

Vliv vnějšího prostředí na produkci histaminu kmenem *Enterobacter aerogenes* CCM 2531

Ing. Pavlína Klčovská

Diplomová práce

2011



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav chemie

akademický rok: 2010/2011

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Ing. Pavlína KLČOVSKÁ**
Osobní číslo: **T080360**
Studijní program: **N 2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Chemie potravin a bioaktivních látek**

Téma práce: **Vliv vnějšího prostředí na produkci histaminu kmenem *Enterobacter aerogenes* CCM 2531**

Zásady pro vypracování:

I. Teoretická část

1. Charakteristika biogenních aminů.
2. Charakteristika bakterií čeledi Enterobacteriaceae.
3. Faktory ovlivňující produkci biogenních aminů.

II. Praktická část

1. Sledování vybraných faktorů (teploty, pH prostředí, dostupnosti kyslíku, přídavku aminokyseliny a kofaktoru na produkci biogenních aminů u kmene *Enterobacter aerogenes* CCM 2531
2. Statistické zpracování výsledků.
3. Formulace závěrů na základě získaných výsledků.

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

[1] IVO SEDLÁČEK, Taxonomie prokaryot, Masarykova univerzita Brno 2007, ISBN 80-210-4207.

[2] KRÍŽEK, M., KALAČ, P., Biogenní aminy v potravinách a jejich role ve výživě. Czech journal of food science :1998, roč. 16.

[3] KAROVIČOVÁ, J., KOHAJDOVÁ, Z. Biogenic amines in food. Chemical papers. 2005, 59 (1), ISSN 036676352.

[4] HALÁSZ, A., BARÁTH, A., SIMON-SARKADI, L., HOLZAPFEL, W. Biogenic amines and their production by microorganisms. Trends Food Sci Technol 1994.

[5] BRINKL B., DAMINK C., JOOSTEN H. M. L. J., HUIST VELD, J. H. J, Occurrence and formation of biologically active amines in foods, Int , J.Food Microbiol., 1990

Vedoucí diplomové práce:

doc. RNDr. Leona Buňková, Ph.D.

Ústav technologie tuků, tenzidů a kosmetiky

Datum zadání diplomové práce:

14. února 2011

Termín odevzdání diplomové práce:

9. května 2011

Ve Zlíně dne 14. února 2011



doc. Ing. Petr Hlaváček, CSc.
děkan



prof. Ing. Antonín Klásek, DrSc.
ředitel ústavu

ABSTRAKT

Biogenní aminy jsou látky vznikající v potravinách účinkem mikrobiálních enzymů. Vysoké koncentrace biogenních aminů mohou mít negativní vliv na lidské zdraví. Práce se zabývá vlivem vnějších faktorů (vliv aerobního a anaerobního prostředí, vliv přídavku aminokyseliny histidinu o různé koncentraci, vliv teploty, vliv pH, vliv přídavku NaCl a vliv přítomnosti kofaktoru pyridoxal-5-fosfátu), které mohou ovlivňovat dekarboxylázovou aktivitu enterobakterií.

Nejvyšší produkce histaminu byla zjištěna v případě, že byl *Enterobacter aerogenes* CCM 2531 kultivován bez přístupu kyslíku při teplotě 37 °C v bujónu o pH 6 se 2,0 % (w/v) histidinu a 0,005 % (w/v) pyridoxalfosfátu. Dekarboxylázová aktivita byla u tohoto kmene ovlivněna zejména pH, dostupností kyslíku a koncentrací přidané aminokyseliny, ostatní testované faktory měly na produkci histaminu menší vliv.

Klíčová slova: biogenní aminy, histamin, *Enterobacter aerogenes*

ABSTRACT

Biogenic amines are substances formed in food by enzyme activity. High concentrations of biogenic amines may have negative effect on human health. This dissertation is describing the effect of external factors (aerobic and anaerobic conditions, addition of amino acid-histidine in various concentrations, temperature, pH, addition of NaCl and presence of cofactor-pyridoxal-5-phosphate), which may affect decarboxylating activity of enterobacteria.

The highest production of histamine was found in case where *Enterobacter aerogenes* CCM 2531 was cultivated in anaerobic conditions with temperature of 37 °C on cultivation broth of pH 6 with 2,0 % (w/v) of histidine and 0,005 % (w/v) pyridoxal phosphate. For this strain of bacteria the decarboxylating activity was affected by pH, accessibility of oxygen and by the concentration of added amino acid. The other factors tested affected the production of histamin not as significantly.

Keywords: biogenic amines, histamine, *Enterobacter aerogenes*

Děkuji doc. RNDr. Leoně Buňkové, Ph.D. za odborný dohled, poskytnutí potřebných materiálů a rad při vypracování mé diplomové práce. Dále děkuji doc. Ing. Františku Buňkovi, Ph.D. a Mgr. Ivě Doležákové za jejich spolupráci, konzultace a cenné rady.

Prohlašuji, že jsem na bakalářské/diplomové práci pracoval(a) samostatně a použitou literaturu jsem citoval(a). V případě publikace výsledků, je-li to uvedeno na základě licenční smlouvy, budu uveden(a) jako spoluautor(ka).

Ve Zlíně

.....

Podpis studenta

OBSAH

ÚVOD	8
I TEORETICKÁ ČÁST	9
1 BIOGENNÍ AMINY.....	10
1.1 VZNIK A ROZDĚLENÍ BIOGENNÍCH AMINŮ	10
1.2 BIOLOGICKÝ VÝZNAM A ÚČINKY BIOGENNÍCH AMINŮ	14
1.2.1 Účinky biogenních aminů	15
1.2.2 Histamin	16
Scombroid syndrom	16
1.2.3 Tyramin	17
1.2.4 Putrescin a kadaverin	17
1.2.5 Spermidin	17
1.3 VÝSKYT BIOGENNÍCH AMINŮ	18
1.3.1 Nefermentované potraviny	18
1.3.1.1 Maso, masné výrobky a ryby	18
1.3.1.2 Ovoce a zelenina	19
1.3.1.3 Mléko a mléčné výrobky	19
1.3.2 Fermentované potraviny	19
1.3.2.1 Fermentované masné výrobky	20
1.3.2.2 Fermentovaná zelenina	20
1.3.2.3 Nápoje	20
1.4 MIKROORGANIZMY PRODUKUJÍCÍ BIOGENNÍ AMINY.....	22
1.5 FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ TVORBU BIOGENNÍCH AMINŮ.....	24
1.5.1 Koncentrace substrátu a pH	24
1.5.2 Teplota	24
1.5.3 Přítomnost solí a kyslíku	24
1.5.4 Ostatní faktory	25
2 ČELEĎ ENTEROBACTERIACAE	26
2.1 MORFOLOGIE	26
2.2 KULTIVACE.....	27
2.3 BIOCHEMICKÉ VLASTNOSTI.....	27
2.4 KLINICKÝ VÝZNAM	28
2.5 PRODUKCE BIOGENNÍCH AMINŮ ENTEROBAKTERIEMI	28
2.6 ZÁKLADNÍ CHARAKTERISTIKA BAKTERIE RODU <i>ENTEROBACTER</i>	29
II PRAKTICKÁ ČÁST.....	30
3 CÍLE PRÁCE.....	31
4 MATERIÁL A METODY	32

