Ángela, Pedro Jesús MARTÍN-ÁLVAREZ, María Victoria MORENO-ARRIBAS a Rosario MUÑOZ. 2006. A multifactorial design for studying factors influencing growth and tyramine production of the lactic acid bacteria *Lactobacillus brevis* CECT 4669 and *Enterococcus faecium* BIFI-58. *Research in Microbiology*. **157**(5), 417-424. DOI: 10.1016/j.resmic.2005.11.006. ISSN 09232508.
- MARINO, M., F. FRIGO, I. BARTOLOMEOLI a M. MAIFRENI. 2011. Safety-related properties of staphylococci isolated from food and food environments. *Journal of Applied Microbiology*. **110**(2), 550-561. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2010.04909.x. ISSN 13645072.

MARINO, Marilena, Michela MAIFRENI, Sabrina MORET a Gabriella RONDININI. 2000. The capacity of *Enterobacteriaceae species* to produce biogenic amines in cheese. *Letters in Applied Microbiology*. 31(2), 169-173. DOI: 10.1046/j.1365-2672.2000.00783.x. ISSN 0266-8254.

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

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

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

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

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

MORENO-ARRIBAS, María Victoria a M. CARMEN POLO. 2008. Occurrence of lactic acid bacteria and biogenic amines in biologically aged wines. *Food Microbiology*. 25(7), 875-881. DOI: 10.1016/j.fm.2008.05.004. ISSN 07400020.

MORGAN, David M. L. 1999, Polyamines. *Molecular Biotechnology*. 11(3), 229-250. DOI: 10.1007/BF02788682. ISSN 1073-6085.

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

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

NADON, C. A., M. Anne H ISMOND a Richard Alan Lan HOLLEY. 2001. Biogenic amines in vacuum-packaged and carbon dioxide-controlled atmosphere-packaged fresh pork stored at -1.5 degrees C. *Journal of Food Protection*®. **64**(2), 220-227. ISSN 0362028X.

NAILA, Aishath, Steve FLINT, Graham FLETCHER, Phil BREMER a Gerrit MEERDINK. 2010. Control of Biogenic Amines in Food-Existing and Emerging Approaches. *Journal of Food Science*, **75**(7), R139-R150, DOI: 10.1111/j.1750-3841.2010.01774.x. ISSN 00221147.

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

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

NAŘÍZENÍ EVROPSKÉHO PARLAMENTU A RADY (EU) 625/2017 ze dne 15. března 2017 o úředních kontrolách a jiných úředních činnostech prováděných s cílem zajistit uplatňování potravinového a krmivového práva a pravidel týkajících se zdraví zvířat a dobrých životních podmínek zvířat, zdraví rostlin a přípravků na ochranu rostlin Dostupné na: <<http://eur-lex.europa.eu>>.

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

NAŘÍZENÍ RADY (EHS) č. 315/93 ze dne 8. února 1993, kterým se stanoví postupy Společenství pro kontrolu kontaminujících látek v potravinách, které předpokládá stanovení nejvyšších přípustných množství určitých kontaminujících látek. Dostupné na: <<http://eur-lex.europa.eu>>.

NAŘÍZENÍM EVROPSKÉHO PARLAMENTU A RADY (ES) č. 178/2002, kterým se stanoví obecné zásady a požadavky potravinového práva i zásady předběžné opatrnosti. Dostupné na: <<http://eur-lex.europa.eu>>.

NEWTON, David E. c2007. *Chemistry of Drugs*. 1 st. ed. New York: Facts on File, 191 s. ISBN 08-160-5276-X.

NOU, Robert M. J. 1994. Fermented foods and food safety. *Food Research International*. **27**(3). DOI: 10.1016/0963-9969(94)90097-3. ISSN 09639969.

NTZIMANI, Athina G., Evangelos K. PALEOLOGOS, Ioannis N. SAVVAIDIS a Michael G. KONTOMINAS. 2008. Formation of biogenic amines and relation to microbial flora and sensory changes in smoked turkey breast fillets stored under various packaging conditions at 4°C. *Food Microbiology*. **25**(3), 509-517. DOI: 10.1016/j.fm.2007.12.002. ISSN 07400020.

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

PACHLOVÁ, Vendula, František BUŇKA, Leona BUŇKOVÁ, Eva WEISEROVÁ, Pavel BUDINSKÝ, Milan ŽALUDEK a Stanislav KRÁČMAR. 2011. The effect of three different ripening/storage conditions on the distribution of selected parameters in individual parts of Dutch-type cheese. *International Journal of Food Science & Technology*. **46**(1), 101-108. DOI: 10.1111/j.1365-2621.2010.02460.x. ISSN 09505423.

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

PACHLOVÁ, Vendula, František BUŇKA, Radka FLASAROVÁ, Petra VÁLKOVÁ a Leona BUŇKOVÁ. 2012. The effect of elevated temperature on ripening of Dutch type cheese. *Food Chemistry*. **132**(4), 1846-1854. DOI: 10.1016/j.foodchem.2011.12.017. ISSN 03088146.

PAULSEN, P. a Frank BAUER. 1997. Biogenic amines in fermented sausages:2. Factors influencing the formation of biogenic amines in fermented sausages. *Fleisch.Int.* **77**, 32–34.

PEREIRA, Cristina I., Daniela MATOS, Maria Vitória SAN ROMAO a Maria Teresa BARRETO CRESPO. 2009. 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*. **75**(2), 345-352. DOI: 10.1128/AEM.01958-08. ISSN 0099-2240.

PEREZ, Marta, Marina CALLES-ENRÍQUEZ, Ingolf NES, Maria Cruz MARTIN, Maria FERNANDEZ, Victor LADERO a Miguel A. ALVAREZ. 2015. Tyramine biosynthesis is transcriptionally induced at low pH and improves the fitness of *Enterococcus faecalis* in acidic environments. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **99**(8), 3547-3558. DOI: 10.1007/s00253-014-6301-7. ISSN 0175-7598.

PERIN, Luana Martins, Rodrigo Otávio MIRANDA, Svetoslav Dimitrov TODOROV, Bernadette Dora Gombossy de Melo FRANCO a Luís Augusto NERO. 2014. Virulence, antibiotic resistance and biogenic amines of bacteriocinogenic lactococci and enterococci isolated from goat milk. *International Journal of Food Microbiology*. **185**, 121-126. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2014.06.001. ISSN 01681605.

- PESSIONE, Enrica, Alessandro PESSIONE, Cristina LAMBERTI, *et al.* 2009. First evidence of a membrane-bound, tyramine and β -phenylethylamine producing, tyrosine decarboxylase in *Enterococcus faecalis*: A two-dimensional electrophoresis proteomic study. *PROTEOMICS*. **9**(10), 2695-2710. DOI: 10.1002/pmic.200800780. ISSN 16159853.
- PIRCHER, Anita, Friedrich BAUER a Peter PAULSEN. 2007. Formation of cadaverine, histamine, putrescine and tyramine by bacteria isolated from meat, fermented sausages and cheeses. *European Food Research and Technology*. **226**(1-2), 225-231. DOI: 10.1007/s00217-006-0530-7. ISSN 1438-2377.
- POKUSA, Eva Karina, Gerald F. FITZGERALD a Douwe VAN SINDEREN. 2011. Carbohydrate metabolism in Bifidobacteria. *Genes*. **6**(3), 285-306. DOI: 10.1007/s12263-010-0206-6. ISSN 1555-8932.
- POMBA, Constança, Natasha COUTO a Arshnee MOODLEY. 2010. Treatment of a lower urinary tract infection in a cat caused by a multi-drug methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* and *Enterococcus faecalis*. *Journal of Feline Medicine*. **12**(10), 802-806. DOI: 10.1016/j.jfms.2010.04.006. ISSN 1098612x.
- PONS-SÁNCHEZ-CASCADO, Sofía, M. Carmen VIDAL-CAROU, Abel MARINÉ-FONT a M. Teresa VECIANA-NOGUÉS. 2005. Influence of the Freshness Grade of Raw Fish on the Formation of Volatile and Biogenic Amines during the Manufacture and Storage of Vinegar-Marinaded Anchovies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **53**(22), 8586-8592. DOI: 10.1021/jf050867m. ISSN 0021-8561.
- RANGACHARI, Patangi K. 1992. Histamine: mercurial messenger in the gut. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*. **262**(1), G1-G13. ISSN 0193-1857.
- REA, Mary C., Charles M. A. P. FRANZ, Wilhelm Heinrich HOLZAPFEL a Timothy M. COGAN. 2004. Development of enterococci and production of tyramine during the manufacture and ripening of Cheddar cheese. *Irish Journal of Agricultural and Food Research*. **43**(2), 247-258.
- REHBEIN, Hartmut. a Jörg. OEHLENSCHLÄGER. c2009. *Fishery products: quality, safety and authenticity*. Ames, Iowa: Wiley-Blackwell Pub. ISBN 978-140-5141-628.
- RESTUCCIA, Donatella, U. Gianfranco SPIZZIRRI, Francesco PUOCI a Nevio PICCI. 2015. Determination of biogenic amine profiles in conventional and organic cocoa-based products. *Food Additives*. **32**(7), 1156-1163. DOI: 10.1080/19440049.2015.1036322. ISSN 1944-0049.
- REVIRIEGO, Carlota, Tracy J. EATON, Rocío G. MARTÍN, Esther Z. JIMÉNEZ, *et al.* 2005. Screening of Virulence Determinants in *Enterococcus*

faecium Strains Isolated From Breast Milk. *Journal of Human Lactation*. **21**(2), 131-137. DOI: 10.1177/0890334405275394. ISSN 0890-3344.

RITCHIE, A. H., I. M. MACKIE, 1979. The formation of diamines and polyamines during storage of mackerel (*Scomberscombus*). *Advances in Fish Science and Technology*, 489-494. Farnham, UK: FishingNews (Books) Ltd

ROIG-SAGUÉS, Artur, Angélica MOLINA a M^a HERNÁNDEZ-HERRERO. 2002. Histamine and tyramine-forming microorganisms in Spanish traditional cheeses. *European Food Research and Technology*. **215**(2), 96-100. DOI: 10.1007/s00217-002-0521-2. ISSN 1438-2377.

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

ROMANO, Andrea, Victor LADERO, Miguel A. ALVAREZ a Patrick M. LUCAS. 2014. Putrescine production via the ornithine decarboxylation pathway improves the acid stress survival of *Lactobacillus brevis* and is part of a horizontally transferred acid resistance locus. *International Journal of Food Microbiology*. 175, 14-19. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2014.01.009. ISSN 01681605.

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

SÁNCHEZ MAINAR, María, Frédérick MATHEUSE, Luc DE VUYST a Frédéric LEROY. 2017. Effects of glucose and oxygen on arginine metabolism by coagulase-negative staphylococci. *Food Microbiology*., **65**, 170-178. DOI: 10.1016/j.fm.2017.02.007. ISSN 07400020.

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

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

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

SEITTER, Marion, Bettina GENG a Christian HERTEL. 2011. Binding to extracellular matrix proteins and formation of biogenic amines by food-

associated coagulase-negative staphylococci. *International Journal of Food Microbiology*. **145**(2-3), 483-487. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2011.01.026. ISSN 01681605.

SHAH, Pratik a Edwin SWIATLO. 2008. A multifaceted role for polyamines in bacterial pathogens. *Molecular Microbiology*. **68**(1). DOI: 10.1111/j.1365-2958.2008.06126.x. ISSN 0950-382x.

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

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

SCHINDLER, Birgit K., Silke BRUNS a Gunter LACH. 2015. Biogenic amines – A possible source for nicotine in mushrooms? A discussion of published literature data. *Food Chemistry*, **171**, 379-381. DOI: 10.1016/j.foodchem.2014.08.099. ISSN 03088146.

SIMONOVÁ, Monika, Viola STROMPFOVÁ, Miroslava MARCIŇÁKOVÁ, Andrea LAUKOVÁ, Satu VESTERLUND, Mariluz Latorre MORATALLA, Sara BOVER-CID a Carmen VIDAL-CAROU. 2006. Characterization of *Staphylococcus xylosum* and *Staphylococcus carnosus* isolated from Slovak meat products. *Meat Science*. **73**(4), 559-564. DOI: 10.1016/j.meatsci.2006.02.004. ISSN 03091740.

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

SPARO, Mónica Delfina, Guillermo G. NUÑEZ, Marisa CASTRO, María Luján CALCAGNO, M.A. GARCÍA ALLENDE, Mónica CECI, R. NAJLE a Marcela MANGHI. 2008. Characteristics of an environmental strain, *Enterococcus faecalis* CECT7121, and its effects as additive on craft dry-fermented sausages. *Food Microbiology*. **25**(4), 607-615. DOI: 10.1016/j.fm.2008.01.008. ISSN 07400020.

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

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

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

TAHMOUZI, Saeed, Mehran GHASEMLOU, Fariborz Shojaee ALIABADI, Farzaneh SHAHRAZ, Hedayat HOSSEINI a Ramin KHAKSAR. 2013. Histamine Formation and Bacteriological Quality in Skipjack Tuna (*Katsuwonus Pelamis*): Effect Of Defrosting Temperature. *Journal of Food Processing and Preservation*. **37**(4), 306-313. DOI: 10.1111/j.1745-4549.2011.00650.x. ISSN 01458892

TAKAHASHI, Hajime, Bon KIMURA, Miwako YOSHIKAWA a Tateo FUJII. 2003. Cloning and sequencing of the histidine decarboxylase genes of gram-negative, histamine-producing bacteria and their application in detection and identification of these organisms in fish. *Applied and Environmental Microbiology*. **69**(5), 2568-2579. DOI: 10.1128/AEM.69.5.2568-2579.2003. ISSN 0099-2240.

TAYLOR, Steve L.; Marci W. SPECKHARD. 1983 Isolation of histamine-producing bacteria from frozen tuna. *Marine Fisheries Review*, 45.4: 6.

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

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

TOP, Janetta, Rob WILLEMS a Marc BONTEN. 2008. Emergence of CC17 *Enterococcus faecium*: from commensal to hospital-adapted pathogen. *FEMS Immunology*. **52**(3), 297-308. DOI: 10.1111/j.1574-695X.2008.00383.x. ISSN 09288244.

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

VALENZUELA, Antonio Sánchez, Nabil BENOMAR, Hikmate ABRIOUEL, Magdalena Martínez CAÑAMERO a Antonio GÁLVEZ. 2010. Isolation and identification of *Enterococcus faecium* from seafoods: Antimicrobial resistance

and production of bacteriocin-like substances. *Food Microbiology*. **27**(7), 955-961. DOI: 10.1016/j.fm.2010.05.033. ISSN 07400020.

WANG, Cong, Ping RUAN, Ying ZHAO, *et al.* 2017. Spermidine/spermine N¹-acetyltransferase regulates cell growth and metastasis *via* AKT/ β -catenin signaling pathways in hepatocellular and colorectal carcinoma cells. *Oncotarget*. DOI: 10.18632/oncotarget.13582. ISSN 1949-2553.

WANG, Haoran, Jon PALMER a Steve FLINT. 2016. A rapid method for the nonselective enumeration of *Yersinia enterocolitica*, a foodborne pathogen associated with pork. *Meat Science*. **113**, 59-61. DOI: 10.1016/j.meatsci.2015.11.005. ISSN 03091740.

WENDA KOON, Chitra N a Morihiko 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*®. **56**(5), 410-413. ISSN 0362-028X.

WENDA KOON, Chitra N., Michiyo MURATA a Morihiko SAKAGUCHI. 1990. Comparison of non-volatile amine formation between the dark and white muscles of mackerel during storage. *Nippon Suisan Gakkishi*. **56**(5), 809-818. DOI: 10.2331/suisan.56.809. ISSN 1349-998x.

XIE, Chong, Hu-hu WANG, Shao-lin DENG a Xing-Lian XU. 2016. The inhibition of cell-free supernatant of *Lactobacillus plantarum* on production of putrescine and cadaverine by four amine-positive bacteria in vitro. *LWT - Food Science and Technology*. **67**, 106-111. DOI: 10.1016/j.lwt.2015.11.028.

XIE, Zhengjun, Yang WANG, Yisheng CHEN, Xueming XU, Zhengyu JIN, Yunlian DING, Na YANG a Fengfeng WU. 2017. Tuneable surface enhanced Raman spectroscopy hyphenated to chemically derivatized thin-layer chromatography plates for screening histamine in fish. *Food Chemistry*. **230**, 547-552. DOI: 10.1016/j.foodchem.2017.03.081. ISSN 03088146.

XU, Ying, Yu LIU, Binghong XU, Dongfeng WANG a Wei JIANG. 2016. Characterisation and application of *Halomonas shantousis* SWA25, a halotolerant bacterium with multiple biogenic amine degradation activity. *Food Additives*, 1-9. DOI: 10.1080/19440049.2016.1147086. ISSN 1944-0049.

YANG, Xiaojuan, Jumei ZHANG, Shubo YU, Qingping WU, Weipeng GUO, Jiahui HUANG a Shuzhen CAI. 2016. Prevalence of *Staphylococcus aureus* and Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Retail Ready-to-Eat Foods in China. *Frontiers in Microbiology*. **7**, -. DOI: 10.3389/fmicb.2016.00816. ISSN 1664-302x.

YATSUNAMI, Kazuhisa a Takashi ECHIGO. 1993. Changes in the number of halotolerant histamine-forming bacteria and contents of nonvolatile amines in sardine meat with addition of NaCl. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 59:123-127.

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

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

ZAMORA, Rosario, Rosa M. DELGADO a Francisco J. HIDALGO. 2012. Formation of β -phenylethylamine as a consequence of lipid oxidation. *Food Research International*. **46**(1), 321-325. DOI: 10.1016/j.foodres.2011.12.029. ISSN 09639969.

ZOU, Jun a Nathan SHANKAR. 2016. The opportunistic pathogen *Enterococcus faecalis* resists phagosome acidification and autophagy to promote intracellular survival in macrophages. *Cellular Microbiology*. **18**(6), 831-843. DOI: 10.1111/cmi.12556. ISSN 14625814.

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

SEZNAM TABULEK A ILUSTRACÍ

Obr. 1. Rezistence na vankomycin u *Enterococcus faecium* v Evropě v roce 2014. Tabulka rezistence *Enterococcus faecium* v ČR v letech 2005–2012.

Obr. 2. Rezistence na meticilin *Staphylococcus aureus* (MRSA) v Evropě v roce 2014.

Obr. 3. Produkce biogenních aminů dekarboxyláza pozitivními mikroorganismy.

Obr. 4. Biosyntéza dráhy putrescinu u grampozitivních a gramnegativních bakterií.

Obr. 5. Biosyntéza polyaminů.

Obr. 6. Dekarboxylace L-aminokyselin za účasti pyridoxal-5-fosfátu u bakterií.

Obr. 7. Dekarboxylace pomocí pyruvoylové skupiny.

Obr. 8. Cesta přijatých biogenních aminů v intestinálním traktu člověka. MAO – monoaminoxidáza, DAO – diaminoxidáza.

Obr. 9. Aktivní transportní protein v buněčné membráně, který se podílí na pohybu různých iontů nebo molekul v opačném směru přes membránu.

Obr. 10. Schéma experimentu I – in vitro skrínig dekarboxylázové aktivity testovaných kmenů stafylokoků v Brain Heart Infusion bujónu (BHI) a enterokoků v M17 bujónu.

Obr. 11. Schéma experimentu II – sledování faktorů ovlivňujících dekarboxylázovou aktivitu testovaných kmenů in vitro.

Obr. 12. Parametry Gompertzova modelu.

Obr. 13. Růstové křivky *Enterococcus faecium* M2C (EF) při pH 5, 6 a 7 (pH5, pH6 a pH7), $t=30\text{ }^{\circ}\text{C}$, aerobních podmínek s přidavkem různých koncentrací 0, 3 a 6 % (w/v) NaCl (NaCl0, NaCl3 a NaCl6).