4.1	PŘÍSTROJE.....	32
4.2	PŘÍPRAVA PŮD A KULTIVACE MIKROORGANIZMŮ	32
4.3	ANALÝZA PRODUKCE BIOGENNÍCH AMINŮ	33
4.3.1	Roztoky pro iontově-výměnnou chromatografii.....	34
4.4	KULTIVACE <i>E. AEROGENES</i> V SYNTETICKÉM MÉDIU S AMINOKYSELINAMI.....	35
5	VÝSLEDKY A DISKUZE	36
5.1	VLIV VNĚJŠÍCH FAKTORŮ NA PRODUKCI HISTAMINU PŘI PH 7.....	36
5.2	VLIV VNĚJŠÍCH FAKTORŮ NA PRODUKCI HISTAMINU PŘI PH 6.....	39
5.3	VLIV PH NA PRODUKCI HISTAMINU	42
5.4	VLIV OBSAHU NaCl NA PRODUKCI HISTAMINU	44
5.5	VLIV PŘÍTOMNOSTI AMINOKYSELIN A NaCl NA RŮST <i>ENTEROBACTER AEROGENES</i> CCM 2531	47
	ZÁVĚR	51
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	52
	SEZNAM OBRÁZKŮ	58
	SEZNAM TABULEK	59
	SEZNAM PŘÍLOH	60

ÚVOD

Biogenní aminy jsou nízkomolekulární alifatické, aromatické nebo heterocyklické bazické sloučeniny odvozené od aminokyselin, které jsou přítomny v živých organizmech a běžně se podílejí na metabolických procesech. Nacházejí se také v potravinách, kde vznikají dekarboxylační činnostmi některých mikroorganismů (zejména hnilobných bakterií a bakterií mléčného kvašení). Pro zdravé osoby nepředstavují biogenní aminy v běžné dávce žádné riziko, avšak ve vysokých koncentracích se mohou projevovat jako látky psychoaktivní a vazoaktivní. Vymezení přesné hraniční hodnoty toxicity biogenních aminů je u různých jedinců velmi obtížné, neboť toxická dávka je silně závislá na výkonnosti detoxikačního mechanismu jedince.

Biogenní aminy mohou sloužit jako indikátory procesu fermentace potravin nebo jejich kažení. Mezi faktory, které ovlivňují tvorbu biogenních aminů u bakterií, patří teplota, pH prostředí, aktivita vody, aerobní/anaerobní prostředí, dostupnost zdrojů uhlíku (např. glukózy), přítomnost růstových faktorů, koncentrace NaCl, přítomnost solí a jiných přídatných látek aj.

Schopnost dekarboxylace aminokyselin byla zjištěna u mikroorganismů, které disponují příslušnými enzymy. Mezi takové mikroorganismy lze zařadit mnohé bakterie čeledi *Enterobacteriaceae*, zástupce rodů *Pseudomonas*, *Clostridium*, *Bacillus*, bakterie mléčného kvašení a mnohé další mikroorganismy

Cílem této diplomové práce bylo provést studii, ve které byly sledovány soubory vnějších faktorů, jež mohou ovlivnit produkci histaminu u enterobakterií, konkrétně u kmene *Enterobacter aerogenes* CCM 2531.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 BIOGENNÍ AMINY

Biogenní aminy jsou nízkomolekulární alifatické organické látky, které vznikají v potravinách nejčastěji dekarboxylací aminokyselin působením dekarboxylačních enzymů. Běžně se podílejí na metabolických procesech v živých tkáních a vykazují různé biologické účinky. Na lidský organizmus mají ve vyšších dávkách negativní účinky. [1]

V nízkých koncentracích jsou biogenní aminy přirozenou složkou řady potravin, některé vznikají při jejich zpracování (např. působením enzymů nebo vysokých teplot). Ve vyšších koncentracích se vyskytují ve fermentovaných potravinách, kde vznikají činností mikroorganismů. [2]

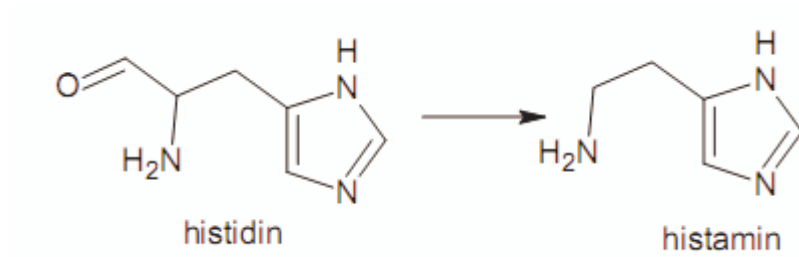
Někteří zástupci biogenních aminů mohou být tkáňovými hormony (histamin), stavebními látkami pro syntézu dalších hormonů (např. fenyletylamin), fytohormonů, alkaloidů a dalších sekundárních metabolitů rostlin. [2]

Mezi biogenní aminy se dnes řadí asi 40 sloučenin, z nichž nejznámější jsou histamin, kadaverin, tyramin, putrescin, agmatin, fenyletylamin, kadaverin, dopamin, tryptamin a jiné. [3]

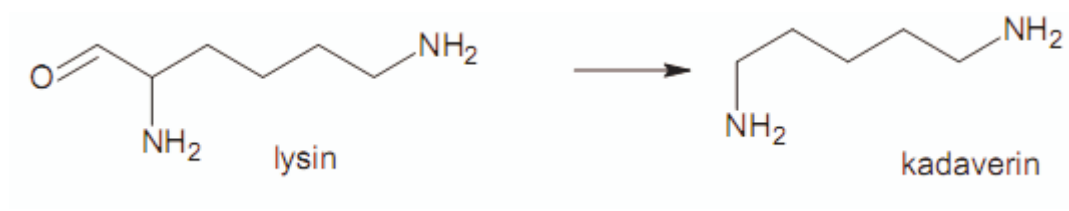
1.1 Vznik a rozdělení biogenních aminů

V poslední době značně zesílil výzkum podmínek vzniku biogenních aminů v potravinách a jejich účinků na lidské zdraví. Je zaměřen dvěma směry - na zdravotní nezávadnost potravin a na biogenní aminy jako ukazatele bakteriálního rozkladu bílkovin.