Obr. 14. Kinetika produkce tyraminu (a) a fenyletylaminu (b) při teplotě $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ u *Enterococcus faecium* M2C v závislosti na pH.

Obr. 15. Kinetika produkce tyraminu při $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ (a) a $6\text{ }^{\circ}\text{C}$ (b) u *Enterococcus faecium* M2C v závislosti na koncentraci NaCl.

Obr. 16. Kinetika produkce fenyletylaminu při $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ u *Enterococcus faecium* M2C v závislosti na koncentraci NaCl.

Obr. 17. Kinetika produkce tyraminu (a) a fenyletylaminu (b) při $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ u *Enterococcus* sp. M5a v závislosti na pH.

Obr. 16. Kinetika produkce tyraminu (a) a fenyletylaminu (b) při $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ u *Enterococcus* sp. M5a v závislosti na koncentraci NaCl.

Obr. 17. Růstová křivka *Staphylococcus epidermidis* 21/2 (SE) *in vitro* při pH 5, 6 a 7, 30 °C, za an/aerobních podmínek s přidavkem mezních kultivačních koncentrací 0 a 6 % (w/v) NaCl.

Obr. 18. Kinetika produkce tyraminu (a) a fenyletylaminu (b) při 30 °C u *Staphylococcus epidermidis* 21/2 v závislosti na pH.

Obr. 19. Kinetika produkce tryptaminu (a) a fenyletylaminu (b) při 30 °C u *Staphylococcus epidermidis* 21/2 v závislosti na pH.

Obr. 20. Kinetika produkce tyraminu při 30 °C (a) a 6 °C (b) u *Staphylococcus epidermidis* 21/2 v závislosti na koncentraci NaCl.

Obr. 21. Kinetika produkce fenyletylaminu při 30 °C (a) a 6 °C (b) u *Staphylococcus epidermidis* 21/2 v závislosti na koncentraci NaCl.

Obr. 22. Kinetika produkce tyraminu (a) a fenyletylaminu (b) při 30 °C u *Staphylococcus hominis* 20/2 v závislosti na pH.

Obr. 23. Kinetika produkce tyraminu (a) a fenyletylaminu (b) při 30 °C u *Staphylococcus hominis* 20/2 závislosti na koncentraci NaCl.

Obr. 24. Část růstové křivky *Staphylococcus pasteurii* 19/1 (SP) *in vitro* při pH 5, 6 a 7, 30 °C, za an/aerobních podmínek s přidavkem různých koncentrací 0, 3 a 6 % (w/v) NaCl.

Obr. 25. Kinetika produkce tyraminu při 30 °C (a) a 6 °C (b) u *Staphylococcus pasteurii* 19/1 v závislosti na pH.

Obr. 26. Kinetika produkce fenyletylaminu při 30 °C u *Staphylococcus pasteurii* 19/1 v závislosti na pH.

Obr. 27. Kinetika produkce tyraminu při 30 °C (a) a 6 °C (b) u *Staphylococcus pasteurii* 19/1 v závislosti na koncentraci NaCl.

Obr. 28. Kinetika produkce fenyletylaminu při 30 °C u *Staphylococcus pasteurii* 19/1 v závislosti na koncentraci NaCl.

Obr. 29. Růstové křivky a yield faktory (sloupcový graf) u *Enterococcus faecium* M2C *in vitro* při 30 °C (a) a 6 °C (b), pH 5 za anaerobních podmínek s přidavkem 1 (černá) a 6 (modrá) % (w/v) NaCl.

Tab. 1. Mikroorganizmy produkující biogenní aminy.

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

Tab. 3. Detekovaná produkce biogenních aminů nebo genů pro dekarboxylázy u bakterií rodu *Staphylococcus*.

Tab. 4. Seznam testovaných kmenů na produkci biogenních aminů.

Tab. 5. Produkce biogenních aminů bakteriemi rodů Staphylococcus a Enterococcus izolovanými ze Salmo trutta a Oryctolagus curiculus.

Tab. 6. Produkce biogenních aminů bakteriemi rodů Staphylococcus a Enterococcus bez vlivu sledovaných faktorů (30 °C, pH 7, bez přídavku NaCl, aerobně).

Tab. 7. Maximální produkce BA u Enterococcus faecium M2C.

Tab. 8. Maximální produkce BA u Enterococcus faecium 5BM1.

Tab. 9. Maximální produkce BA u Enterococcus sp. M5a.

Tab. 10. Maximální produkce BA u Staphylococcus epidermidis 21/2.

Tab. 11. Maximální produkce BA u Staphylococcus hominis 20/2.

Tab. 12. Maximální produkce BA u Staphylococcus pasteurii 19/1.

Rovnice 1: Gompertzův model

Rovnice 2: Gompertzův model - závislost obsahu BA (y) (mg.l^{-1}) na čase (t)

Rovnice 3: Produkční faktor (Y_{BA}/CFU)

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

| | |
|-----------|---|
| ΣBA | – celkové množství biogenních aminů |
| 5'MTA | – 5'-metyltioadenozin |
| A/AN | – aerobní/anaerobní prostředí |
| ADC | – arginindekarboxyláza |
| ADI | – arginindeimináza |
| ADP | – adenosindifosfát |
| AgDI | – agmatindeimináza |
| AGM | – agmatin |
| AGM/AUH | – agmatináza/agmatinureohydroláza |
| AgUH | – agmatinureohydroláza |
| ARG | – argináza |
| ATP | – adenosintrifosfát |
| AUH | – argininureohydroláza |
| BA | – biogenní aminy |
| BHI | – Brain Heart Infusion |
| CAD | – kadaverin |
| CK | – karbamátkináza |
| DAO | – diaminooxidáza |
| DNA | – deoxyribonukleová kyselina |
| EFSA | – European Food Safety Authority |
| FDA | – Food Drug Agency |
| HACCP | – Hazard Analysis and Critical Control Points |
| HDC | – histidindekarboxyláza |
| HIS | – histamin |
| HPLC | – vysokoúčinná kapalinová chromatografie |
| KTJ (CFU) | – kolonie tvořící jednotku |
| LDC | – lyzindekarboxyláza |
| MAO | – monoaminooxidáza |
| MRSA | – meticillin rezistentní <i>Staphylococcus aureus</i> |
| OCT | – ornitinkarbamoyltransferáza |
| ODC | – ornitindekarboxyláza |
| PAO | – polyaminoxidáza |
| PCR | – polymerázová řetězová reakce |
| PCT | – putrescinkarbamoyltransferáza |
| PHE | – fenyletylamin |
| PheDC | – fenylalanindekarboxyláza |
| PUT | – putrescin |
| RNA | – ribonukleová kyselina |

| | |
|-----------|--|
| SAM – S | –adenosylmetionin dekarboxyláza |
| SAMHC – S | –adenosylmetioninhomocysteinamin |
| SPD | – spermidin |
| SpdS | – spermidinsytetáza |
| SPM | – spermin |
| SpmS | – sperminsytetáza. |
| SSAT | – acetylkoenzym A – N ¹ -spermidin/spermintransferáza |
| TDC | – tyrozindekarboxyláza |
| TLC | – tenkovrstvá chromatografie |
| TRP | – tryptamin |
| TYM | – tyramin |

PŘEHLED PUBLIKAČNÍ ČINNOSTI

Příspěvky v mezinárodních časopisech vedené v databázi Web of Science

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

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

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

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

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

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

Příspěvky v časopisech vedené v databázi SCOPUS

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

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

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

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

Původní vědecké práce publikované v recenzovaných časopisech bez impakt faktoru

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

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

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

Příspěvky ve sbornících z konferencí:

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

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

PLEVA, Pavel, Zuzana LAZÁRKOVÁ, Adéla ANDRESOVÁ, Eva LORENCOVÁ, František BUŇKA a Leona BUŇKOVÁ. 2012. Effect of

selected monosaccharide on growth and putrescine production of *Serratia marcescens*, *Plasty a kaučuk* 2012

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

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

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

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

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

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

CURRICILUM VITAE

Osobní údaje:

Jméno a příjmení: Ing. Pavel Pleva
Datum narození: 8. 5. 1981
Kontaktní adresa: U Vodojemu 1234, 757 01 Valašské meziříčí
E-mail: p.pleva@centrum.cz
Dosažené vzdělání: vysokoškolské II. stupně (Ing.)

2010 – současnost

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

2008 – 2010

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

2005 – 2008

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

2001 – 2004

Vyšší odborná škola potravinářská, Kroměříž
Obor: Zpracování mléka

1995 – 1999

Střední zemědělská škola, Rožnov pod Radhoštěm

Pracovní zkušenosti:

2015 – doposud

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně; Pracovní pozice: asistent

2011 – 4/2013

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

2004

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

Znalosti:

Jazykové znalosti:

Angličtina – aktivní znalost

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

Řidičský průkaz: sk. A, B, C, T

Odborná příprava a zkušenosti:

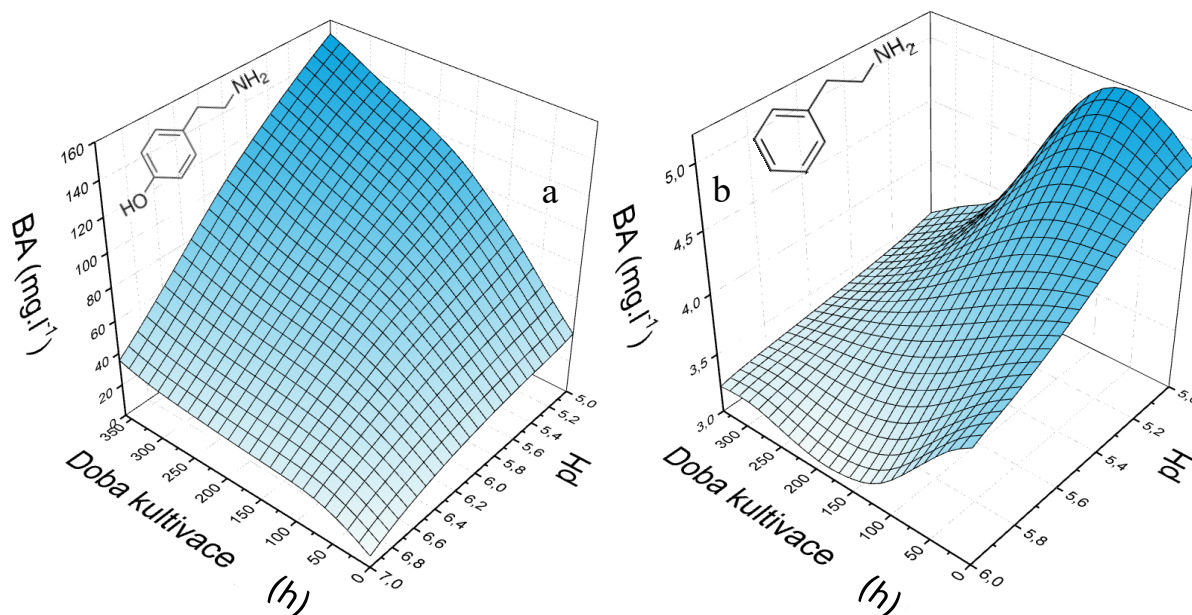
Projekty: 2011 IGA/12/FT/11/D, 2012 IGA/FT/2012/027, 2013 IGA/FT/2013/013.

PŘÍLOHA I

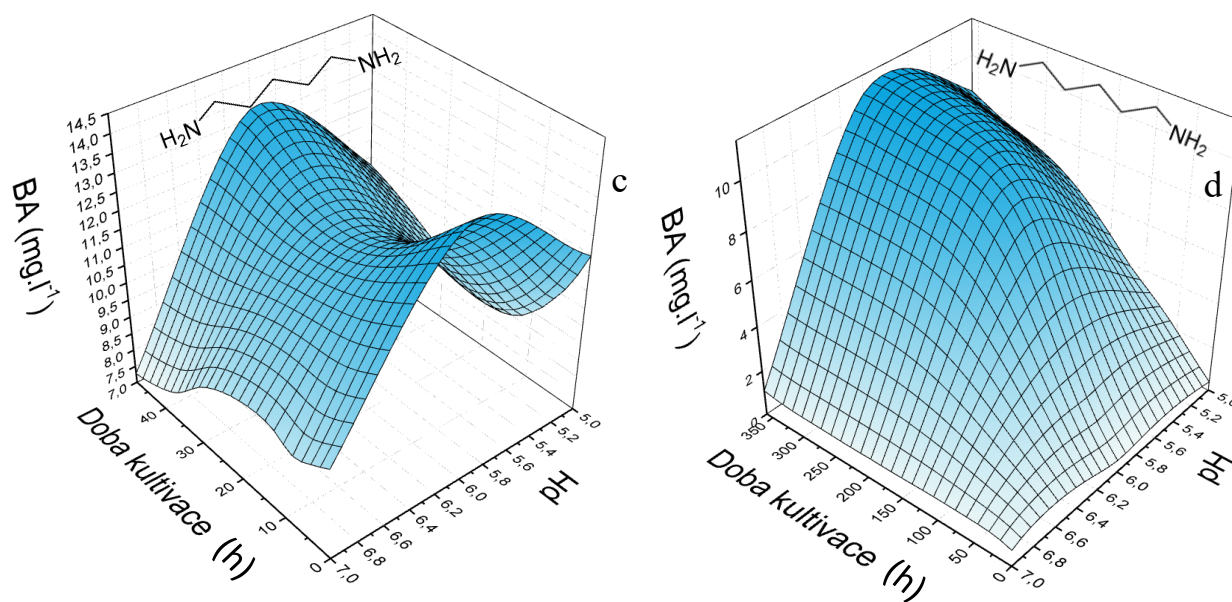
Tab. 1. Účinky biogenních aminů na lidský organizmus (Benkerroum, 2016).

| | Fyziologické účinky | Toxikologické účinky |
|--------------------------------------|---|--|
| Histamin | Neurotransmitter, lokální hormon, sekrece žaludečních kyselin, buněčný růst a diferenciacie, regulace biorytmu, regulace tělesné teploty, příjem potravy, paměť a schopnost učení, imunitní odpověď, alergické reakce | Výrazné zvýšení sekrece hlenu, bolest hlavy, zarudnutí obličeje, vyrážka, edém očních víček, obtížné polykání, průjem, respirační problémy, bronchitis, zvýšení srdečního rytmu, tachykardie, hypertenze |
| Tyramin | Neurotransmitter, cévní řečiště, srdeční tep, zvýšení intenzity dýchání, zvyšování hladiny glukózy v krvi, uvolňování noradrenalinu | Bolest hlavy, migréna, neurologické poruchy, nevolnost, zvracení, respirační poruchy, hypertenze |
| Putrescin Kadaverin | Regulace genové exprese, peristaltika střeva, buněčný růst a diferenciacie | Zvýšená srdeční činnost, tachykardie, hypotenze, karcinogenní účinky |
| Putrescin | Růst a diferenciacie buněk prostřednictvím genové exprese a modulace signálních drah, jako ligandy působí na více místech DNA a RNA, fosfolipidy a nukleotidové trifosfáty | Hypotenze, bradykardie, křeče žvýkačického svalu, paréza končetin, umocňuje toxicitu jiných aminů |
| Spermin Spermidin | Regenerace střevní sliznice Stabilizace hydroperoxidu, zhášení singletového kyslíku, protizánětlivé působení, antioxidantní efekt je přímo úměrný počtu aminokyselin v těchto sloučeninách | Maligní, kolorektální karcinom, ischemie, svalová dystrofie, epilepsie, Alzheimerova choroba, psoriáza, cystická fibróza |

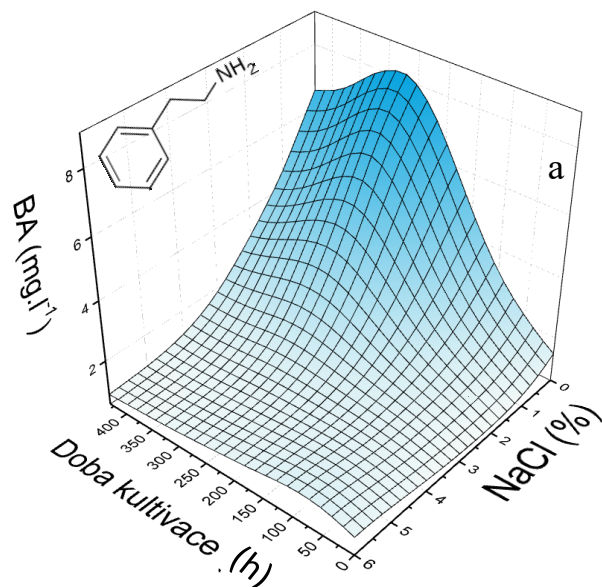
PŘÍLOHA II



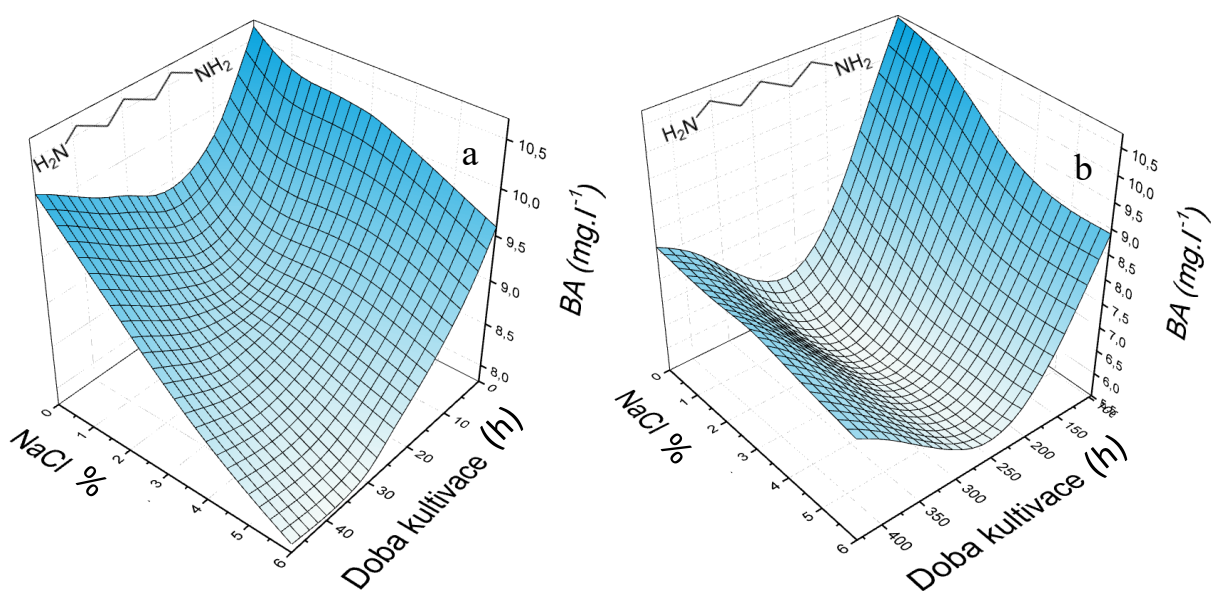
Obr. 1. Kinetika produkce tyraminu (a) a fenyletylaminu (b) při teplotě 6 °C (a) u *Enterococcus faecium* M2C v závislosti na pH.



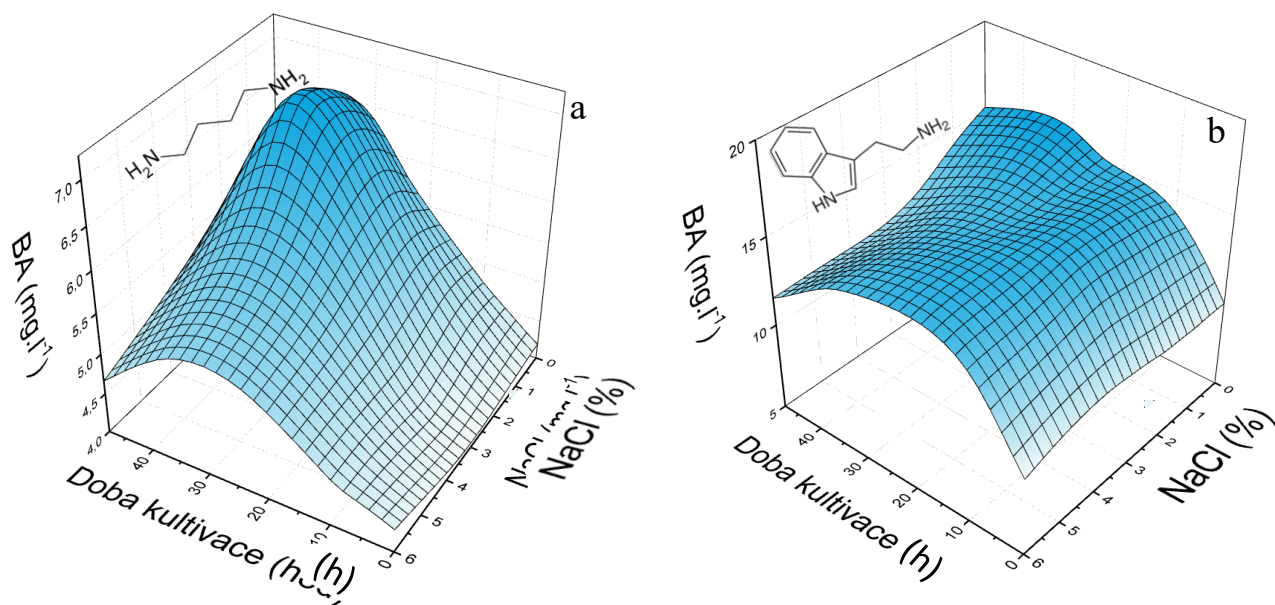
Obr. 2. Kinetika produkce kadaverinu při teplotě 30 °C (c) a 6 °C (d) u *Enterococcus faecium* M2C v závislosti na pH.



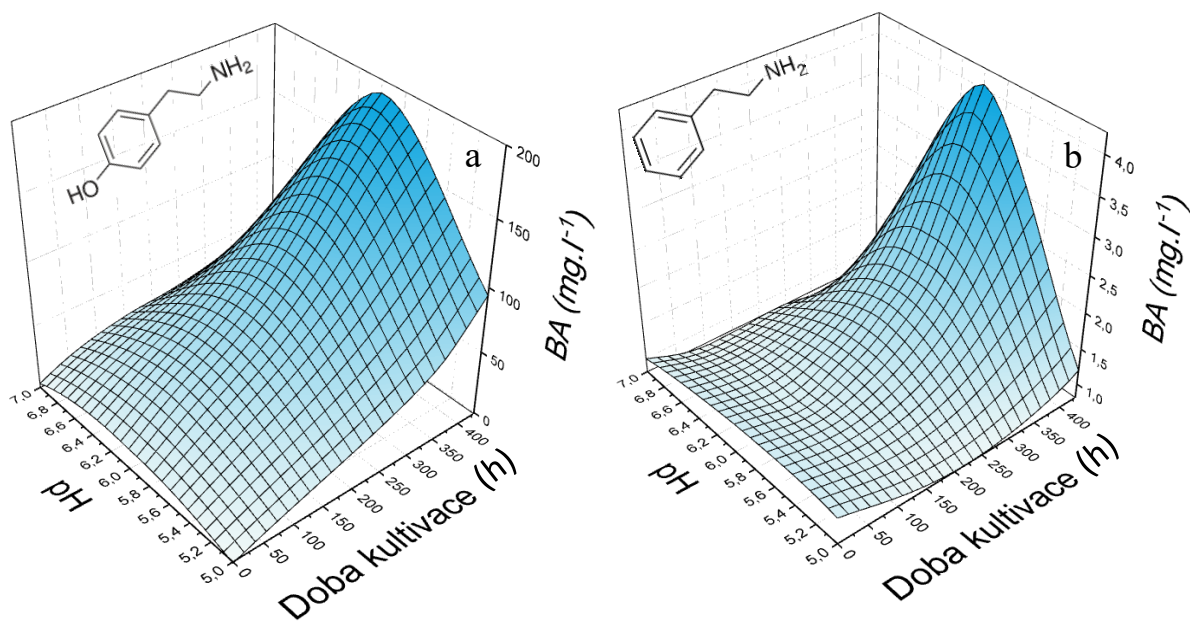
Obr. 3. Kinetika produkce fenyletylaminu při 6 °C (a) u *Enterococcus faecium* M2C v závislosti na koncentraci NaCl.



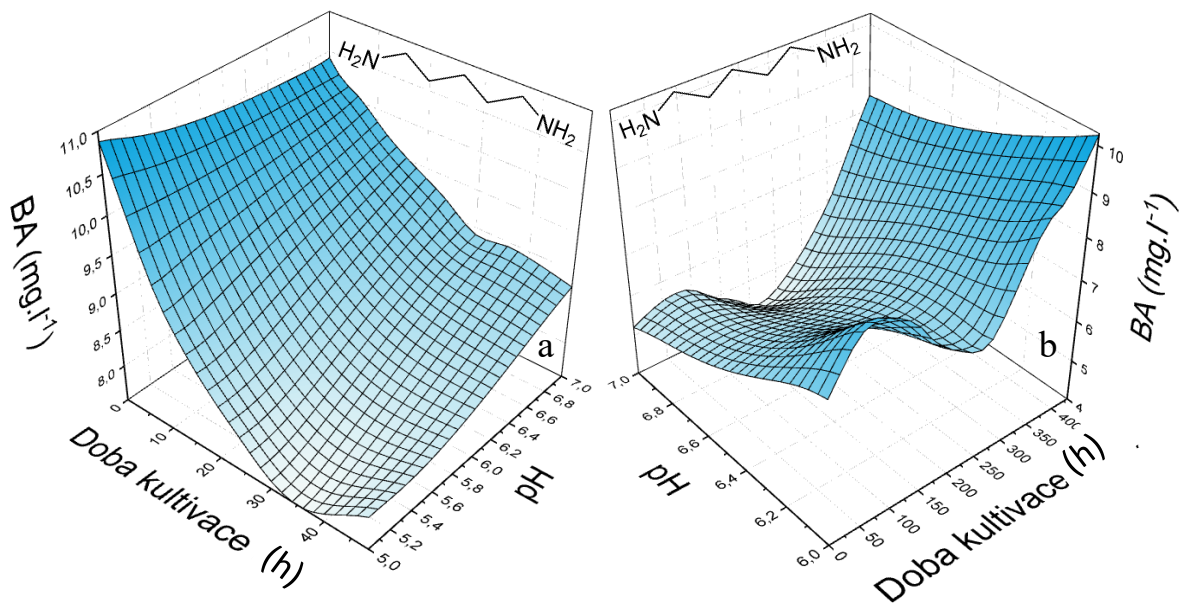
Obr. 4. Kinetika produkce kadaverinu při 30 °C (a) a 6 °C (b) u *Enterococcus faecium* M2C v závislosti na koncentraci NaCl.



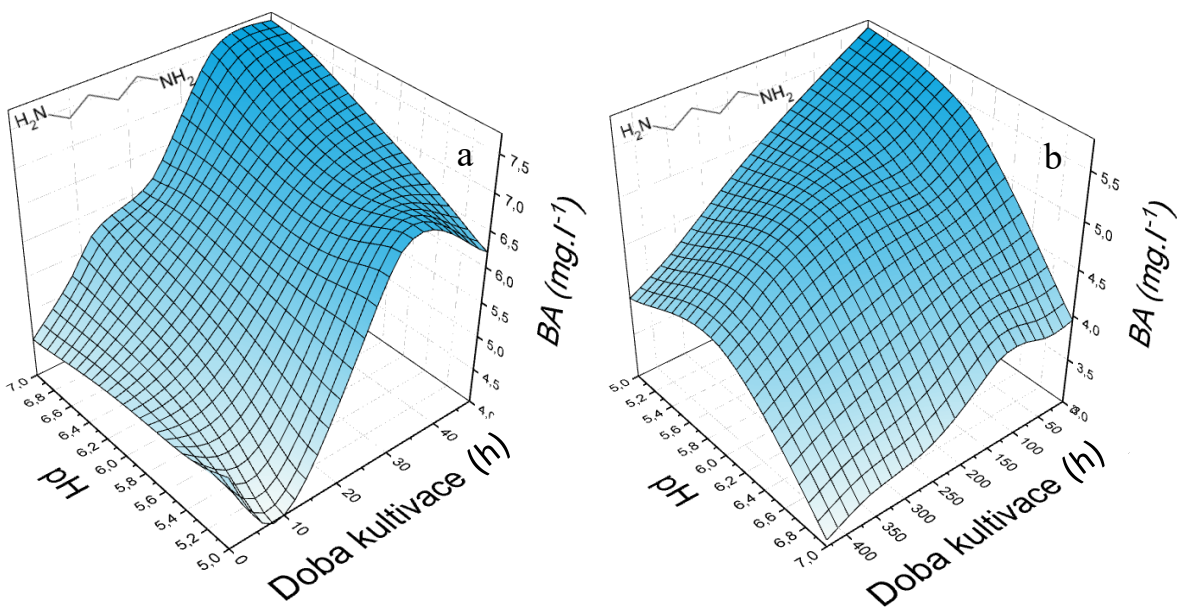
Obr. 5. Kinetika produkce putrescinu (a) a tryptaminu (b) při 30 °C u *Enterococcus faecium* M2C v závislosti na koncentraci NaCl.



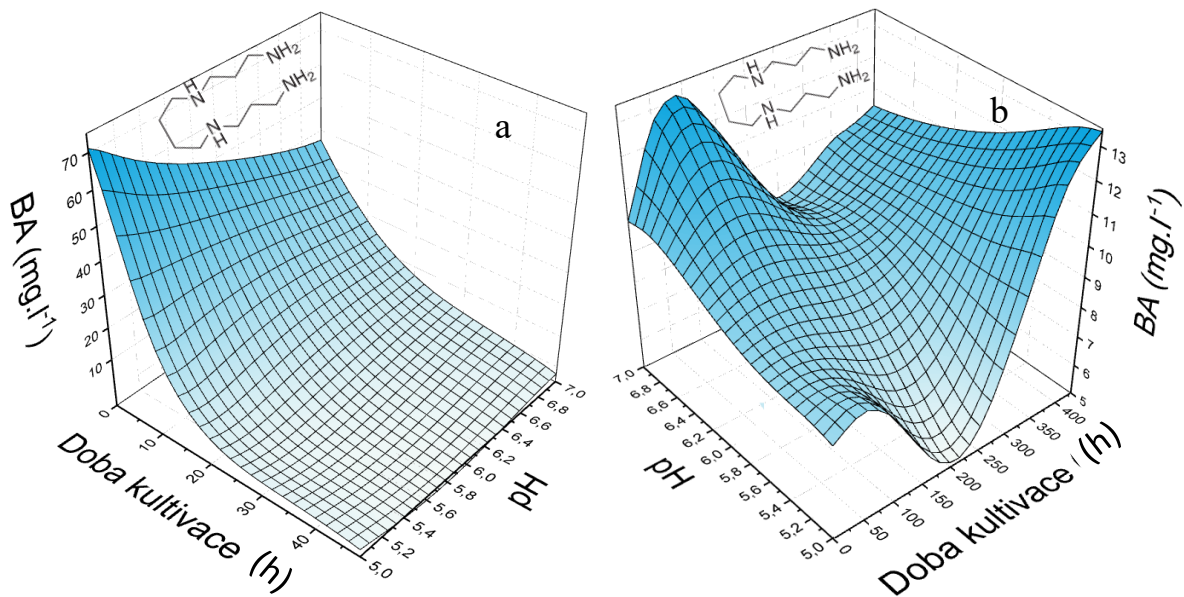
Obr. 6. Kinetika produkce tyraminu (a) a fenyletylaminu (b) při 6 °C u *Enterococcus* sp. M5a v závislosti na pH.



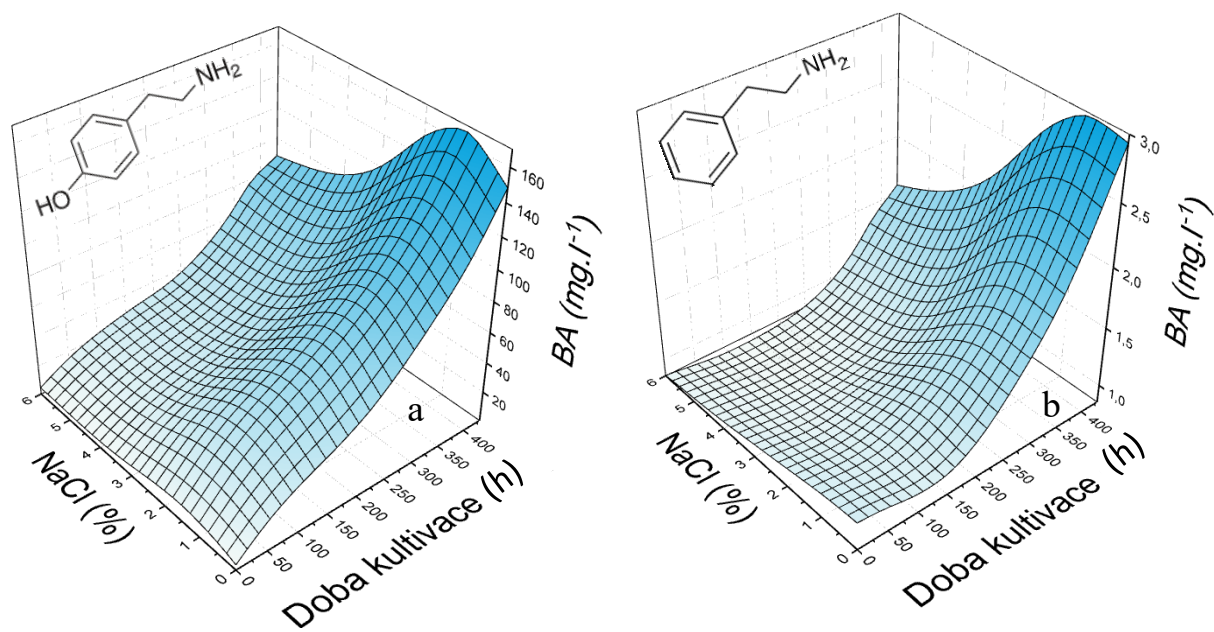
Obr. 7. Kinetika produkce kadaverinu při 30 °C (a) a 6 °C (b) u *Enterococcus sp. M5a* v závislosti na pH.



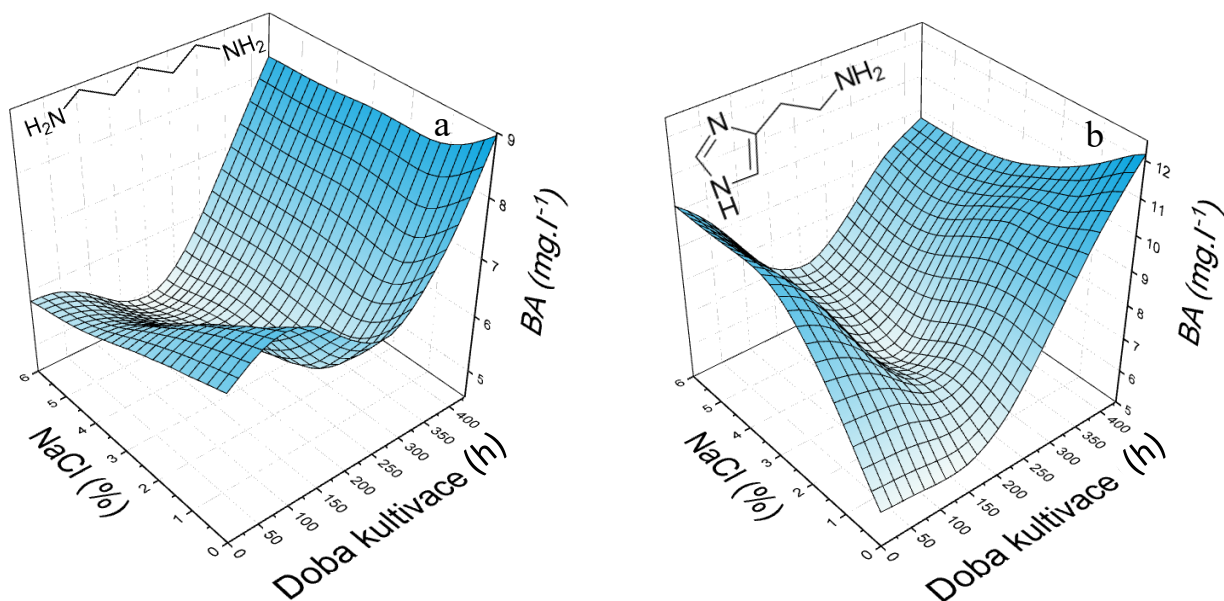
Obr. 8. Kinetika produkce putrescinu při 30 °C (a) a 6 °C (b) u *Enterococcus sp. M5a* v závislosti na pH.



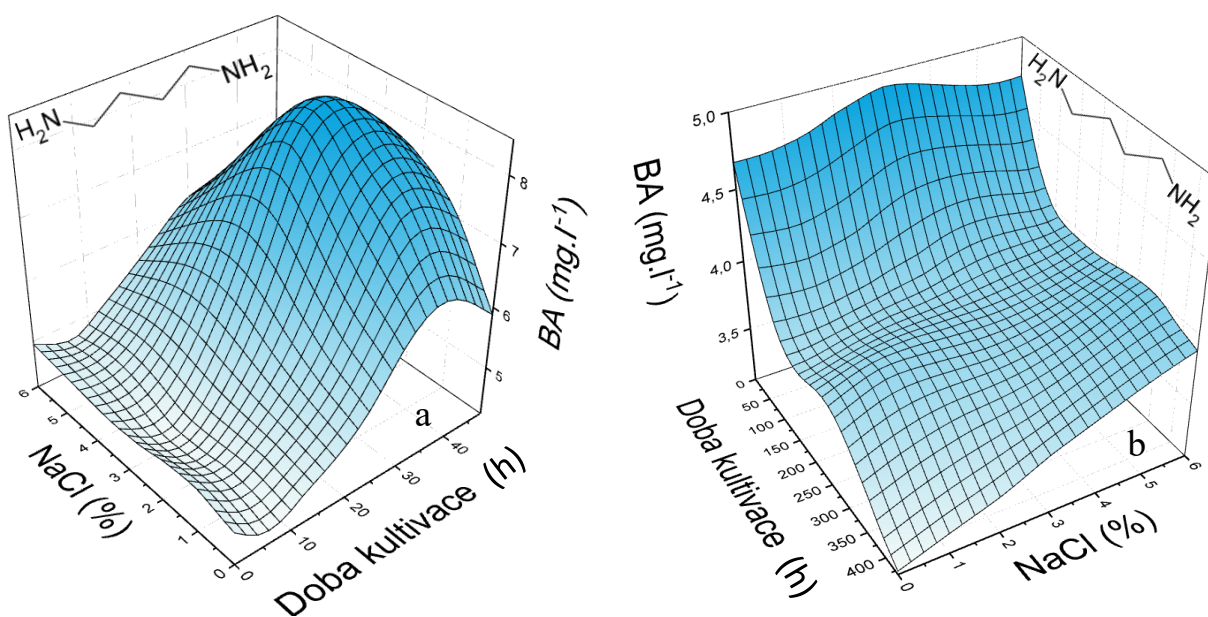
Obr. 9. Kinetika produkce sperminu při 30 °C (a) a 6 °C (b) u *Enterococcus sp. M5a* v závislosti na pH.