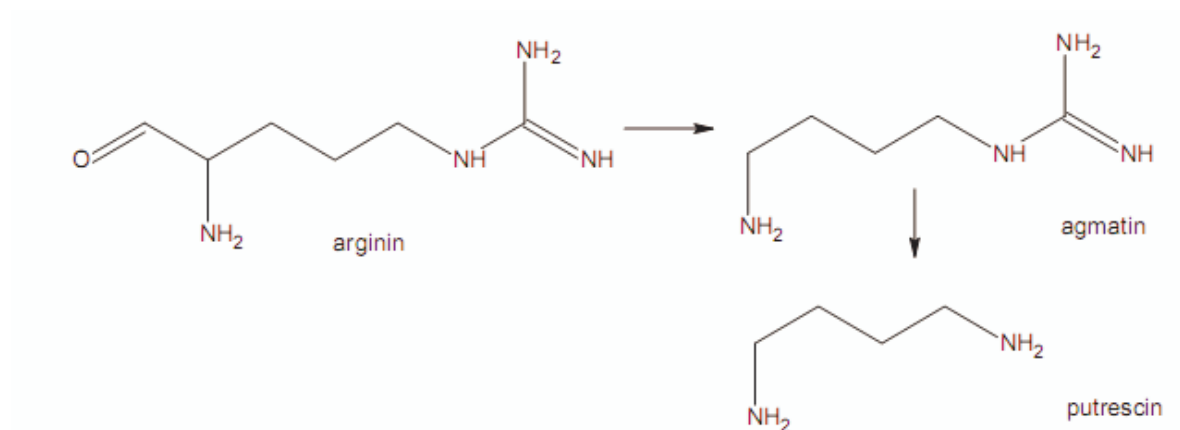
Biogenní aminy vznikají jako produkty běžné metabolické činnosti rostlin, zvířat a mikroorganismů. Vznikají z aminokyselin působením dekarboxyláz, z nichž mnohé obsahují jako kofaktor pyridoxalfosfát. V potravinách a potravinových surovinách vznikají nejčastěji dekarboxylací přirozených aminokyselin působením bakteriálních dekarboxylačních enzymů (obr. 1 až 5). Další možnou cestou vzniku je transaminace aldehydů a ketonů. [2]



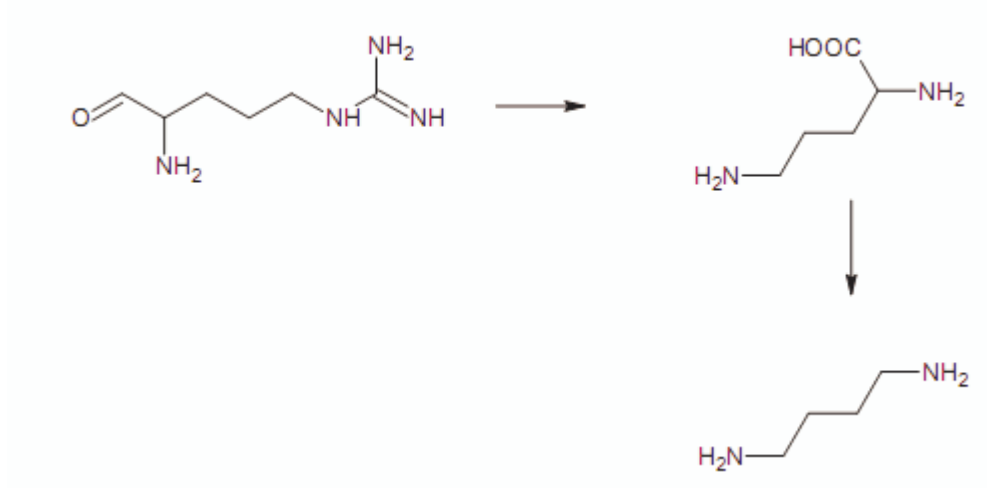
Obr.1. Vznik histaminu z histidinu působením enzymu histidindekarboxyláza [1]



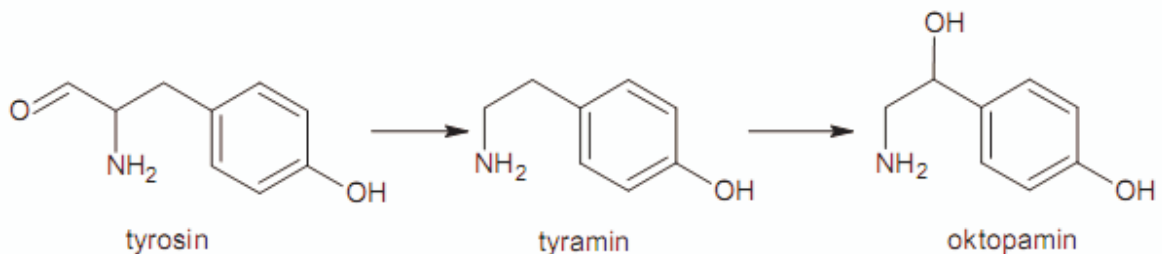
Obr.2. Vznik kadaverinu z lysinu působením enzymu lyzindekarboxyláza [1]



Obr.3. Vznik agmatinu a putrescinu z argininu působením enzymu arginindekarboxyláza [1]



Obr.4. Vznik putrescinu z ornitinu působením enzymu ornitindekarboxyláza [1]



Obr.5. Vznik tyraminu z tyrozinu působením enzymu tyrozindekarboxylázy a jeho následná oxidace na oktopamin [1]

Nejčastějšími producenty biogenních aminů jsou mikroorganismy z rodů *Citrobacter*, *Escherichia*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Enterococcus* a *Streptococcus*. [3]

Podle chemické struktury můžeme biogenní aminy rozdělit na [2]:

1. alifatické – putrescin, kadaverin,
2. aromatické – tyramin, fenyletylamin,
3. heterocyklické – histamin, tryptamin,
4. polyaminy – spermidin, spermin, agmatin.

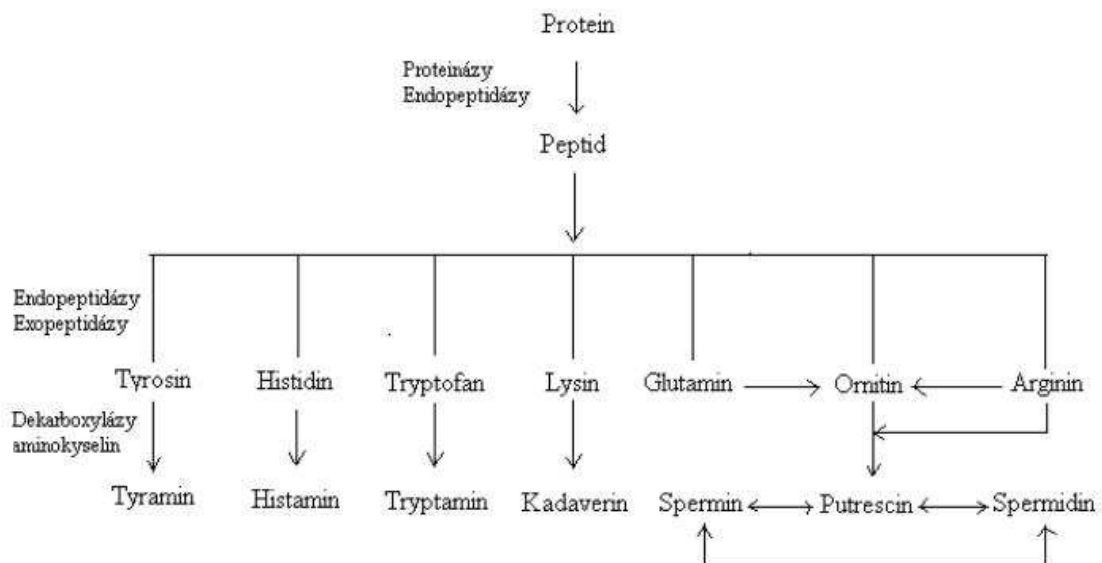
Pro vznik významnějšího množství biogenních aminů splněny následující podmínky:

- přítomnost a dostupnost volných aminokyselin v substrátu (potravině),

- přítomnost mikroorganismů s dekarboxylázovou aktivitou,
- vhodné podmínky pro růst a množení mikroorganismů,
- důležitým předpokladem je také proteolýza.