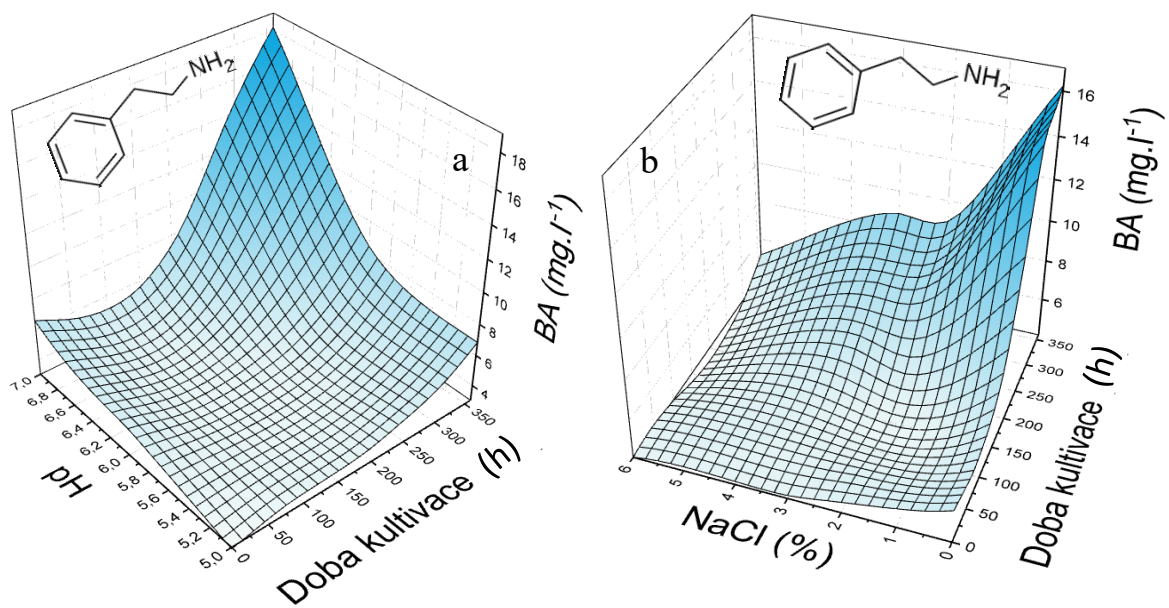
Obr. 10. Kinetika produkce tyraminu (a) a fenyletylaminu (b) při 6 °C (a) u *Enterococcus sp. M5a* v závislosti na koncentraci NaCl.



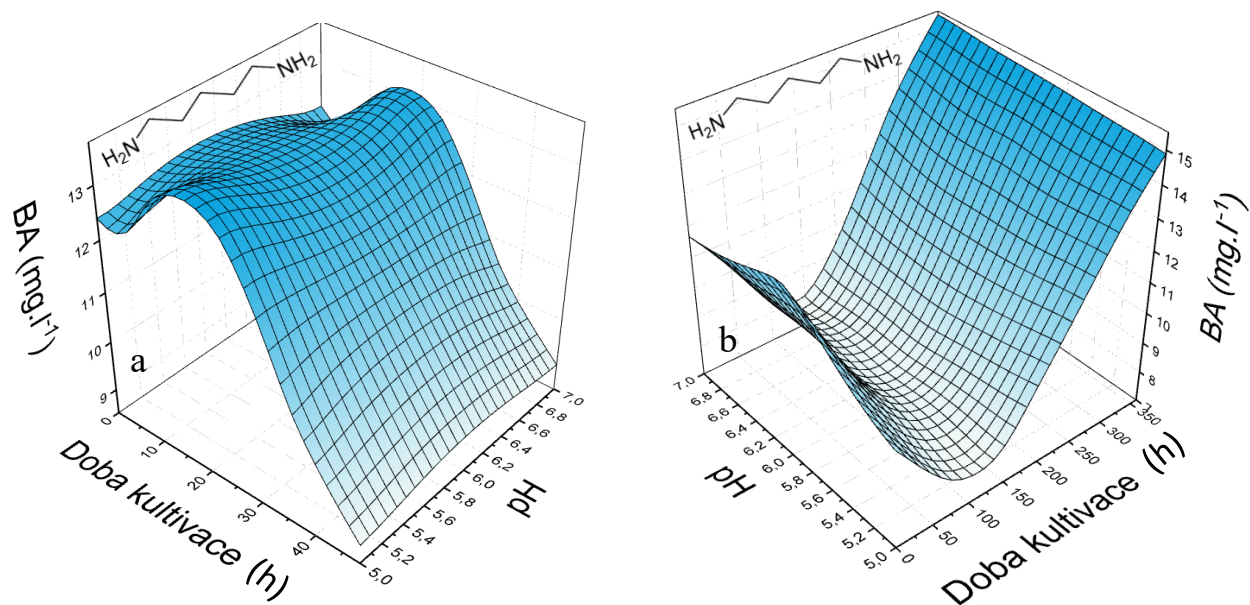
Obr. 11. Kinetika produkce kadaverinu (a) a histaminu (b) při kultivaci 6 °C u *Enterococcus sp. M5a* v závislosti na koncentraci NaCl.



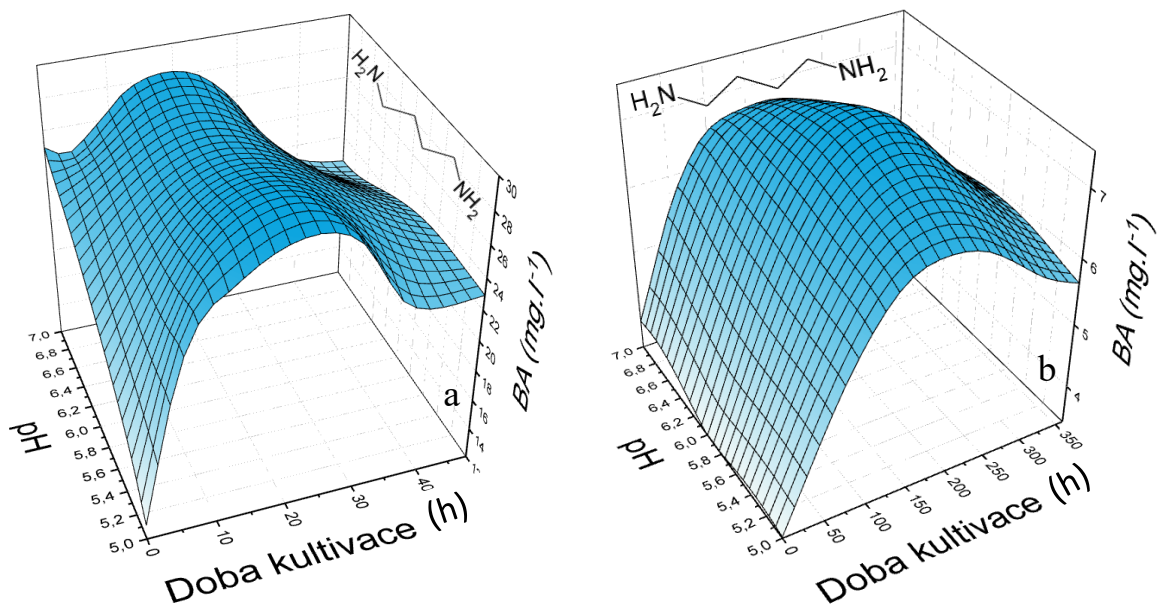
Obr. 12. Kinetika produkce putrescinu při 30 °C (a) a 6 °C (b) u *Enterococcus sp. M5a* v závislosti na koncentraci NaCl.



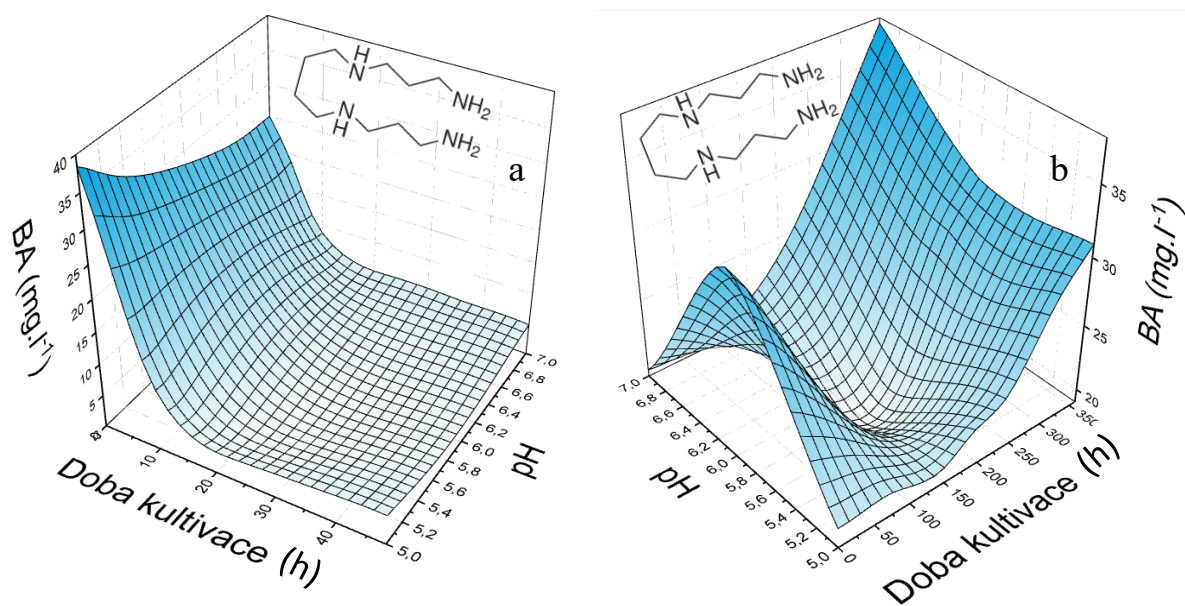
Obr. 13. Kinetika produkce fenyletylamin při 6 °C u *Staphylococcus pasteurii* 19/1 v závislosti na pH (a) a koncentraci NaCl (b).



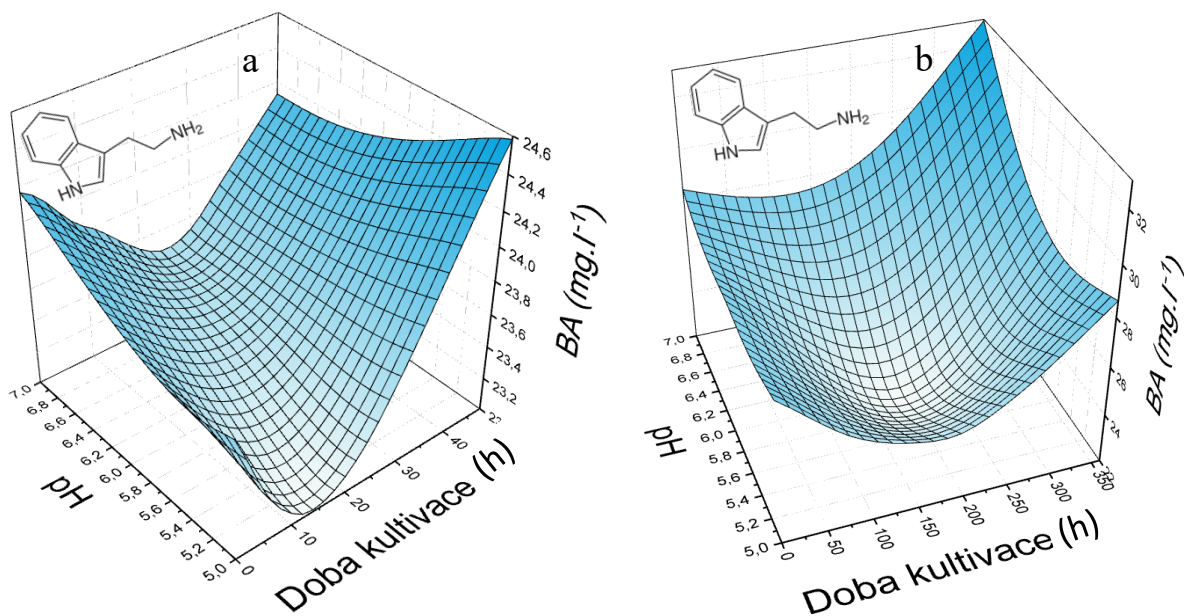
Obr. 14. Kinetika produkce kadaverinu při 30 °C (b) a 6 °C (a) u *Staphylococcus pasteurii* 19/1 v závislosti na pH.



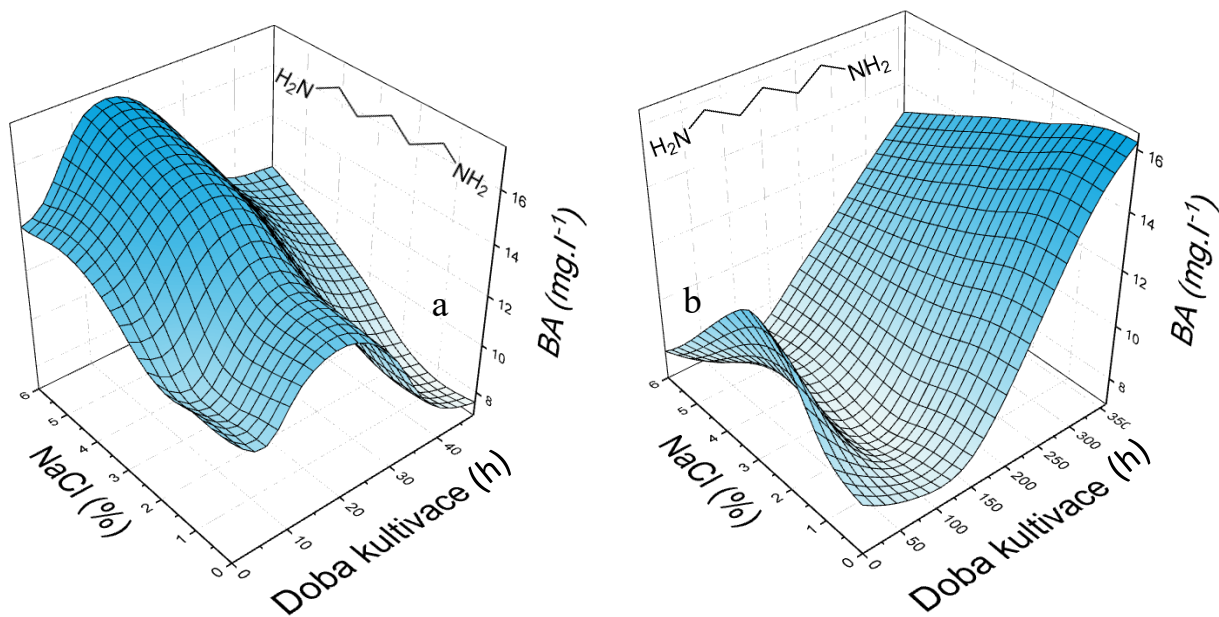
Obr. 15. Kinetika produkce putrescinu při 30 °C (a) a 6 °C (b) u *Staphylococcus pasteurii* 19/1 v závislosti na pH.



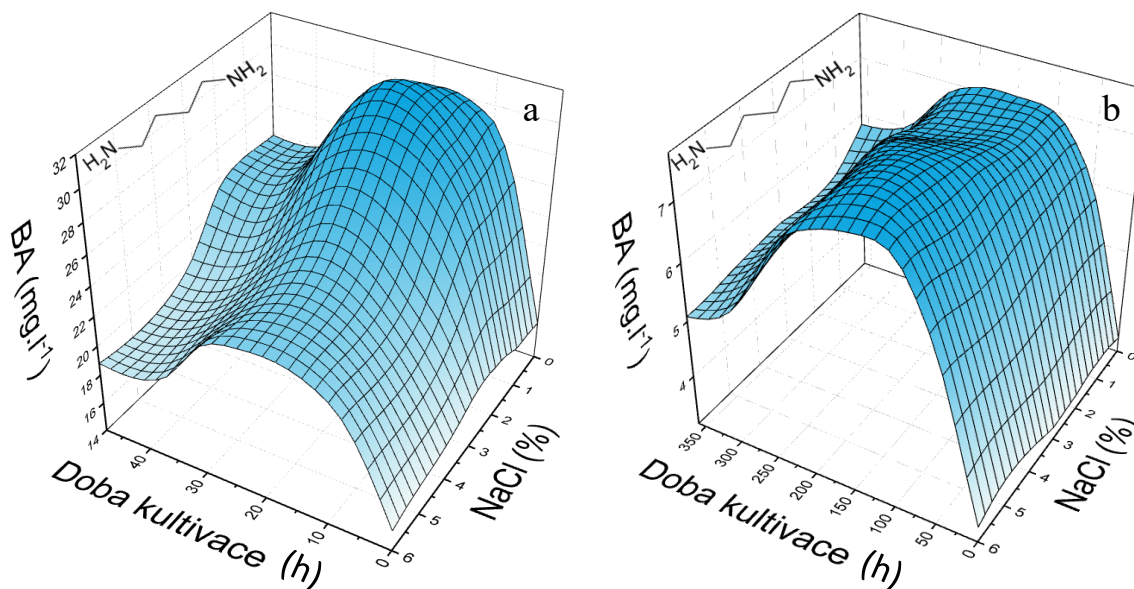
Obr. 16. Kinetika produkce sperminu při 30 °C (a) a 6 °C (b) u *Staphylococcus pasteurii* 19/1 v závislosti na pH.



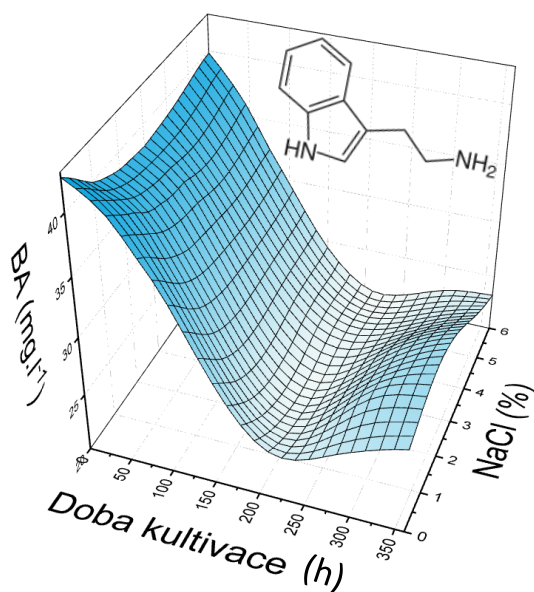
Obr. 17. Kinetika produkce tryptaminu při 30 °C (a) a 6 °C (b) u *Staphylococcus pasteurii* 19/1 v závislosti na pH.