Tvorba biogenních aminů v potravinách závisí také na aktivitě mikrobiálních dekarboxylačních enzymů. Ta je ovlivněna mnoha faktory - teplotou, dobou skladování, aktivitou vody, pH, redoxním potenciálem nebo obsahem solí. [4]

Dekarboxylací argininu (arginindekarboxylázou) vzniká agmatin a dále putrescin (1,4-diaminobutan). Ten vzniká také přímo dekarboxylací ornitinu ornitindekarboxylázou (ornitin vzniká z argininu působením arginázy obr. 3, 4). Z putrescinu vzniká metylací S-adenosylmetioninem spermidin a dále spermin. Dekarboxylací fenylylalaninu fenylylalanindekarboxylázou vzniká 2-fenyletylamin, z tyrozinu činností tyrozindekarboxylázy tyramin a jeho oxidací oktopamin (obr. 5). Z lyzinu vzniká působením lyzindekarboxylázy kadaverin (obr. 2). Z histidinu vzniká jako produkt dekarboxylace histidindekarboxylázou histamin (obr. 1). Z DOPA (dihydroxyfenylalaninu) vzniká dopamin (působením dihydroxyfenylalanindekarboxylázy), oxidací dopaminu vzniká hormon dřene nadledvinek noradrenalin (norepinefrin) a jeho reakcí s S-adenosylmetioninem další hormon nadledvinek adrenalin. Dekarboxylací tryptofanu tryptofandekarboxylázou vzniká tryptamin, ze kterého se tvoří hormon serotonin, serotonin-N-acetyltransferázou vzniká ze serotoninu N-acetylserotonin a z něj působením hydroxyindol-O-metyltransferázy hormon melatonin. [1] Schématicky je tvorba biogenních aminů znázorněna na obr. 6.



Obr.6. Tvorba biogenních aminů [5]

1.2 Biologický význam a účinky biogenních aminů

Biogenní aminy jsou pro organismus nepostradatelné, slouží jako zdroj uhlíku, prekurzory hormonů nebo samy působí jako hormony, proteinů a alkaloidů. [2]

U živočichů jsou nezbytné pro řadu fyziologických funkcí, zvláště histamin, tyrozin, putrescin, spermidin a spermin. V opačném případě při nadměrném příjmu potravy jsou schopny způsobovat různé otravy. Mohou se pak projevovat jako látky [1]:

- psychoaktivní (jeví se jako přenašeči v centrálním nervovém systému)
- vazoaktivní (působí přímo nebo nepřímo na vaskulární systém), dále se dělí na vasokonstriktibilní (např. tyrozin) a vazodilatační (např. histamin)
 - vazokonstriktibilní (tyrozin)
 - vazodilatační aminy (histidin)

Tab.1. Biologický význam jednotlivých biogenních aminů [1]

Biogenní amin	Biologický význam
Histamin	Lokální tkáňový hormon, snižuje krevní tlak, sekreci žaludeční šťávy, účast při anafylaktickém šoku a alergických reakcích
Kadaverin	Stabilizace makromolekul (nukleových kyselin), subcelulárních struktur (ribozomů), stimulace, diferenciacie buněk, rostlinný hormon
Putrescin	Stabilizace makromolekul (nukleových kyselin), subcelulárních struktur (ribozomů), stimulace, diferenciacie buněk, rostlinný hormon
Agmatin	Stabilizace makromolekul (nukleových kyselin), subcelulárních struktur (ribozomů), stimulace, diferenciacie buněk, rostlinný hormon
Fenyletylamin	Prekurzor tyraminu
Tyramin	Prekurzor dopaminu, lokální tkáňový hormon, zvyšuje krevní tlak a kontrakce hladkého svalstva
Dopamin	Mediátor sympatických nervů
Tryptamin	Lokální tkáňový a rostlinný hormon, vliv na krevní tlak a peristaltiku střev, psychické funkce

1.2.1 Účinky biogenních aminů

Biogenní aminy jsou přírodní antinutriční látky a jsou důležité z hlediska hygieny potravin. Jsou zdrojem dusíku, prekurzorů hormonů, alkaloidů, nukleových kyselin a proteinů. Ovlivňují mnohé procesy v organismu, jako jsou [6]:

- regulace tělesné teploty,
- příjem živin,
- zvýšení nebo snížení krevního tlaku.

Byly označeny jako jedna z příčin mnoha potravinových otrav. Jsou poměrně stabilní, odolávají teplu, přežívají v kyselých a zásaditých podmínkách. V buňkách plní různé

specifické funkce jako je například kontrola a inhibice translace mRNA do bílkovin a regulace translace. Jsou nepostradatelné pro organismus, ale ve vysokých koncentracích mohou způsobit otravu. Škodlivé účinky lze očekávat pouze tehdy, pokud aminy mají přístup do krevního oběhu. [7]

Nejčastějšími příznaky konzumace vysokých dávek biogenních aminů jsou zvracení, návaly horka, pocení, průjem, křeče, dýchací potíže, bušení srdce, hypotenze nebo hypertenze a migrény. [8] V praxi se nestanovují všechny biogenní aminy, ale většinou pouze histamin, který má předepsané limitní hodnoty v potravinách, konkrétně v rybách a výrobcích z ryb. Obecně se uvádí, že hraniční hodnoty histaminu, při kterých se začínají projevovat příznaky otravy, jsou nad 100 mg v 1 kg (nebo l) potraviny. [4]

Existuje ovšem individuální citlivost vůči biogenním aminům, roli hrají i ostatní faktory, jakými jsou množství spotřebované potraviny, přítomnost jiných toxických látek apod. Proto je velmi obtížné stanovit hranici toxicity biogenních aminů. [4]

1.2.2 Histamin

Mezi nejzávažnější účinky histaminu patří anafylaktický šok, jehož příznaky jsou zrychlené dýchání, zrychlený tep, výrazná bledost, dušnost, dále může histamin způsobit snížení tlaku, bolesti hlavy, které mohou přecházet v silné migrény. Dalšími toxickými projevy jsou kontrakce hladké svaloviny střev jako břišní křeče, zvracení, průjemy. S otravou histaminem může souviset i zarudnutí očí, kůže, potíže s dechem a třes. Největší otravy z histaminu zaznamenávají země s vyšší konzumací ryb. Otrava se projevuje v rozmezí několika minut až tří hodin po požití kontaminované potraviny. Projevuje se překrvením obličeje a šíje, silným bušením srdce.

U zdravého člověka existuje regulační mechanismus, který je schopný pomocí enzymů zvládnout toxické účinky histaminu. Větší množství histaminu, a nebo jiných biogenních aminů (putrescinu, kadaverinu, spermidinu, sperminu, agmatinu aj.) může tento systém přetížit. Toxický účinek zesiluje i požití alkoholických nápojů. [9], [10], [11], [12].