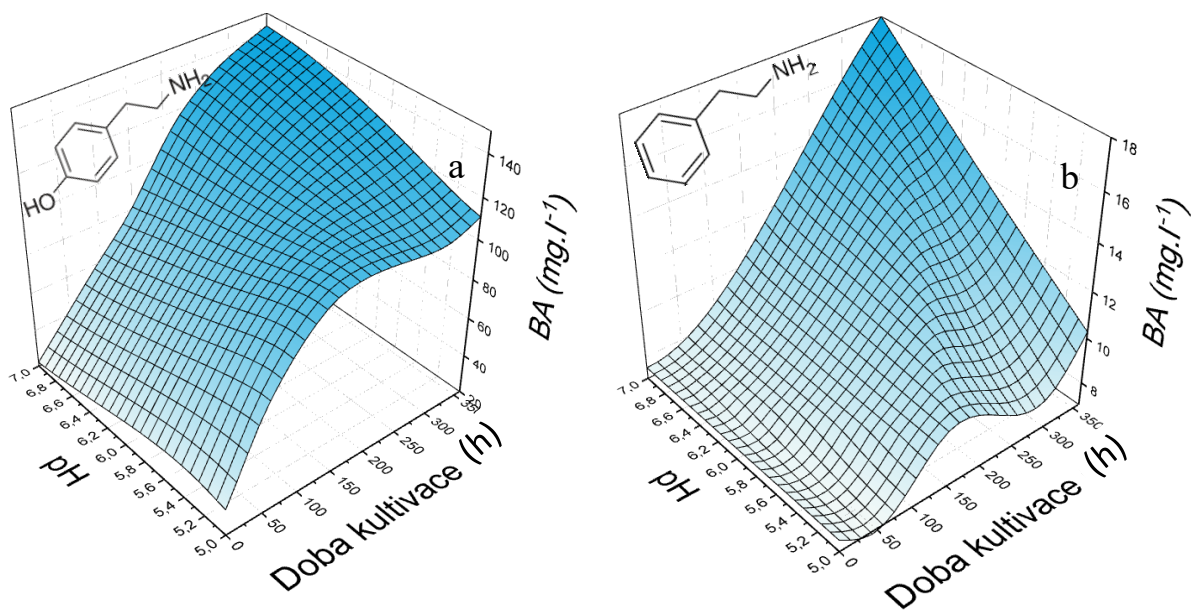
Obr. 18. Kinetika produkce kadaverinu při 30 °C (a) a 6 °C (b) u *Staphylococcus pasteurii* 19/1 v závislosti na koncentraci NaCl.



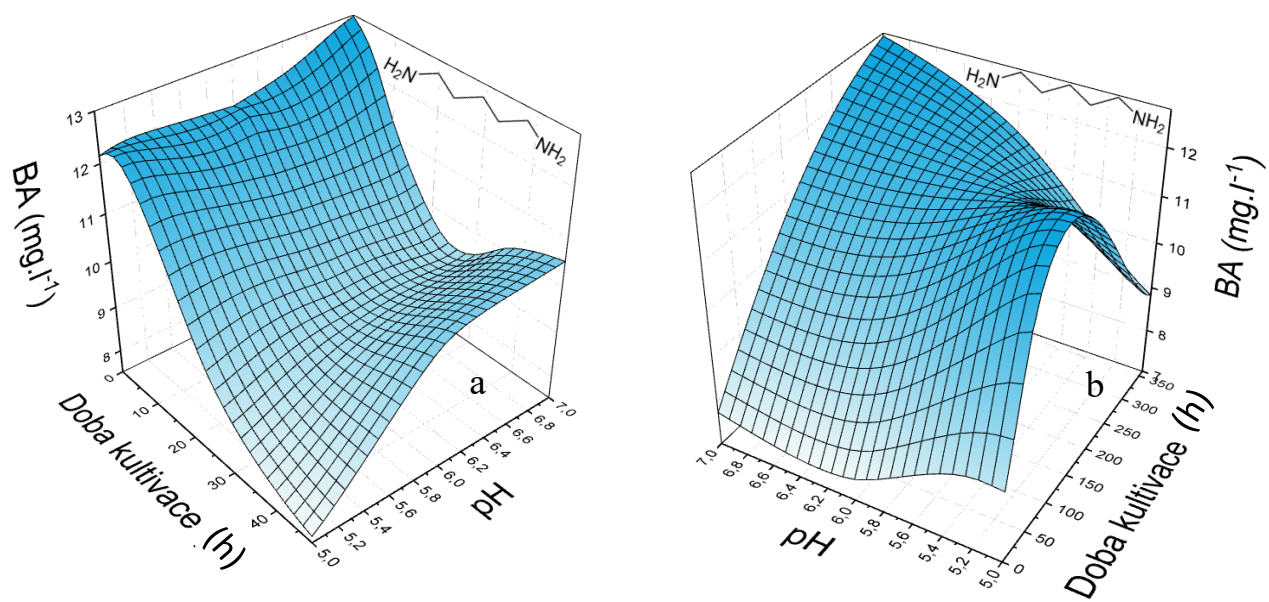
Obr. 19. Kinetika produkce putrescin při 30 °C (a) a 6 °C (b) u *Staphylococcus pasteurii* 19/1 v závislosti na koncentraci NaCl.



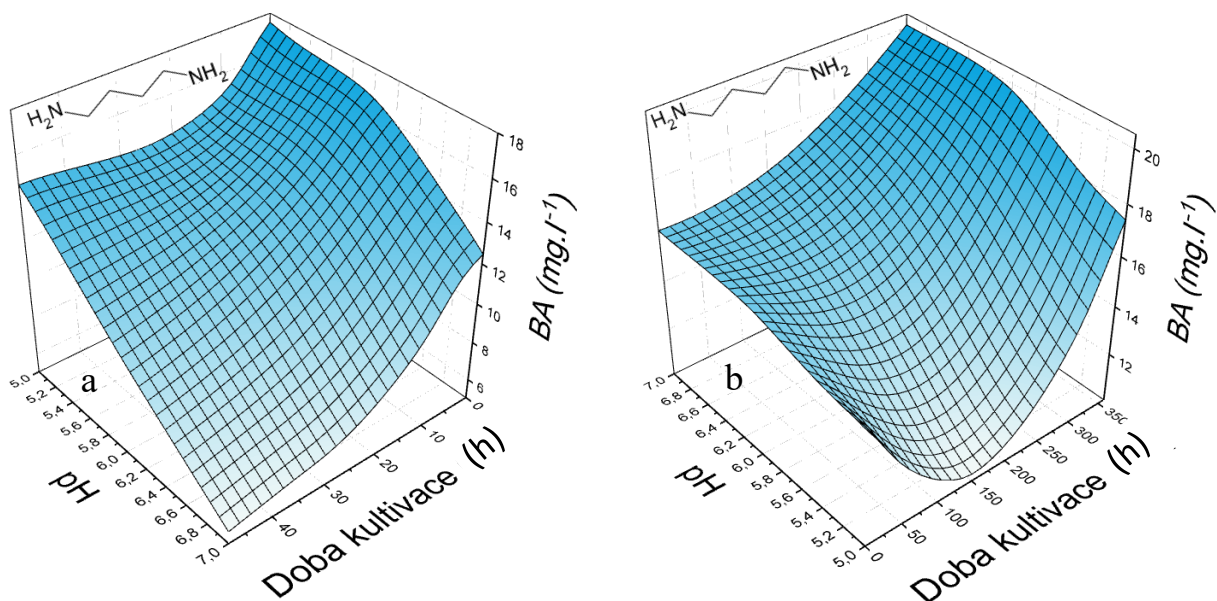
Obr. 20. Kinetika produkce tryptamin při 6 °C u *Staphylococcus pasteurii* 19/1 v závislosti na koncentraci NaCl.



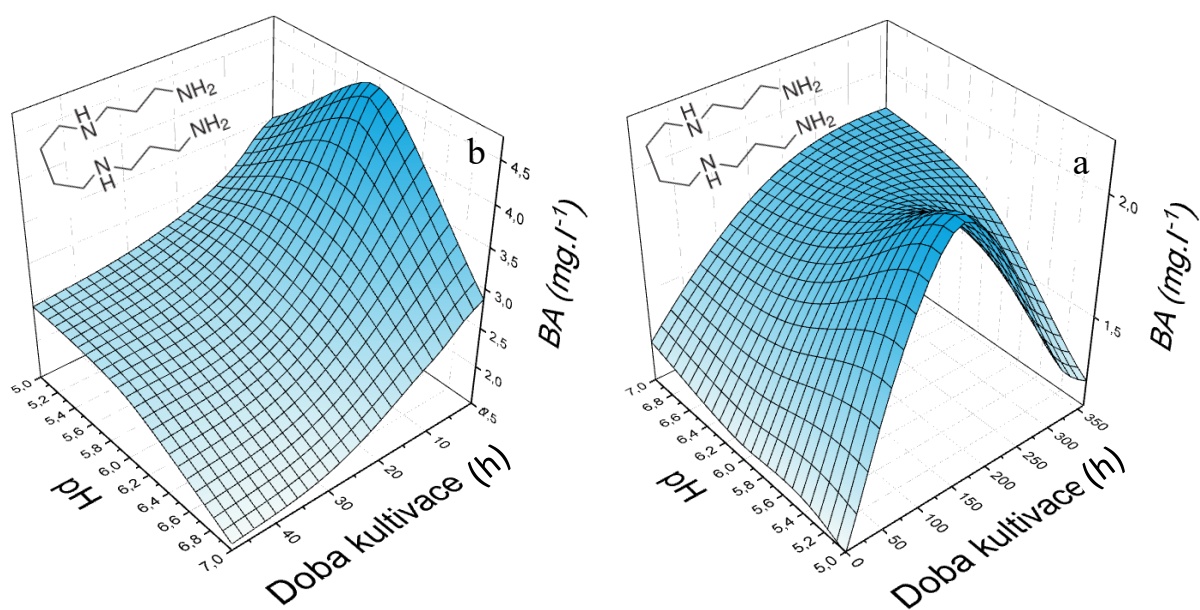
Obr. 21. Kinetika produkce tyraminu (a) a fenyletylaminu (b) při 6 °C (a) u *Staphylococcus hominis* 20/2 v závislosti na pH.



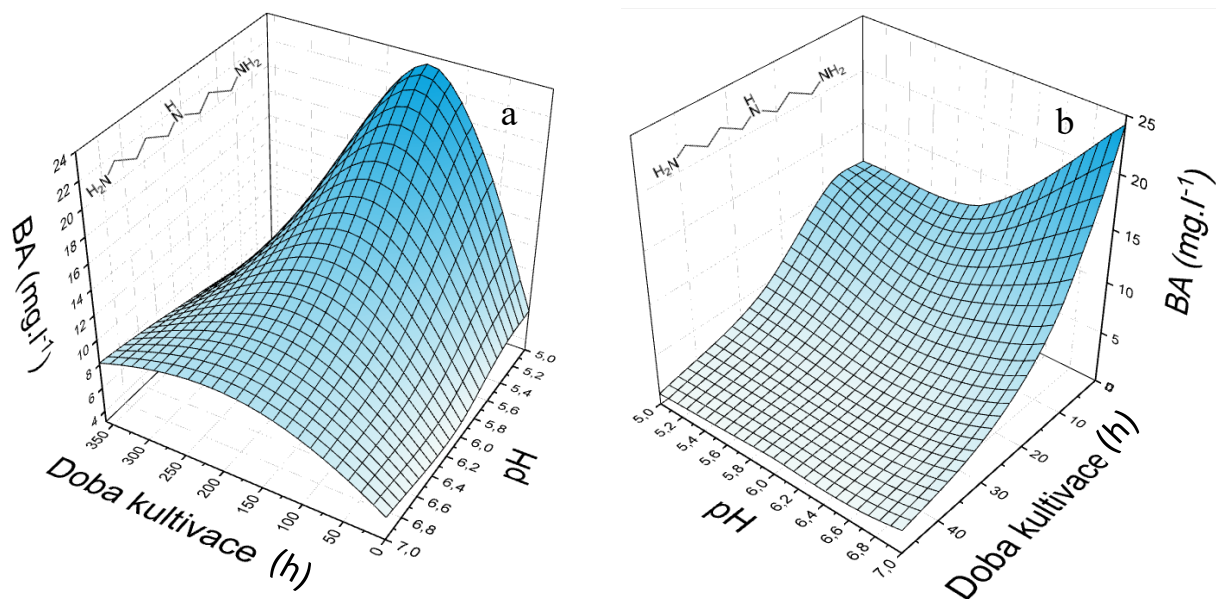
Obr. 22. Kinetika produkce kadaverinu 30 °C (a) a 6 °C (b) u *Staphylococcus hominis* 20/2 v závislosti na pH.



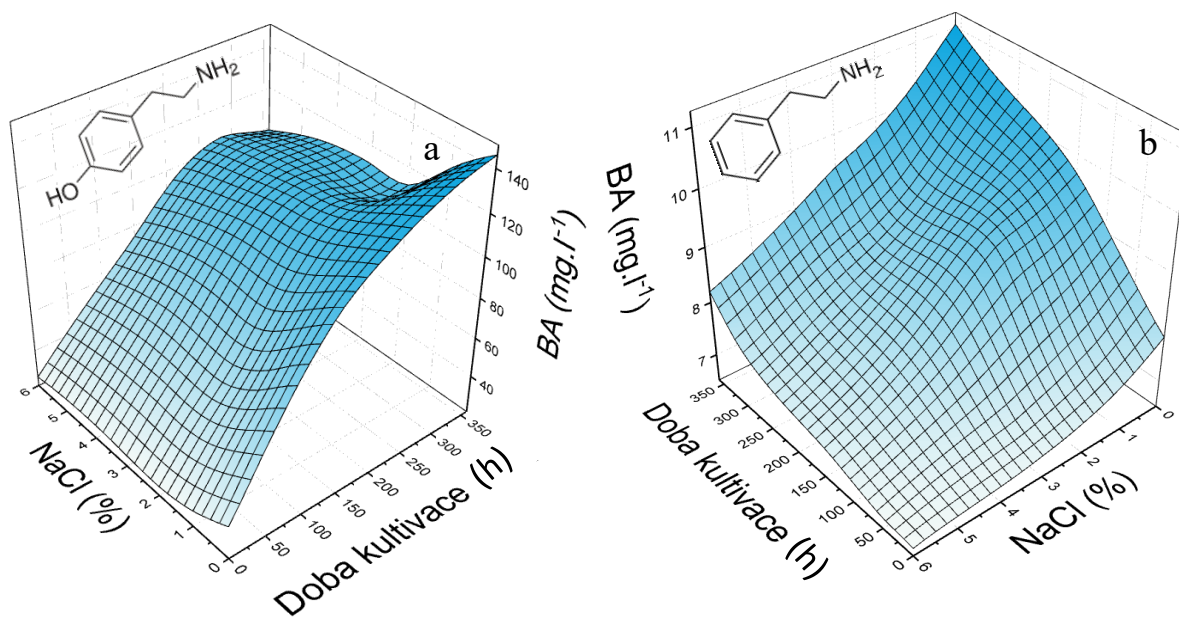
Obr. 23. Kinetika produkce putrescin při 30 °C (a) a 6 °C (b) u *Staphylococcus hominis* 20/2 v závislosti na pH.



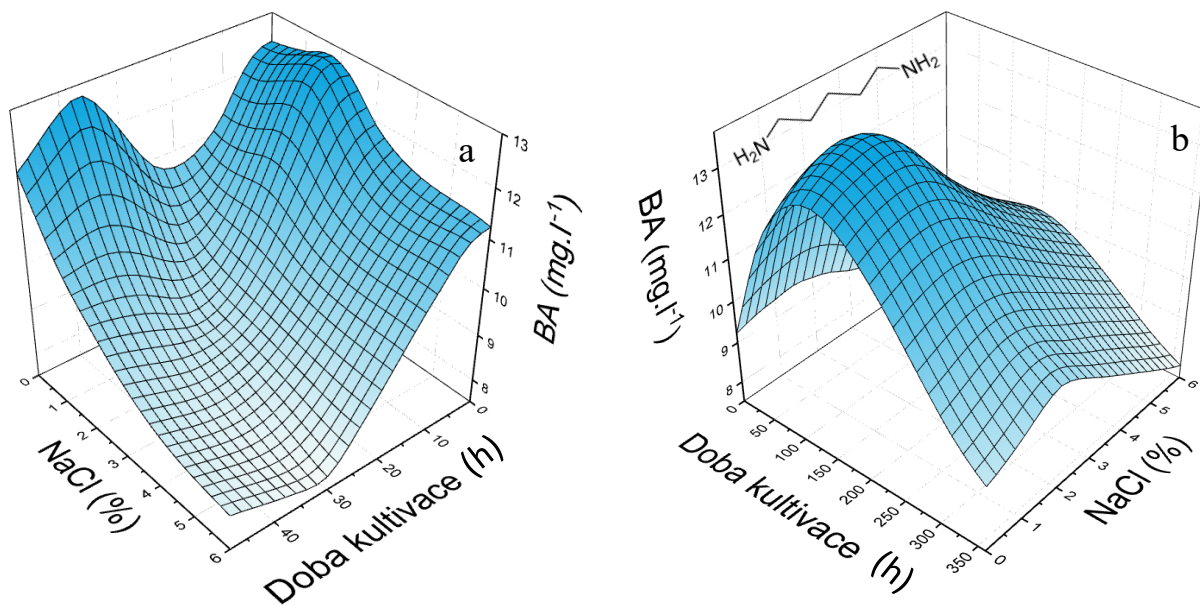
Obr. 24. Kinetika produkce spermidinu 30 °C (a) a 6 °C (b) u *Staphylococcus hominis* 20/2 v závislosti na pH.



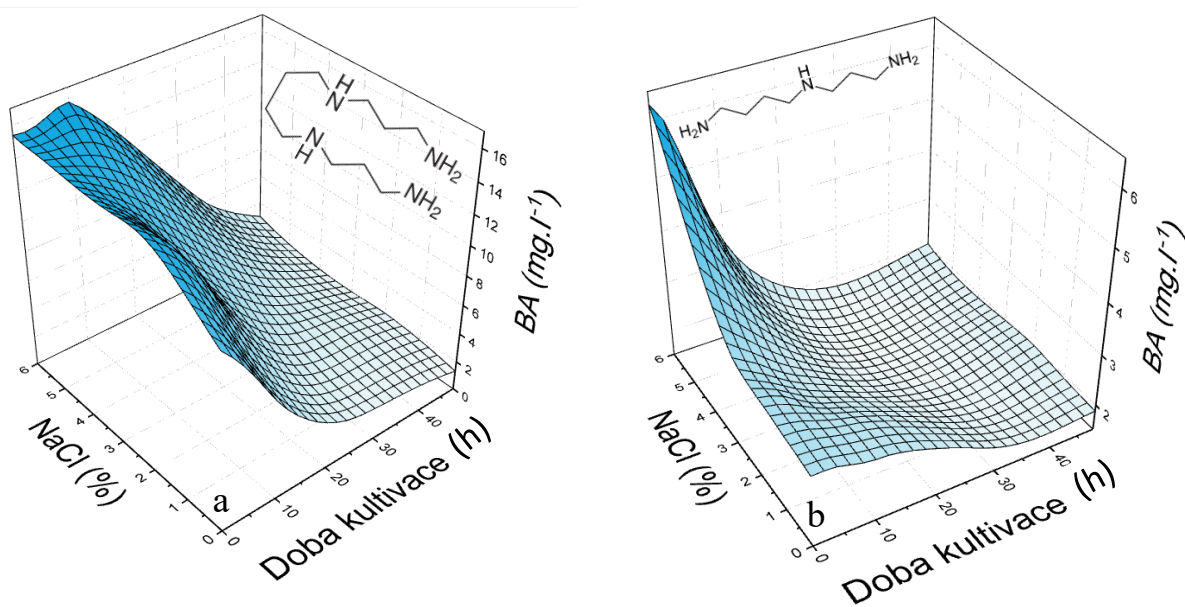
Obr. 25. Kinetika produkce spermidin 6 °C (a) a 30 °C (b) u *Staphylococcus hominis* 20/2 v závislosti na pH.