Scombroid syndrom

Scombroid syndrom je souhrn příznaků vyvolaný působením biogenních aminů, zejména histaminu, přijatých v potravě. Potraviny nejčastěji spojované se scrombrotoxicitou jsou

ryby čeledi *Scombridae* a *Scomberesocidae*, zejména tuňák, makrela, treska, sardinky nebo herinek. Hladina histaminu schopná vyvolat scombroid syndrom se pohybuje mezi 20–100 mg histaminu na 100g rybího masa. Obvyklé množství histaminu obsažené v rybím mase je však mnohem menší, ve 100g se nachází méně než 0,1mg histaminu. Vedle koncentrace histaminu se na vzniku symptomů podílí množství spotřebované ryby a konkrétní použitá část ryby – nejrizikovější je střední část trupu. Dalšími potravinami, které mohou obsahovat vyšší množství histaminu jsou zejména špenát, lilek, banány, červená vína a sýry. [13], [14].

1.2.3 Tyramin

Tyramin je součástí alkaloidů a důležitých neuroaminů. Z toxikologického hlediska je tyramin spolu s histaminem jedním z biogenních aminů s nezávažnějšími účinky. Mezi příznaky vyvolané otravou tyraminem patří tvorba otoků, silné bolesti hlavy spolu se zvracením, zvýšená teplota a prudké zvýšení krevního tlaku, které může být příčinou krvácení do mozku a selhání srdce. [10], [11], [12]

Jeho toxický efekt závisí na přijatém množství, přítomnosti jiných biogenních aminů a na celkovém fyziologickém stavu jedince. [15]

1.2.4 Putrescin a kadaverin

Putrescin a kadaverin jsou toxické přírodně se vyskytující aminy způsobující nepříjemný zápach rozkládajících se živočišných těl (tzv. mrtvolné jedy).[16], [17]

Při vaření vznikají z putrescinu a kadaverinu tzv. sekundární aminy piperidin a pyrolidin, které jsou limitním faktorem pro tvorbu nitrosaminů, jež jsou silně karcinogenní. [18]

1.2.5 Spermidin

Mnohé výzkumy prokázaly, že zvýšená potřeba sperminu, spermidinu a putrescinu je nezbytná pro rychlý růst tkání. Z tohoto důvodu byl zkoumán vliv těchto biogenních aminů na průběh nádorových onemocnění, přičemž právě inhibice jejich biosyntézy představuje jednu z možností při léčbě rakoviny. Spermin, spermidin a putrescin se rovněž vyznačují antioxidantními účinky, které souvisejí s počtem aminových skupin v molekule, jejichž efekt se může projevit např. inhibicí oxidace polynenasycených mastných kyselin. [18]

1.3 Výskyt biogenních aminů

Zjišťování obsahu biogenních aminů nám slouží k identifikaci kvality a jakosti potravin. Odstranění již vzniklých biogenních aminů v potravine je velmi obtížné. Nejvhodnějším postupem je dodržování takových technologických postupů a hygienických podmínek výroby, které brání jejich vzniku. Nejdůležitějším opatřením pro zabránění tvorby aminů je používání vhodné teploty skladování. Při 10 °C je produkce aminů velmi zpomalena a při 5 °C téměř ustává. S teplotou souvisí také doba skladování (k nárůstu obsahu biogenních aminů dochází nejčastěji během doby skladování). [3]

Biogenní aminy se vyskytují prakticky ve všech potravinách jako běžné produkty metabolismu mikroorganismů. Podle způsobu tvorby biogenních aminů lze potraviny rozdělit na fermentované a nefermentované. [19]

1.3.1 Nefermentované potraviny

V nefermentovaných potravinách (maso, mořské ryby, zelenina, ovoce) vznikají biogenní aminy hlavně působením kontaminující mikroflóry během skladování, což může být ukazatelem jakosti vstupní suroviny a úrovně hygieny během výrobního procesu a skladování. [20]

1.3.1.1 *Maso, masné výrobky a ryby*

V mase, masných výrobcích a rybách jsou nejvíce obsaženy biogenní aminy histamin, tyramin, putrescin a kadaverin. U čerstvých ryb je jejich koncentrace nízká, avšak skladováním, skladovací teplotou a průběhem zrání se jejich obsah zvyšuje. U tuňáka a jiných makrelovitých ryb bylo zaznamenáno zvýšené množství histaminu, které zde vzniká přeměnou histidinu. Histamin a tyramin představují největší toxikologické riziko. [19]

Psychrofilní halofilní bakterie obsažené v mořských rybách jsou schopny produkovat vysoké množství histaminu již při nízkých teplotách (2,5 °C). Nízké skladovací teploty jsou tudíž nedostačující k potlačení vzniku biogenních aminů, především histaminu. [7], [19]

Tyramin, kadaverin, putrescin, spermidin a spermin obsažené v mase a masných výrobcích se používají jako indikátory čerstvosti masa. Jejich obsah se zvyšuje se skladovací teplotou. Čerstvé maso většinou obsahuje maximálně do 7 mg/kg kadaverinu a putrescinu, zkažené maso 60 mg/kg a více. [1]

1.3.1.2 Ovoce a zelenina

Čerstvé ovoce v neporušeném stavu obsahuje nízké koncentrace biogenních aminů. Jejich hladiny se mohou zvýšit nedodržením skladovacích podmínek a špatnou manipulací během mechanického zpracování, při kterém může dojít ke kontaminaci především dekarboxylujícími bakteriemi čeledi *Enterobacteriaceae*. [1]

Hlavním biogenním aminem v ovoci i zelenině je tyramin. Nachází se např. v banánech (65 mg/kg), v červeném víně (25 mg/kg), malinové šťávě (66 mg/kg) nebo v jablkách (11 mg/kg). Ostatní biogenní aminy se vyskytují v ovoci a zelenině v menším množství. Histamin je obsažen např. v malinách, banánech, červeném vínu, rajčatech a špenátu. Fenyletylamin se nachází ve vínu a banánech, putrescin v pomerančích a pomerančové šťávě, mandarinkách, grapefruitových džusech, rajčatech a mrkvi. Spermidin byl zjištěn v hruškách, listové zelenině, květáku, brokolici a mrkvi, kadaverin ve vodních melounech, dopamin, a tryptamin v květáku a rajčatech a dopamin, serotonin a noradrenalin v banánech. [1], [21], [22]

1.3.1.3 Mléko a mléčné výrobky

V mléku a mléčných výrobcích závisí tvorba biogenních aminů na obsahu aminokyselin a peptidů, na přítomnosti bakterií schopných dekarboxylace, na pH, koncentraci soli, aktivitě vody, technologii výroby, době zrání a skladování, množství mikroorganismů a přítomnosti kofaktorů (např. pyridoxalfosfátu). [1] Koncentrace biogenních aminů v čerstvém mléce je menší než 1 mg/kg. Jedná se především o histamin a tyramin. Obsah histaminu v mléce je 0,5 až 0,8 mg/kg, v sušeném mléce 131 mg/kg a obsah tyraminu 42 mg/kg. Obsah biogenních aminů v sýrech může být i vyšší než 1 g/kg. [23]

1.3.2 Fermentované potraviny

Fermentované potraviny obsahují více mikroorganismů, které mohou tvořit biogenní aminy, než potraviny nefermentované. Z toxikologického hlediska se jedná o nejdůležitější skupinu potravin s rizikem vysokého obsahu biogenních aminů, které zde vznikají kromě mikrobiální dekarboxylace aminokyselin také transaminací aldehydů a ketonů. Mezi hlavní biogenní aminy objevující se ve fermentovaných potravinách patří zejména tyramin, 2-fenyletylamin, tryptamin, kadaverin, putrescin a histamin. Jejich množství ale není konstantní, rozdíly jsou udávány i mezi stejnými typy výrobků. Odlišné obsahy biogenních aminů závisí na mnoha

faktorech jako je kvalitativní a kvantitativní složením mikrobiální flóry, chemicko-fyzikálních faktorech, hygienických postupech při výrobě a na přítomnosti prekurzorů biogenních aminů (zejména dostupnosti aminokyselin). [1], [24], [25]

Hlavními biogenními aminy obsaženými v sýrech jsou aromatické aminy tyramin a histamin, diaminy kadaverin a putrescin a další biogenní aminy, které se v sýrech vyskytují v nízkých koncentracích, jako je β -fenyletylamin, tryptamin, oktopamin, dopamin a serotonin. Vyšší množství biogenních aminů se tvoří v sýrech holandského typu a typu čedar než v samotném čerstvém sýru. Bakterie tvořící biogenní aminy jsou spíše přítomny v mléce před zpracováním (jako tzv. termorezistentní non-startérové bakterie mléčného kvašení) než jako kontaminanty v průběhu zpracování. [1], [26], [27]

1.3.2.1 Fermentované masné výrobky

Při fermentaci masa vznikají biogenní aminy jak při chladírenských, tak i při vyšších teplotách (25 °C). Nejběžnějšími biogenními aminy ve fermentovaných masných výrobcích jsou tyramin, putrescin, histamin, kadaverin a 2-fenyletylamin. Jejich tvorbu způsobuje řada faktorů jako je kvalita výchozí suroviny, výběr startovací kultury, dostupnost substrátu, aktivita vody, pH a další. [1], [25], [28].

1.3.2.2 Fermentovaná zelenina

Fermentovaná zelenina obsahuje především kadaverin, putrescin, histamin, spermidin a tyramin.

U kysaného zelí je obsah biogenních aminů jedním z jakostních ukazatelů v technologii jeho výroby. Pro spontánně kysané zelí je charakteristický vysoký obsah biogenních aminů, nejvíce se jich hromadí v solném nálevu. *Leuconostoc mesenteroides* produkuje putrescin, laktobacily putrescin a tyramin, pediokoky histamin. Obsah tyraminu během skladování roste. Obsah všech biogenních aminů lze snížit přidávkem vhodných startovacích kultur při nakládání zelí. [7], [17].

1.3.2.3 Nápoje

Fermentované alkoholické nápoje mohou obsahovat ve velkém množství agmatin, kadaverin, etanolamin, histamin, putrescin a tyramin. [29]

Biogenní aminy obsažené v pivu pocházejí především z použitých surovin, z fermentační fáze výroby piva a mikrobiální kontaminace během výrobního procesu nebo během skladování. [30]

Sladovnický ječmen je zdrojem agmatinu, putrescinu, spermidinu a sperminu a to i za sterilních podmínek. Nejvíce biogenních aminů vzniká během hlavního kvašení. Za indikátory kontaminace především mléčnými bakteriemi, se považují zvýšené obsahy tyraminu a kadaverinu. Ke zvýšení obsahu biogenních aminů, zejména tyraminu, může dojít i během skladování piva v obalech, pokud nebylo dostatečně pasterováno. [31]

Obsah biogenních aminů je u červených a bílých vín podobný, výraznější kvantitativní rozdíly nebyly zaznamenány. Nejhojnějším aminem ve víně je putrescin, tyramin a histamin. [32]

Na hromadění putrescinu mají podíl některé kmeny *Oenococcus oeni*. *Oenococcus oeni* je nejčastějším bakteriálním druhem používaným jako startovací kultura k vyvolání jablečno-mléčného kvašení ve víně. Putrescin vzniká dekarboxylací volného ornitinu. Hladiny ornitinu jsou ve víně obvykle nízké. Vysoké koncentrace putrescinu vyplývají ze schopnosti *Oenococcus oeni* vyrobit ornitin degradací argininu. [33]

Koncentrace biogenních aminů je také závislá na teplotě a délce kvašení. [6]

Množství biogenních aminů v českých pivech je znázorněno v tabulce. [34]

Tab.2. Množství biogenních aminů v pivu [34]

Biogenní amin	Množství biogenních aminů v pivu v mg/kg
Histamin	0-22
Kadaverin	0-40
Putrescin	2-15
Spermidin	0-7
Spermin	0-4
Agmatin	1-41
Fenyletylamin	0-8
Tyramin	1-68
Tryptamin	0-5

1.4 Mikroorganismy produkující biogenní aminy

Biogenní aminy vznikají dekarboxylací aminokyselin pomocí enzymů produkovaných bakteriemi. Patří mezi ně např. bakteriální rody *Citrobacter*, *Escherichia*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Micrococcus*, *Propionibacterium*, *Salmonella*, *Shigella*, *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Streptococcus* a některé další hnilobné bakterie, bakterie mléčného kvašení a plísně. Mezi nejdůležitější druhy mikroorganismů s výraznou produkcí dekarboxyláz patří také *Morganella morganii*, *Klebsiella pneumoniae* a *Hafnia alvei*. [4]

Nutno však také zmínit fakt, že některé mikroorganismy v potravinách naopak biogenní aminy odbourávají (*Pseudomonas*, *Serratia*, *Sarcina*). [3]

Schopnost jednotlivých bakterií dekarboxylovat aminokyseliny je velmi různá. Dokonce i různé druhy jednoho rodu se mohou lišit v produkci biogenních aminů až o tři řády. Je proto téměř nemožné najít korelaci mezi obsahy biogenních aminů a počty gramnegativních bakterií. [2]

Tab.3. Významné mikroorganismy produkující biogenní aminy [1]

Potravina	Mikroorganismy	Produkované aminy
Ryby	<i>Morganella morganii</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Hafnia alvei</i> , <i>Proteus vulgaris</i> , <i>Clostridium perfringens</i> , <i>Enterobacter aerogenes</i> , <i>Bacillus sp.</i> , <i>Staphylococcus xylosus</i>	Histamin, kadaverin, tyramin, putrescin, agmatin, spermidin, spermin
Sýry	<i>Lactobacillus sp.</i> , <i>Enterococcus faecium</i> , <i>Streptococcus mitis</i> , <i>Bacillus macerans</i> , <i>Propionibacterium sp.</i>	Histamin, kadaverin, tyramin, putrescin, tryptamin
Maso a masné výrobky	<i>Pediococcus sp.</i> , <i>Lactobacillus sp.</i> , <i>Pseudomonas sp.</i> , <i>Streptococcus sp.</i> , <i>Micrococcus sp.</i> , <i>Enterobacteriaceae</i>	Histamin, kadaverin, tyramin, putrescin, fenyletylamin, tryptamin
Fermentovaná zelenina	<i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides</i> , <i>Pediococcus sp.</i>	Histamin, kadaverin, tyramin, putrescin, fenyletylamin, tryptamin