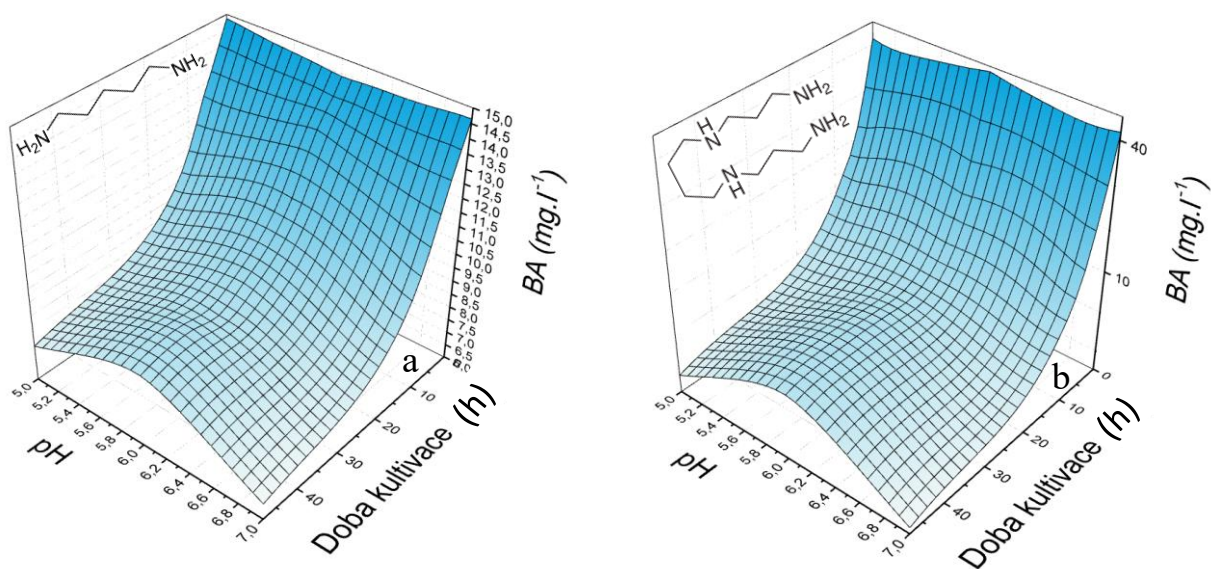
Obr. 26. Kinetika produkce tyraminu (a) a fenyletylaminu (b) při 6 °C u *Staphylococcus hominis* 20/2 závislosti na koncentraci NaCl.



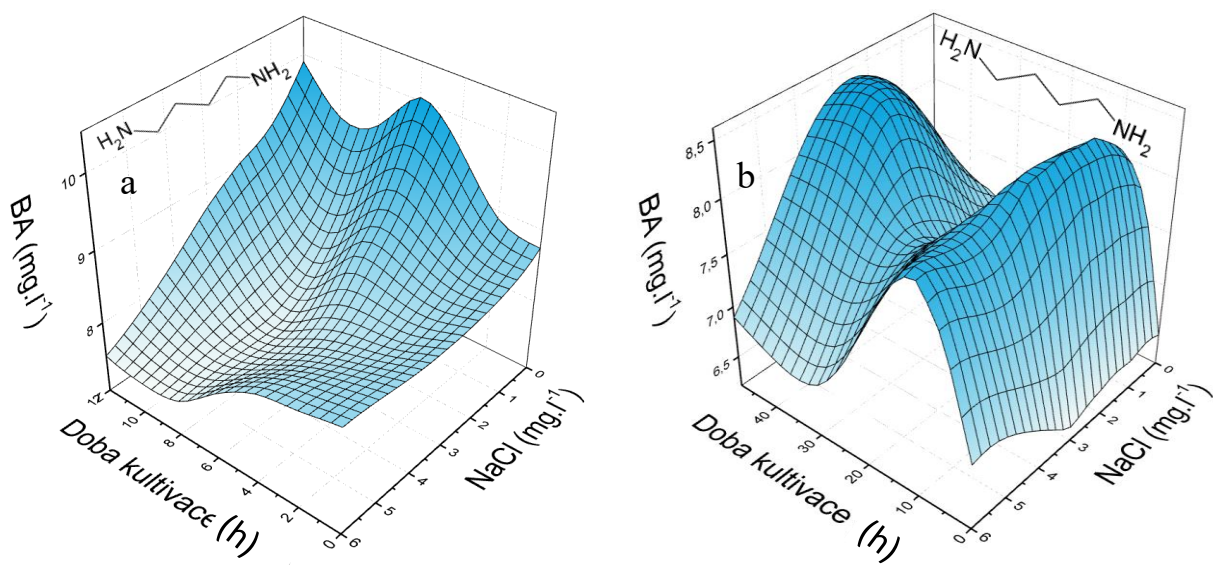
Obr. 27. Kinetika produkce kadaverinu při 30 °C (a) a 6 °C (b) u *Staphylococcus hominis* 20/2 závislosti na koncentraci NaCl.



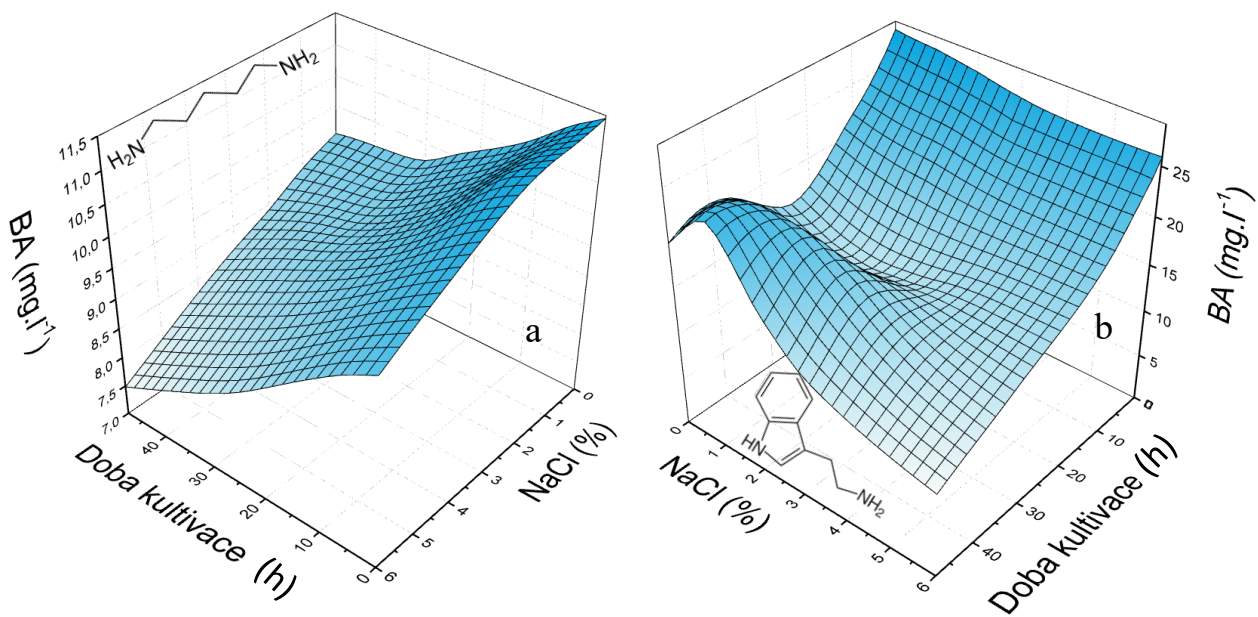
Obr. 28. Kinetika produkce sperminu (a) a spermidinu (b) při 30 °C u *Staphylococcus hominis* 20/2 v závislosti na koncentraci NaCl.



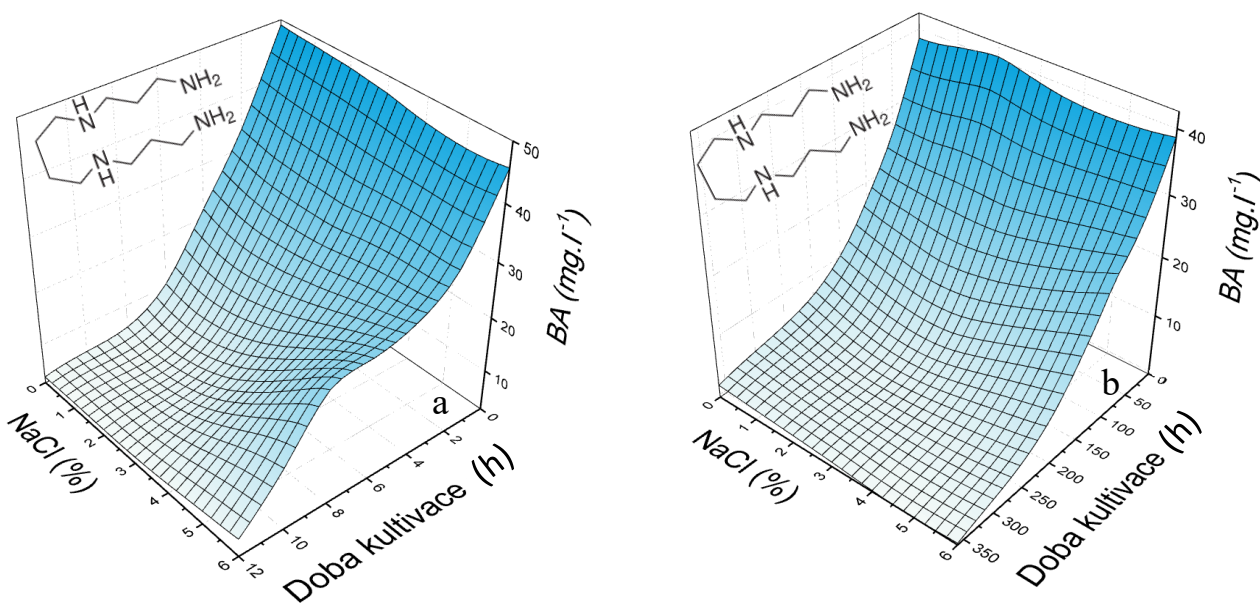
Obr. 29. Kinetika produkce kadaverinu (a) a sperminu (b) při 30 °C u *Staphylococcus epidermidis* 21/2 v závislosti na pH.



Obr. 30. Kinetika produkce putrescinu při 12 °C (a) a 30 °C (b) u *Staphylococcus epidermidis* 21/2 v závislosti na koncentraci NaCl.

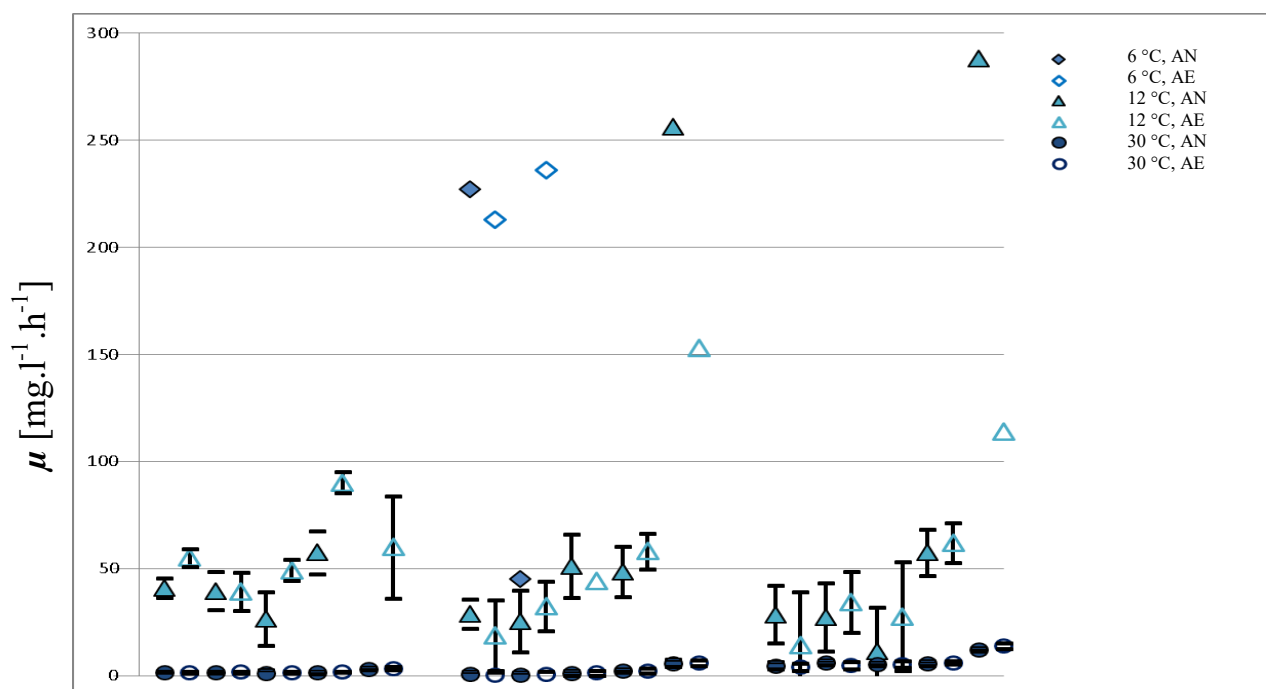
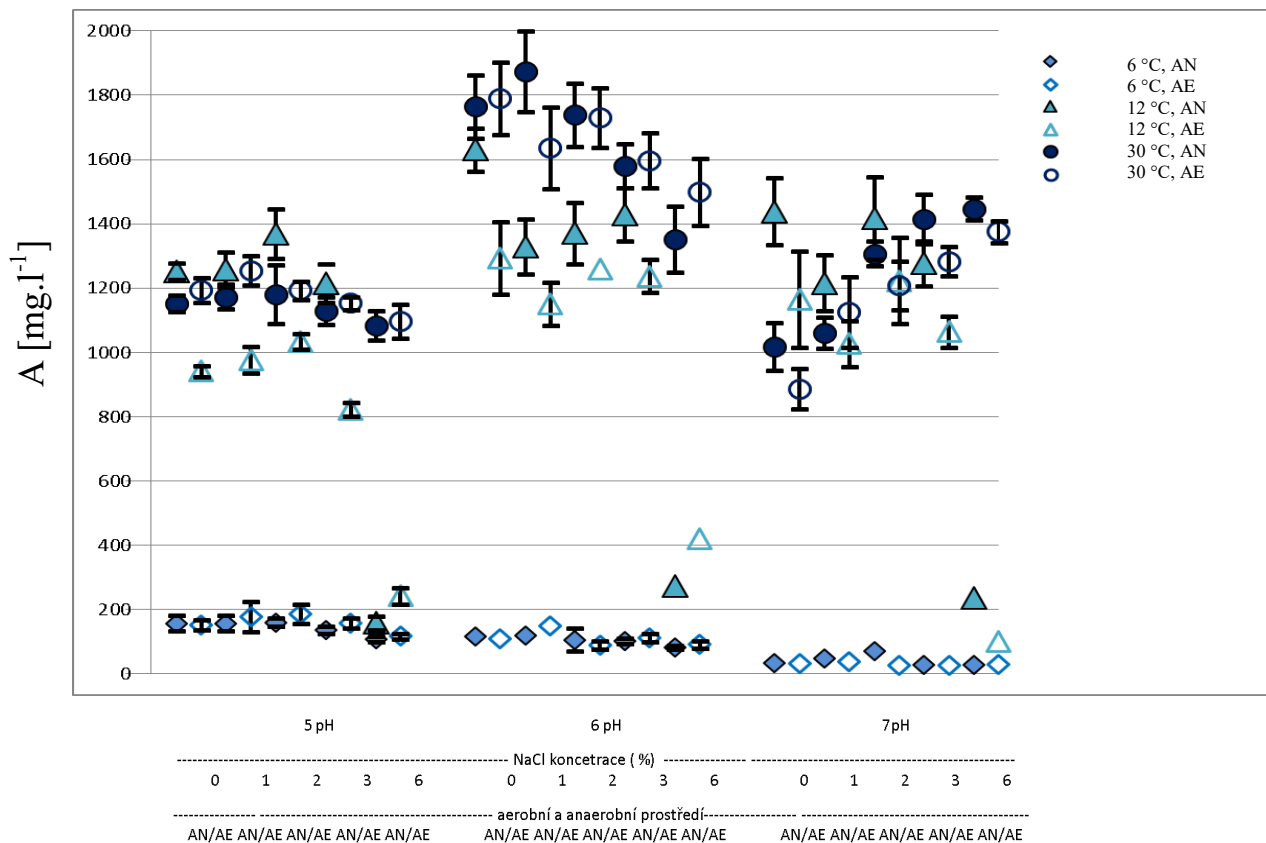


Obr. 31. Kinetika produkce kadaverinu (a) a tryptaminu (b) při 30 °C u *Staphylococcus epidermidis* 21/2 v závislosti na koncentraci NaCl.

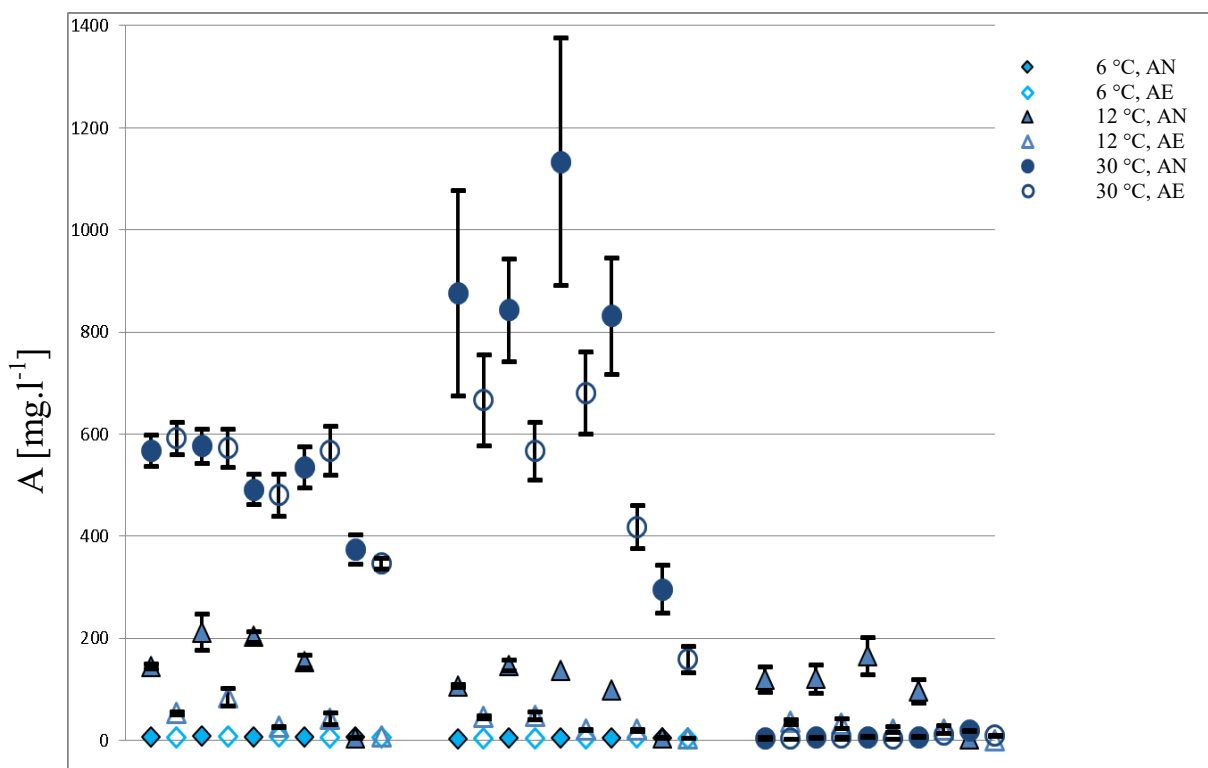
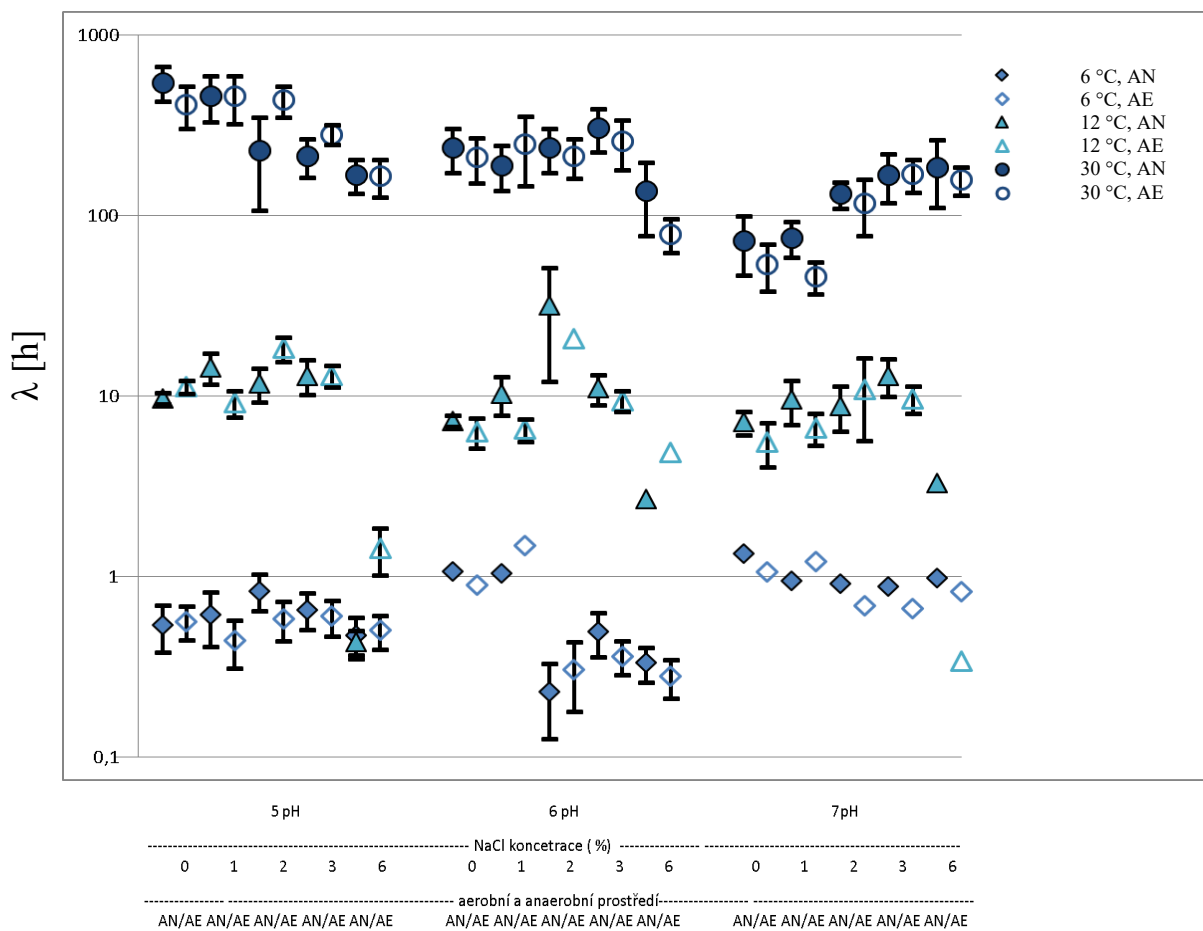


Obr. 32. Kinetika produkce sperminu při 30 °C (a) a při 6 °C (b) u *Staphylococcus epidermidis* 21/2 v závislosti na NaCl.

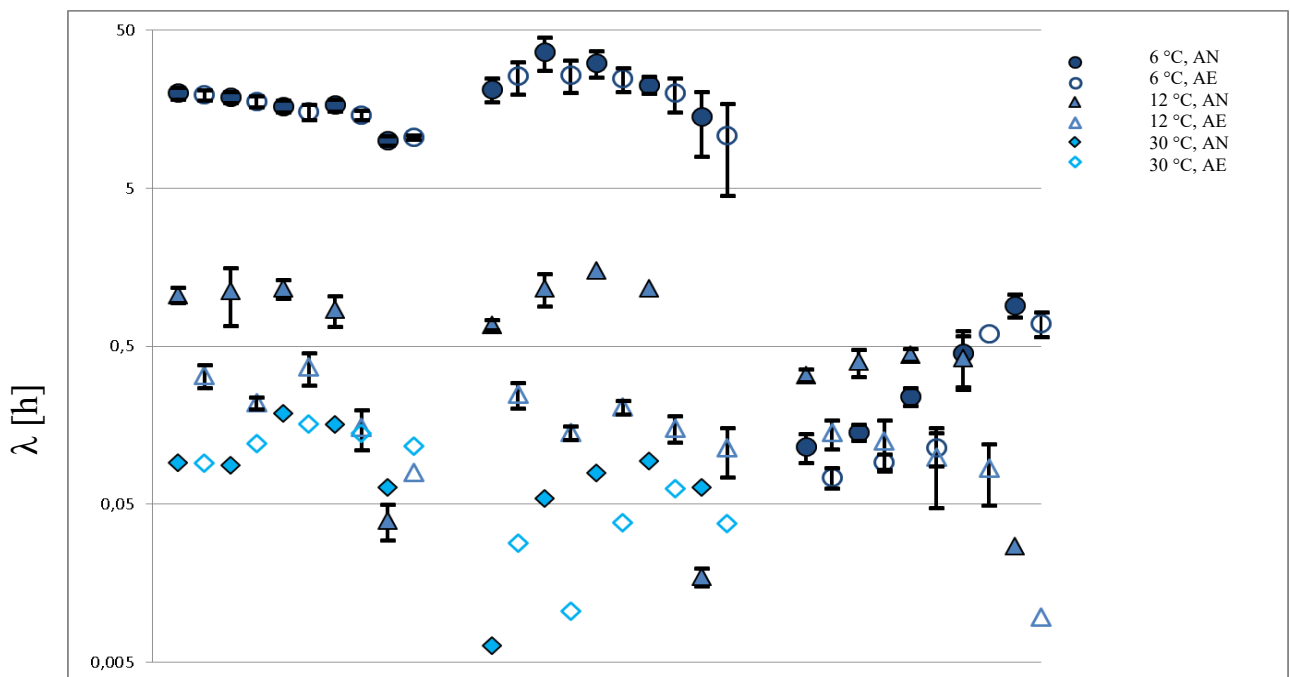
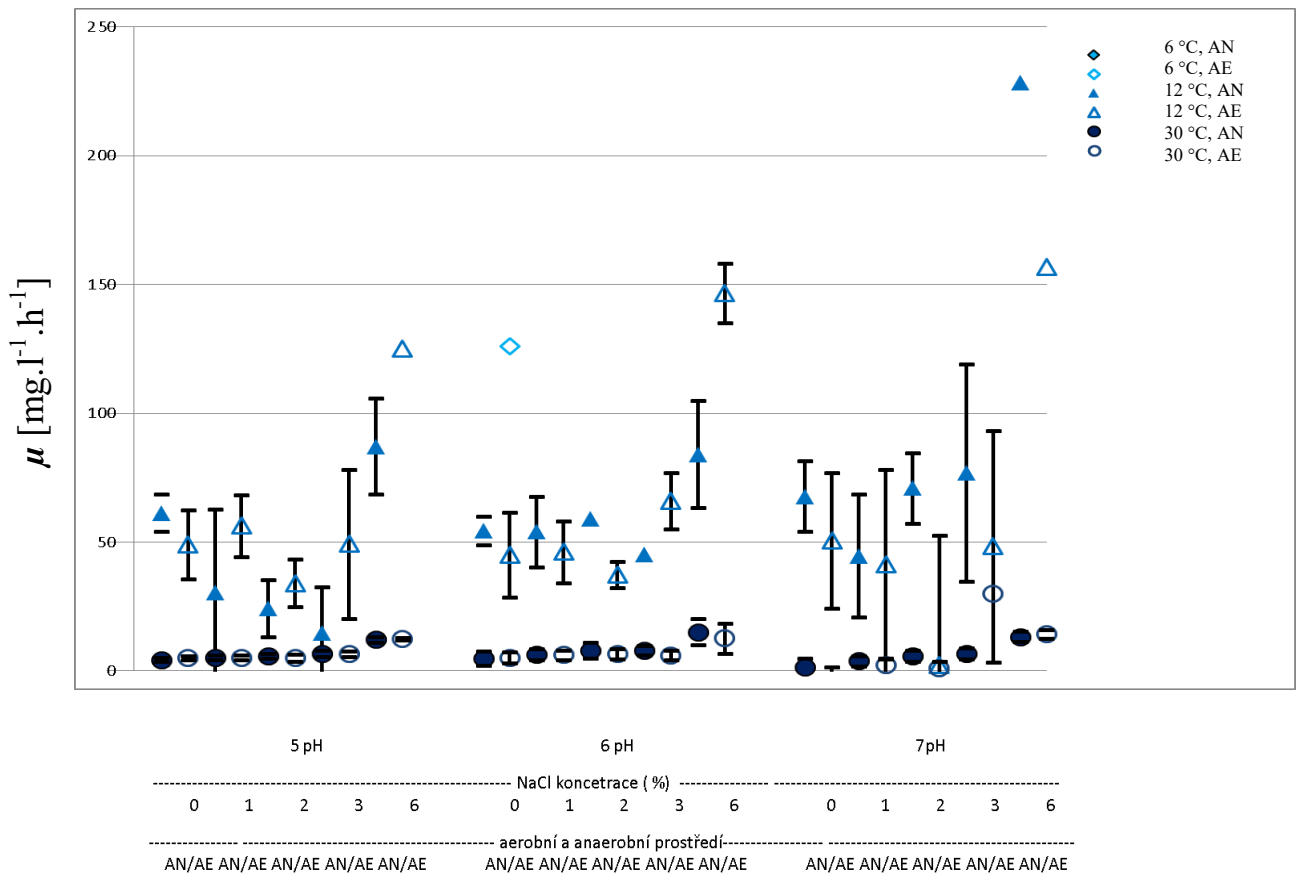
PŘÍLOHA III



Obr. 1. Hodnota parametru A u TYM, *Enterococcus faecium* M2C (nahore), hodnota parametru μ u TYM, *Enterococcus faecium* M2C (dole).



Obr. 2. Hodnota parametru λ u TYM, *Enterococcus faecium* M2C (nahore), hodnota parametru A u PHE, *Enterococcus faecium* M2C (dole).



Obr. 3. Hodnota parametru μ u PHE, *Enterococcus faecium* M2C (nahore), hodnota parametru λ PHE, *Enterococcus faecium* M2C (dole).

PŘÍLOHA IV

Tab. 1. Hodnota parametru A , μ_m a λ *Enterococcus* sp. M5A (TYM, PHE, AN – anaerobně, AE – aerobně).

| Kmen/BA/teplota/pH | NaCl (%) | 0 | 1 | 2 | 3 | 6 | 0 | 1 | 2 | 3 | 6 |
|------------------------|---|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| | AE/AN | AE | AE | AE | AE | AE | AN | AN | AN | AN | AN |
| <i>E</i> .sp./TYM/30/7 | A (mg.Γ¹) | 1,1.10 ³ | 8,6.10 ³ | 6,2.10 ³ | 8,2.10 ³ | 1,2.10 ³ | 1,1.10 ⁴ | 1,1.10 ⁴ | 7,7.10 ³ | 8,6.10 ³ | 2,2.10 ³ |
| | μm (mg.Γ¹.h⁻¹) | 2,4.10 ² | 3,2.10 ¹ | 3,6.10 ¹ | 3,0.10 ¹ | 3,9.10 ¹ | 2,8.10 ¹ | 2,7.10 ¹ | 3,3.10 ¹ | 3,2.10 ¹ | 4,6.10 ¹ |
| | λ (h) | 1,1.10 ⁰ | 1,0.10 ⁻⁴ | 1,0.10 ⁻³ | 1,0.10 ⁻⁴ | 3,8.10 ⁰ | 1,0.10 ⁻⁴ | 1,0.10 ⁻⁴ | 1,0.10 ⁻⁴ | 1,0.10 ⁻⁴ | 1,0.10 ⁻⁴ |
| <i>E</i> .sp./TYM/6/6 | A (mg.Γ¹) | 1,6.10 ⁴ | 5,3.10 ⁴ | 3,2.10 ⁵ | 2,5.10 ² | 3,7.10 ² | 6,8.10 ³ | 4,7.10 ² | 5,0.10 ² | 1,9.10 ⁴ | 3,6.10 ² |
| | μm (mg.Γ¹.h⁻¹) | 7,4.10 ⁰ | 1,8.10 ¹ | 8,8.10 ¹ | 3,8.10 ⁻¹ | 4,6.10 ⁻¹ | 3,5.10 ⁰ | 6,4.10 ⁻¹ | 4,6.10 ⁻¹ | 9,3.10 ⁰ | 4,0.10 ⁻¹ |
| | λ (h) | 7,9.10 ² | 1,1.10 ³ | 1,7.10 ³ | 4,0.10 ¹ | 1,3.10 ² | 6,0.10 ² | 2,6.10 ⁰ | 1,0.10 ⁻⁴ | 8,3.10 ² | 1,2.10 ² |
| <i>E</i> .sp./TYM/6/7 | A (mg.Γ¹) | 1,8.10 ² | 3,2.10 ¹ | 3,8.10 ¹ | 3,2.10 ¹ | 3,4.10 ¹ | 4,8.10 ¹ | 3,7.10 ¹ | 1,3.10 ³ | 3,4.10 ¹ | 3,3.10 ¹ |
| | μm (mg.Γ¹.h⁻¹) | 1,1.10 ⁻¹ | 2,3.10 ⁰ | 1,4.10 ⁻¹ | 2,3.10 ⁻¹ | 2,2.10 ⁻¹ | 1,6.10 ⁻¹ | 1,8.10 ⁻¹ | 4,3.10 ⁻¹ | 2,3.10 ⁻¹ | 2,3.10 ¹ |
| | λ (h) | 1,1.10 ⁻⁴ | 1,1.10 ⁻⁴ | 1,0.10 ⁻⁴ | 1,0.10 ⁻⁴ | 1,0.10 ⁻⁴ | 1,0.10 ⁻⁴ | 1,0.10 ⁻⁴ | 6,4.10 ² | 1,0.10 ⁻⁴ | 1,0.10 ⁻⁴ |
| <i>E</i> .sp./TYM/30/5 | A (mg.Γ¹) | 1,2.10 ³ | 6,6.10 ² | 2,4.10 ² | 6,0.10 ² | 1,8.10 ² | 0,1.10 ⁰ | 0,1.10 ⁰ | 5,9.10 ³ | 5,6.10 ³ | 2,1.10 ⁻⁴ |
| | μm (mg.Γ¹.h⁻¹) | 1,0.10 ⁰ | 2,2.10 ⁰ | 1,0.10 ¹ | 2,1.10 ⁰ | 4,6.10 ⁻¹ | 3,7.10 ⁰ | 3,8.10 ⁰ | 1,9.10 ⁰ | 1,9.10 ⁰ | 8,8.10 ⁰ |
| | λ (h) | 1,0.10 ⁻⁴ | 5,3.10 ¹ | 8,9.10 ¹ | 5,5.10 ¹ | 1,0.10 ⁻⁴ | 1,0.10 ⁰ | 1,0.10 ⁰ | 1,0.10 ⁻⁴ | 1,0.10 ⁻⁴ | 6,9.10 ² |
| <i>E</i> .sp./TYM/30/7 | A (mg.Γ¹) | 1,3.10 ³ | 1,5.10 ³ | 1,2.10 ³ | 1,3.10 ³ | 1,2.10 ³ | 1,3.10 ³ | 4,8.10 ³ | 4,8.10 ³ | 3,7.10 ³ | 1,3.10 ³ |
| | μm (mg.Γ¹.h⁻¹) | 8,4.10 ¹ | 1,2.10 ² | 1,7.10 ² | 1,6.10 ² | 9,3.10 ¹ | 9,0.10 ¹ | 3,7.10 ¹ | 3,5.10 ¹ | 3,2.10 ¹ | 3,1.10 ¹ |
| | λ (h) | 4,6.10 ⁰ | 4,5.10 ⁰ | 5,5.10 ⁰ | 5,9.10 ⁰ | 9,6.10 ⁰ | 3,4.10 ⁰ | 1,0.10 ⁻⁴ | 1,0.10 ⁻⁴ | 1,0.10 ⁻⁴ | 1,0.10 ⁻⁴ |
| <i>E</i> .sp./PHE/30/5 | A (mg.Γ¹) | 3,2.10 ² | 4,9.10 ² | 4,98.10 ² | 4,3.10 ² | 2,3.10 ² | 7,5.10 ² | 6,8.10 ² | 6,4.10 ² | 7,0.10 ² | 5,1.10 ² |
| | μm (mg.Γ¹.h⁻¹) | 2,6.10 ¹ | 1,9.10 ¹ | 1,8.10 ¹ | 1,8.10 ¹ | 7,3.10 ⁰ | 2,8.10 ¹ | 2,7.10 ¹ | 2,2.10 ¹ | 3,1.10 ¹ | 1,1.10 ¹ |
| | λ (h) | 6,2.10 ⁰ | 6,2.10 ⁰ | 7,7.10 ⁰ | 9,8.10 ⁰ | 1,4.10 ¹ | 5,9.10 ⁰ | 7,0.10 ⁰ | 8,4.10 ⁰ | 1,1.10 ¹ | 1,4.10 ¹ |
| <i>E</i> .sp./PHE/30/7 | A (mg.Γ¹) | 1,0.10 ² | 1,8.10 ⁴ | 1,0.10 ² | 1,2.10 ² | 9,0.10 ¹ | 2,0.10 ² | 2,4.10 ² | 2,0.10 ² | 2,2.10 ² | 1,8.10 ² |
| | μm (mg.Γ¹.h⁻¹) | 2,9.10 ⁰ | 9,4.10 ¹ | 4,7.10 ⁰ | 1,9.10 ¹ | 4,0.10 ⁰ | 4,1.10 ⁰ | 7,1.10 ⁰ | 8,6.10 ⁰ | 2,7.10 ¹ | 5,4.10 ⁰ |
| | λ (h) | 7,0.10 ⁰ | 7,8.10 ¹ | 8,2.10 ⁰ | 1,1.10 ¹ | 1,3.10 ¹ | 7,7.10 ⁰ | 8,7.10 ⁰ | 8,7.10 ⁰ | 2,3.10 ¹ | 1,4.10 ¹ |

Tab. 2. Hodnota parametru A , μ_m a λ *Staphylococcus epidermidis* 21/2 (TYM, PHE).