Mnoho bakterií čeledi *Enterobacteriaceae* produkuje vysoké množství kadaverinu, putrescinu a histaminu, a to zvláště *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter aerogenes* a *Klebsiella oxytoca* a stejně tak i *Escherichia coli* a *Morganella morganii*. Vysoký obsah enterobakterií, včetně koliformních bakterií, byl zaznamenán v časném stádiu zrání sýrů, ale jejich počet výrazně klesá v průběhu zrání a skladování. [28]

1.5 Faktory ovlivňující tvorbu biogenních aminů

Tvorba biogenních aminů je ovlivněna řadou faktorů. Mezi nejdůležitější, které ovlivňují aktivitu mikrobiálních dekarboxylačních enzymů, patří přítomnost volných aminokyselin (substrátu biogenních aminů), pH, aktivita vody, přítomnost solí a kyslíku, doba skladování, teplota, dodržování hygieny procesu získávání surovin a jejich zpracování ve výrobě. Podstatný vliv na vznik biogenních aminů hraje výběr vhodné startovací kultury při výrobě fermentovaných výrobků. [1]

1.5.1 Koncentrace substrátu a pH

Optimální koncentrace substrátu (např. aminokyselin) pro produkci biogenních aminů je 0,5-2%. Vyšší koncentrace mohou dekarboxylační aktivitu potlačovat. Jako optimální pH pro dekarboxylaci aminokyselin se uvádí kyselé prostředí, v rozmezí pH 2,5-6,5. Růst bakterií v kyselém prostředí stimuluje tvorbu dekarboxyláz. Prudkým snížením pH dochází k omezení růstu amino-pozitivních mikroorganismů, zejména z čeledi *Enterobacteriaceae*. Naopak zvýšením pH prostředí dochází k rychlému navýšení tvorby biogenních aminů. [18]

1.5.2 Teplota

Teplota je jedním z nejdůležitějších faktorů, který brání vzniku biogenních aminů. Významně ovlivňuje enzymatickou aktivitu mikroorganismů, a tím i vznik biogenních aminů. Bylo zjištěno, že při skladovací teplotě 10 °C se biogenní aminy vyskytovaly v potravině ve zhruba 20x větším množství než při teplotě skladování 2 °C. Biogenní aminy jsou termostabilní, tudíž na ně má vaření malý vliv. [28]

1.5.3 Přítomnost solí a kyslíku

Soli mají na tvorbu biogenních aminů většinou inhibiční účinek. Záleží však na použité solické směsi. Bylo zjištěno, že přídavek dusitanové solické směsi zpomalí růst mikroorganismů více než stejné množství obyčejné soli. [15]

Nízká koncentrace chloridu sodného zvyšuje tvorbu biogenních aminů, ovšem při koncentraci 3-6 % může být produkce biogenních aminů značně redukována. Tento efekt je zesílen snížením pH. [12], [35]

1.5.4 Ostatní faktoty

Nejednoznačným faktorem s vlivem na produkci biogenních aminů je přítomnost kyslíku, protože biogenní aminy mohou být tvořeny mikroorganismy aerobními, anaerobními i fakultativně anaerobními. [24]

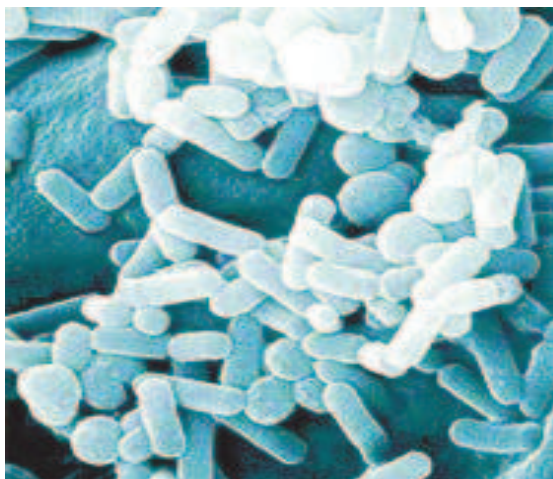
Také vysoké hodnoty vodní aktivity podporují aktivitu dekarboxyláz a tím i produkci biogenních aminů. [36]

2 ČELEDĚ *ENTEROBACTERIACAE*

Čeď *Enterobacteriaceae* je považována za jednu z nejdůležitějších čeledí mezi gramnegativními tyčinkami. Enterobakterie jsou celosvětově rozšířené, vyskytují se často jako součást střevní mikroflóry lidí i zvířat, kde mohou napadat intestinální trakt a způsobovat průjmová onemocnění. Dále se nacházejí v půdě, vodě, ovoci, zelenině, zrnech, kvetoucích rostlinách a stromech, cizopasných červech a hmyzu. Existuje značná rozmanitost v jejich ekologii, rozmezí hostitele, či patogenitě. V nedávné době došlo v souvislosti s novými metodami identifikace bakterií v čeledi *Enterobacteriaceae* k mnoha taxonomickým změnám, byly popsány nové rody a řada nových druhů. Do čeledi *Enterobacteriaceae* je v současnosti řazeno celkem 48 rodů, mezi nověji pojmenované rody této čeledi můžeme zařadit tyto rody: *Arsenophonus*, *Biostraticola*, *Brenneria*, *Budvicia*, *Buchnera*, *Buttiauxella*, *Calymmatobacterium*, *Cedecea*, *Cronobacter*, *Dickeya*, *Ewingella*, *Kluyvera*, *Leclercia*, *Leminorella*, *Levinea*, *Mangrovibacter*, *Moellerella*, *Obeseumbacterium*, *Pantoea*, *Pectobacterium*, *Photorhabdus*, *Pragia*, *Rahnella*, *Raoultella*, *Saccharobacter*, *Samsonia*, *Shimwellia*, *Sodalis*, *Tatumella*, *Thorsellia*, *Trabusiella*, *Wigglesworthia*, *Xenorhabdus*, *Yokenella*. Z klinického hlediska patří mezi nejdůležitější zástupce čeledi *Enterobacteriaceae* rody *Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Proteus*, *Cronobacter* a *Yersinia*. [37], [38].

2.1 Morfologie

Bakterie této čeledi jsou gramnegativní rovné tyčinky, 0,5-2 μ m široké a 2-3 μ m dlouhé. Jsou nepohyblivé nebo pohyblivé pomocí peritrichálních bičků, některé mají polysacharidová pouzdra. Cysty ani endospory netvoří. [39], [40].