| Kmen/BA/teplota/pH | NaCl (%) | 0 | 1 | 2 | 3 | 6 | 0 | 1 | 2 | 3 | 6 |
|-----------------------|---|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|---------------------|----------------------|
| | AE/AN | AE | AE | AE | AE | AE | AN | AN | AN | AN | AN |
| <i>S.e.</i> /TYM/30/5 | A (mg.Γ¹) | 1,3.10 ³ | 7,4.10 ³ | 5,6.10 ³ | 4,8.10 ³ | 1,1.10 ³ | 1,3.10 ³ | 1,3.10 ³ | 1,3.10 ³ | 1,1.10 ³ | 9,1.10 ² |
| | μm (mg.Γ¹.h⁻¹) | 2,3.10 ² | 2,8.10 ¹ | 2,8.10 ¹ | 3,3.10 ¹ | 4,2.10 ¹ | 5,2.10 ² | 9,2.10 ¹ | 9,3.10 ¹ | 2,5.10 ² | 2,7.10 ¹ |
| | λ (h) | 5,0.10 ⁻¹ | 1,0.10 ⁻⁴ | 1,0.10 ⁻⁴ | 1,0.10 ⁻⁴ | 7,6.10 ⁰ | 5,6.10 ⁰ | 9,4.10 ⁻⁴ | 1,0.10 ⁻⁴ | 5,2.10 ⁰ | 1,1.10 ⁻⁴ |
| <i>S.e.</i> /TYM/30/6 | A (mg.Γ¹) | 1,4.10 ³ | 7,8.10 ³ | 8,3.10 ³ | 1,5.10 ³ | 1,2.10 ³ | 1,4.10 ³ | 1,3.10 ³ | 1,3.10 ³ | 1,2.10 ³ | 1,0.10 ³ |
| | μm (mg.Γ¹.h⁻¹) | 2,2.10 ² | 3,0.10 ¹ | 2,6.10 ¹ | 5,5.10 ¹ | 3,3.10 ¹ | 1,5.10 ² | 1,3.10 ² | 7,0.10 ² | 4,0.10 ² | 6,4.10 ¹ |
| | λ (h) | 5,8.10 ⁰ | 1,0.10 ⁻⁴ | 1,0.10 ⁻⁴ | 1,0.10 ⁻⁴ | 1,0.10 ⁻⁴ | 1,8.10 ⁻² | 2,2.10 ⁰ | 5,5.10 ⁰ | 3,8.10 ⁰ | 5,3.10 ⁰ |
| <i>S.e.</i> /TYM/30/7 | A (mg.Γ¹) | 1,0.10 ³ | 1,2.10 ³ | 9,9.10 ² | 1,1.10 ³ | 1,0.10 ³ | 1,1.10 ³ | 1,1.10 ³ | 1,1.10 ³ | 1,1.10 ³ | 1,1.10 ³ |
| | μm (mg.Γ¹.h⁻¹) | 6,7.10 ¹ | 9,1.10 ¹ | 2,4.10 ² | 1,8.10 ² | 7,9.10 ¹ | 8,4.10 ¹ | 3,3.10 ² | 3,0.10 ³ | 3,6.10 ² | 4,7.10 ² |
| | λ (h) | 6,1.10 ⁰ | 1,1.10 ⁻⁴ | 1,8.10 ⁻¹ | 4,8.10 ⁰ | 1,0.10 ⁻⁴ | 9,9.10 ⁰ | 6,0.10 ⁰ | 6,0.10 ⁰ | 6,0.10 ⁰ | 6,0.10 ⁰ |
| <i>S.e.</i> /TYM/6/6 | A (mg.Γ¹) | 9,4.10 ² | 1,6.10 ³ | 1,7.10 ³ | 1,2.10 ³ | 1,2.10 ³ | 1,6.10 ³ | 1,7.10 ³ | 1,3.10 ³ | 1,3.10 ³ | 1,2.10 ³ |
| | μm (mg.Γ¹.h⁻¹) | 2,6.10 ¹ | 6,7.10 ⁰ | 5,6.10 ⁰ | 2,6.10 ¹ | 2,7.10 ¹ | 4,8.10 ⁰ | 7,8.10 ⁰ | 7,4.10 ⁰ | 6,1.10 ⁰ | 1,2.10 ¹ |
| | λ (h) | 3,0.10 ⁻¹ | 1,1.10 ⁻⁴ | 1,8.10 ⁰ | 8,9.10 ⁰ | 3,7.10 ⁻¹ | 3,6.10 ⁰ | 1,4.10 ⁰ | 1,0.10 ⁻⁴ | 1,8.10 ¹ | 1,2.10 ² |
| <i>S.e.</i> /PHE/6/6 | A (mg.Γ¹) | 1,2.10 ² | 1,5.10 ² | 1,3.10 ² | 8,9.10 ¹ | 8,5.10 ¹ | 1,6.10 ² | 9,5.10 ² | 1,9.10 ² | 2,3.10 ² | 1,9.10 ² |
| | μm (mg.Γ¹.h⁻¹) | 3,6.10 ⁻¹ | 4,4.10 ⁰ | 5,9.10 ⁻¹ | 1,1.10 ¹ | 7,0.10 ⁻¹ | 7,1.10 ⁻¹ | 1,5.10 ⁰ | 2,6.10 ⁰ | 3,0.10 ⁰ | 7,4.10 ⁻¹ |
| | λ (h) | 7,0.10 ¹ | 9,0.10 ⁰ | 1,1.10 ² | 1,2.10 ¹ | 1,4.10 ² | 9,8.10 ¹ | 1,7.10 ² | 1,3.10 ² | 1,8.10 ² | 1,3.10 ² |
| <i>S.e.</i> /PHE/6/5 | A (mg.Γ¹) | 5,7.10 ² | 8,2.10 ² | 4,1.10 ² | 4,8.10 ² | 1,0.10 ⁴ | 9,4.10 ² | 6,5.10 ² | 5,2.10 ² | 6,3.10 ² | 1,2.10 ² |
| | μm (mg.Γ¹.h⁻¹) | 1,5.10 ¹ | 1,6.10 ¹ | 1,6.10 ¹ | 7,8.10 ⁰ | 1,3.10 ² | 1,6.10 ¹ | 1,2.10 ¹ | 6,9.10 ⁰ | 9,3.10 ⁰ | 1,0.10 ¹ |
| | λ (h) | 8,4.10 ⁰ | 1,1.10 ¹ | 1,0.10 ¹ | 1,0.10 ⁻⁴ | 5,0.10 ¹ | 7,2.10 ⁻⁴ | 9,8.10 ⁰ | 1,0.10 ⁻³ | 1,4.10 ⁰ | 2,1.10 ¹ |
| <i>S.e.</i> /PHE/30/5 | A (mg.Γ¹) | 3,3.10 ² | 3,5.10 ² | 2,5.10 ² | 3,6.10 ² | 2,3.10 ⁴ | 3,1.10 ² | 4,9.10 ² | 4,2.10 ² | 4,2.10 ² | 1,0.10 ³ |
| | μm (mg.Γ¹.h⁻¹) | 1,5.10 ¹ | 8,5.10 ⁰ | 2,6.10 ¹ | 1,3.10 ¹ | 7,2.10 ¹ | 9,0.10 ⁰ | 2,1.10 ¹ | 6,9.10 ⁰ | 1,9.10 ¹ | 1,1.10 ¹ |
| | λ (h) | 6,3.10 ⁰ | 1,4.10 ⁰ | 6,0.10 ⁻¹ | 1,1.10 ¹ | 1,2.10 ² | 9,3.10 ⁻⁴ | 7,3.10 ⁰ | 1,0.10 ⁻³ | 9,8.10 ⁰ | 2,7.10 ¹ |

Tab. 3. Hodnota parametru A , μ_m a λ *Staphylococcus epidermidis* 21/2 a *Staphylococcus hominis* 20/2 (TYM, PHE).

| Kmen/BA/teplota/pH | NaCl (%) | 0 | 1 | 2 | 3 | 6 | 0 | 1 | 2 | 3 | 6 |
|-----------------------|---|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| | AE/AN | AE | AE | AE | AE | AE | AN | AN | AN | AN | AN |
| <i>S.h.</i> /TYM/30/5 | A (mg.Γ¹) | 8,8.10 ² | 1,3.10 ³ | 3,3.10 ³ | 1,1.10 ⁴ | 1,4.10 ³ | 1,3.103 | 1,6.10 ³ | 1,8.10 ⁵ | 2,3.10 ³ | 3,5.10 ⁵ |
| | μm (mg.Γ¹.h⁻¹) | 2,6.10 ¹ | 5,6.10 ¹ | 4,4.10 ¹ | 1,3.10 ² | 5,2.10 ¹ | 1,5.102 | 3,0.10 ¹ | 1,6.10 ³ | 5,2.10 ¹ | 1,8.10 ³ |
| | λ (h) | 1,8.10 ⁰ | 5,0.10 ⁰ | 1,4.10 ¹ | 4,7.10 ¹ | 3,0.10 ¹ | 7,5.100 | 1,0.10 ⁻⁴ | 7,3.10 ¹ | 2,8.10 ¹ | 1,1.10 ² |
| <i>S.h.</i> /TYM/30/7 | A (mg.Γ¹) | 1,5.10 ³ | 1,4.10 ³ | 1,6.10 ³ | 1,4.10 ³ | 1,1.10 ³ | 1,4.103 | 1,3.10 ³ | 1,6.10 ³ | 1,7.10 ³ | 1,5.10 ³ |
| | μm (mg.Γ¹.h⁻¹) | 4,4.10 ² | 4,7.10 ² | 5,2.10 ¹ | 5,2.10 ¹ | 5,1.10 ¹ | 6,5.102 | 6,8.10 ¹ | 5,5.10 ¹ | 4,0.10 ¹ | 3,3.10 ¹ |
| | λ (h) | 7,4.10 ⁰ | 7,6.10 ⁰ | 1,3.10 ¹ | 6,9.10 ⁻¹ | 7,2.10 ⁰ | 7,8.100 | 1,0.10 ⁻⁴ | 3,3.10 ⁰ | 1,0.10 ⁻⁴ | 5,2.10 ⁰ |
| <i>S.h.</i> /TYM/6/5 | A (mg.Γ¹) | 1,4.10 ² | 1,5.10 ² | 8,5.10 ¹ | 1,1.10 ² | 7,0.10 ¹ | 1,5.102 | 1,2.10 ² | 7,2.10 ¹ | 1,1.10 ² | 7,3.10 ¹ |
| | μm (mg.Γ¹.h⁻¹) | 6,4.10 ⁰ | 1,2.10 ⁰ | 1,2.10 ⁰ | 2,2.10 ⁰ | 1,6.10 ⁰ | 1,6.100 | 1,2.10 ⁰ | 6,6.10 ⁻¹ | 1,2.10 ⁰ | 4,0.10 ⁰ |
| | λ (h) | 2,0.10 ¹ | 1,0.10 ⁻⁴ | 2,1.10 ⁰ | 1,2.10 ¹ | 3,0.10 ⁰ | 3,4.100 | 2,7.10 ⁻¹ | 1,0.10 ⁻⁴ | 1,0.10 ⁻⁴ | 1,7.10 ¹ |
| <i>S.h.</i> /TYM/6/7 | A (mg.Γ¹) | 1,2.10 ² | 1,3.10 ² | 4,0.10 ² | 1,4.10 ² | 1,6.10 ² | 1,2.102 | 1,3.10 ² | 2,9.10 ² | 3,0.10 ² | 2,2.10 ² |
| | μm (mg.Γ¹.h⁻¹) | 1,5.10 ⁰ | 8,1.10 ⁻¹ | 4,0.10 ⁻¹ | 6,5.10 ⁻¹ | 4,6.10 ⁻¹ | 6,6.10-1 | 2,7.10 ⁰ | 4,0.10 ⁻¹ | 4,3.10 ⁻¹ | 4,7.10 ⁻¹ |
| | λ (h) | 1,0.10 ⁻⁴ | 1,1.10 ⁻⁴ | 1,0.10 ⁻⁴ | 1,0.10 ⁻⁴ | 1,2.10 ¹ | 4,8.10-1 | 1,0.10 ⁻⁴ | 1,0.10 ⁻⁴ | 1,0.10 ⁻⁴ | 2,9.10 ¹ |
| <i>S.h.</i> /PHE/30/7 | A (mg.Γ¹) | 1,2.10 ³ | 1,1.10 ³ | 6,6.10 ⁴ | 6,4.10 ² | 3,2.10 ² | 1,5.103 | 7,4.10 ² | 6,6.10 ² | 6,8.10 ² | 1,4.10 ⁴ |
| | μm (mg.Γ¹.h⁻¹) | 2,2.10 ¹ | 1,7.10 ¹ | 3,1.10 ² | 1,1.10 ¹ | 6,2.10 ⁰ | 2,3.101 | 1,2.10 ¹ | 1,8.10 ¹ | 1,7.10 ¹ | 9,3.10 ¹ |
| | λ (h) | 1,4.10 ¹ | 1,3.10 ¹ | 9,4.10 ¹ | 9,7.10 ⁰ | 1,4.10 ¹ | 1,4.101 | 1,0.10 ⁻⁴ | 9,8.10 ⁻¹ | 1,3.10 ¹ | 6,6.10 ¹ |
| <i>S.e.</i> /TYM/6/5 | A (mg.Γ¹) | 1,3.10 ³ | 1,6.10 ³ | 1,5.10 ³ | 1,3.10 ³ | 1,2.10 ³ | 1,4.103 | 1,5.10 ₃ | 1,3.10 ³ | 1,3.10 ³ | 1,2.10 ³ |
| | μm (mg.Γ¹.h⁻¹) | 8,7.10 ¹ | 8,8.10 ⁰ | 6,3.10 ⁰ | 4,0.10 ¹ | 2,6.10 ¹ | 7,5.101 | 1,3.10 ² | 7,9.10 ⁰ | 7,3.10 ⁰ | 1,3.10 ¹ |
| | λ (h) | 6,4.10 ⁰ | 7,3.10 ¹ | 1,0.10 ⁻² | 1,5.10 ² | 1,6.10 ² | 4,5.100 | 5,8.10 ⁰ | 4,9.10 ¹ | 7,2.10 ¹ | 1,5.10 ² |
| <i>S.e.</i> /TYM/12/7 | A (mg.Γ¹) | 1,3.10 ³ | 1,2.10 ³ | 1,1.10 ³ | 1,1.10 ³ | 1,1.10 ³ | 1,4.103 | 1,3.10 ³ | 1,1.10 ³ | 1,1.10 ³ | 1,1.10 ³ |
| | μm (mg.Γ¹.h⁻¹) | 8,7.10 ¹ | 5,6.10 ² | 2,1.10 ¹ | 3,1.10 ² | 5,1.10 ¹ | 1,8.102 | 3,7.10 ² | 3,4.10 ² | 1,8.10 ² | 4,3.10 ¹ |
| | λ (h) | 6,4.10 ⁰ | 5,8.10 ⁰ | 4,2.10 ⁰ | 5,8.10 ⁰ | 8,5.10 ⁰ | 6,6.100 | 5,6.10 ⁰ | 3,6.10 ⁰ | 7,0.10 ⁰ | 5,1.10 ⁰ |

Tab. 4. Hodnota parametru A , μ_m a λ *Staphylococcus pasteurii* 19/1 (TYM, PHE).

| Kmen/BA/teplota/pH | NaCl (%) | 0 | 1 | 2 | 3 | 6 | 0 | 1 | 2 | 3 | 6 |
|-----------------------|---|---------------------|---------------------|----------------------|---------------------|----------------------|----------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| | AE/AN | AE | AE | AE | AE | AE | AN | AN | AN | AN | AN |
| <i>S.p.</i> /TYM/30/6 | A (mg.Γ¹) | 1,5.10 ³ | 1,4.10 ³ | 1,3.10 ³ | 1,2.10 ³ | 1,1.10 ³ | 1,4.103 | 1,1.10 ³ | 1,3.10 ³ | 1,2.10 ³ | 1,0.10 ³ |
| | μm (mg.Γ¹.h⁻¹) | 2,2.10 ² | 5,2.10 ¹ | 4,6.10 ¹ | 1,9.10 ² | 1,9.10 ² | 3,7.102 | 2,8.10 ² | 2,4.10 ² | 3,2.10 ² | 6,6.10 ¹ |
| | λ (h) | 4,0.10 ⁰ | 3,3.10 ⁰ | 7,5.10 ⁰ | 4,8.10 ⁰ | 6,6.10 ⁰ | 7,3.100 | 3,8.10 ⁰ | 5,3.10 ⁰ | 6,8.10 ⁰ | 5,4.10 ⁰ |
| <i>S.p.</i> /TYM/6/6 | A (mg.Γ¹) | 4,3.10 ² | 3,4.10 ² | 1,2.10 ² | 2,6.10 ³ | 1,1.10 ² | 5,5.102 | 3,8.10 ² | 1,8.10 ² | 2,7.10 ² | 1,1.10 ² |
| | μm (mg.Γ¹.h⁻¹) | 3,8.10 ⁰ | 2,1.10 ⁰ | 5,0.10 ⁻¹ | 2,0.10 ⁰ | 5,5.10 ⁻¹ | 9,7.100 | 1,2.10 ⁰ | 8,9.10 ⁻¹ | 6,9.10 ⁻¹ | 5,0.10 ⁻¹ |
| | λ (h) | 1,2.10 ² | 8,8.10 ¹ | 1,0.10 ⁰ | 3,0.10 ² | 1,1.10 ¹ | 1,6.102 | 7,3.10 ¹ | 4,7.10 ¹ | 1,6.10 ¹ | 1,0.10 ⁻⁴ |
| <i>S.p.</i> /TYM/12/7 | A (mg.Γ¹) | 5,5.10 ² | 4,5.10 ² | 3,1.10 ² | 7,5.10 ² | 1,1.10 ² | 1,0.103 | 1,0.10 ³ | 3,2.10 ² | 9,2.10 ² | 1,3.10 ³ |
| | μm (mg.Γ¹.h⁻¹) | 3,2.10 ⁰ | 9,2.10 ⁰ | 1,1.10 ⁰ | 8,0.10 ⁰ | 4,0.10 ⁻¹ | 3,3.100 | 3,4.10 ⁰ | 3,5.10 ⁰ | 5,9.10 ⁰ | 1,4.10 ⁰ |
| | λ (h) | 3,3.10 ¹ | 9,1.10 ¹ | 1,0.10 ⁰ | 9,6.10 ¹ | 6,5.10 ⁰ | 5,4.101 | 6,8.10 ¹ | 7,4.10 ¹ | 1,1.10 ² | 1,5.10 ² |
| <i>S.p.</i> /TYM/30/5 | A (mg.Γ¹) | 1,6.10 ³ | 1,4.10 ³ | 1,8.10 ³ | 1,3.10 ³ | 7,7.10 ² | 1,3.103 | 1,3.10 ³ | 1,3.10 ³ | 1,1.10 ³ | 9,1.10 ² |
| | μm (mg.Γ¹.h⁻¹) | 1,5.10 ² | 2,1.10 ² | 1,0.10 ² | 1,3.10 ² | 3,9.10 ² | 4,2.102 | 9,2.10 ¹ | 9,3.10 ¹ | 2,5.10 ² | 2,7.10 ¹ |
| | λ (h) | 1,5.10 ⁰ | 2,8.10 ⁰ | 1,0.10 ⁰ | 2,1.10 ⁰ | 7,6.10 ⁰ | 5,1.100 | 9,4.10 ⁻⁴ | 1,0.10 ⁻⁴ | 5,2.10 ⁰ | 1,1.10 ⁻⁴ |
| <i>S.p.</i> /TYM/30/7 | A (mg.Γ¹) | 1,3.10 ³ | 1,5.10 ³ | 1,6.10 ³ | 1,2.10 ³ | 8,8.10 ² | 1,3.103 | 1,2.10 ³ | 1,3.10 ³ | 1,1.10 ³ | 1,3.10 ³ |
| | μm (mg.Γ¹.h⁻¹) | 2,5.10 ² | 1,0.10 ² | 9,8.10 ¹ | 1,9.10 ² | 4,1.10 ¹ | 1,6.102 | 1,3.10 ² | 8,0.10 ² | 4,5.10 ² | 7,4.10 ¹ |
| | λ (h) | 3,9.10 ⁰ | 1,7.10 ⁰ | 1,0.10 ⁰ | 4,2.10 ⁰ | 4,0.10 ⁰ | 1,7.10-2 | 2,2.10 ⁰ | 5,5.10 ⁰ | 3,8.10 ⁰ | 2,3.10 ⁰ |