Obr.7. *Enterobacter aerogenes* [41],

2.2 Kultivace

Enterobakterie jsou fakultativně anaerobní mikroorganismy, které nejsou příliš náročné na živiny a dobře rostou na většině běžných mikrobiologických půd. Většina druhů roste dobře při 37 °C, avšak některé druhy rostou lépe při nižší teplotě a jsou při ní více metabolicky aktivní. Pro diagnostické účely se využívají speciální selektivní půdy, odlišující enterobakterie na základě jejich biochemických vlastností. Mezi tyto půdy patří například Endův nebo MacConkeyho agar (štěpení laktózy), nebo agar s xylózou-lyzinem a deoxycholátem (XLD agar), Simmons-citrát agar (využívání citrátu jako jediného zdroje uhlíku).[42]

Na pevných půdách bývají kolonie enterobakterií poměrně velké (2-3 mm), tvarově rozličné, od hladkých kruhovitých až po vrásčité s roztřepenými konci. Některé rody bývají specifické svým vzhledem kolonií. Například rod *Klebsiella* tvoří kolonie o průměru 3-4 mm, které jsou okrouhlé, hladké, většinou mukózní. *Proteus* je charakteristický svým plazivým růstem. Některé druhy tvoří barevné pigmenty, například *Serratia* nebo *Cronobacter (Enterobacter) sakazakii*. [43], [44]

2.3 Biochemické vlastnosti

Mikroorganismy z čeledi *Enterobacteriaceae* fermentují glukózu a jiné cukry nebo cukerné alkoholy s tvorbou kyselin (hlavně kyseliny octové a mléčné) a někdy i plynu (CO_2 a H_2), rychle redukuje dusičnany na dusitany, jsou kataláza pozitivní a většinou jsou oxidáza negativní, výjimkou je rod *Plesiomonas*. [39], [40]

Co se týká konkrétních bakteriálních druhů této čeledi, tak ty se ve svých biochemických vlastnostech značně odlišují. Obecně platí, že komenzálové a saprofyté jsou poměrně aktivní, zatímco parazitické druhy jsou aktivní mnohem méně. [40]

2.4 Klinický význam

Bakterie čeledi *Enterobacteriaceae* bývají spojovány především se střevním traktem obratovců. Ve střevě mohou působit jako komenzálové, saprofyté nebo parazité. Parazitické enterobakterie vyvolávají v intestinálním traktu střevní infekce a průjmová onemocnění, která mohou vést i k sepsi. Většina ostatních enterobakterií jsou obvykle oportunní patogeny způsobující infekce jen u pacientů, kteří jsou imunosuprimovaní, katetrizovaní nebo oslabení. Jsou to tedy i významní původci nozokomiálních infekcí. [45]

Pokud se tyto střevní bakterie dostanou mimo intestinální trakt, pak jsou nejčastějšími původci močových infekcí, časté jsou i infekce respiračního traktu, dále mohou způsobovat infekce ran, bakteriémie, septikémie, u novorozenců pak velmi závažné meningitidy. [46]

2.5 Produkce biogenních aminů enterobakteriemi

Mikroorganismy z čeledi *Enterobacteriaceae* mají vysokou dekarboxylázovou aktivitu a nejčastěji bývají spojovány zejména s tvorbou kadaverinu a putrescinu.

Studie provedené *in vitro* autory Bover-Cid a kol. [47] ukázaly, že *Citrobacter freundii* a *Proteus vulgaris* patří ke slabším dekarboxylujícím druhům, zatímco *Enterobacter cloacae* a rod *Serratia* produkují kadaverinu a putrescinu více. Na druhou stranu Durlu-Ozkaya a kol. [48] zjistili, že kmeny *Citrobacter freundii* a *Enterobacter aerogenes* mohou *in vitro* tvořit vysoké hladiny kadaverinu a putrescinu. Zástupci z čeledi *Enterobacteriaceae* mohou také produkovat značné množství histaminu a to zejména *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella oxytoca* a *Morganella morganii*.

Tyto mikroorganismy jsou obvykle v konečných produktech obsaženy v malých koncentracích, ale nesprávné skladování syrových materiálů nebo nekontrolovatelná fermentace mohou vést k jejich pomnožení a rychlému uvolnění dekarboxyláz. [28]

2.6 Základní charakteristika bakterie rodu *Enterobacter*

Bakterie rodu *Enterobacter* jsou gramnegativní, fakultativně anaerobní pohyblivé tyčinky, zkvašují sacharidy za vzniku CO₂ a H₂. Optimální teplota růstu je 30 až 37 °C. [49] Zástupci rodu se vyskytují ve střevním traktu lidí i zvířat, v rostlinách, sladké a odpadní vodě, sekundárně i v mléku. [50] Jsou zodpovědné za syntézu putrescinu a kadaverinu. [8]

II. PRAKTICKÁ ČÁST

3 CÍLE PRÁCE

Cílem diplomové práce bylo provedení studie, ve které byly sledovány soubory vnějších faktorů, jež mohou ovlivnit produkci histaminu u enterobakterií, konkrétně u kmene *Enterobacter aerogenes* CCM 2531.

Pro dosažení cílů bylo třeba:

- zpracovat rešerši týkající se problematiky biogenních aminů, jejich vzniku a účinků na lidský organizmus. Dále bylo třeba charakterizovat bakterie čeledi *Enterobacteriaceae* a faktory ovlivňující produkci biogenních aminů.

V rámci praktické části diplomové práce bylo nutné sledovat působení následujících faktorů na produkci biogenních aminů:

- vliv aerobního a anaerobního prostředí,
- vliv přídavku aminokyselin o různé koncentraci,
- vliv teploty,
- vliv pH,
- vliv přídavku NaCl,
- vliv přítomnosti kofaktoru (pyridoxal-5-fosfátu).

Na základě teoretické části a výsledků praktické části byly zformulovány závěry produkce histaminu kmenem *Enterobacter aerogenes* CCM 2531 během kultivace za sledovaných podmínek.

4 MATERIÁL A METODY

4.1 Přístroje

Autokláv 135 S, H+P VARIOKLAV /H+P Labortechnik AG Německo/

Digitální váhy KB 800-2 /Kern & Sohn GmbH, Německo/

Analyzátor aminokyselin AAA 400 /Ingos Praha, ČR/

Chladnička Elektrolux

pH metr

Automatické mikropipety

Běžné laboratorní sklo a další laboratorní materiál

4.2 Příprava půd a kultivace mikroorganismů

Masopeptonový bujon (MPB)

Beef-extract (masový extrakt)	1g
Pepton	1g
NaCl	0,5g
destilovaná voda	100ml

Příprava půdy

Bylo naváženo příslušné množství jednotlivých složek MPB a vše bylo rozpuštěno ve 100 ml destilované vody. Sterilizace proběhla v autoklávu při 121 °C po dobu 15 minut.

Pro sledování dalších faktorů bylo vždy do půdy přidáno příslušné množství aminokyseliny histidinu (sledované koncentrace 0,1; 0,2; 0,3; 0,5; 1,0 a 2,0 % w/v) a NaCl (0,0; 0,5; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0 % w/v).

Při sledování vnějších vlivů na produkci biogenních aminů u *Enterobacter aerogenes* CCM 2531 probíhala kultivace v masopeptonovém bujónu s přídatkem histidinu o příslušné koncentraci (0 - 2,0 % w/v), NaCl (0-5% w/v) a popř. i s přídatkem pyridoxalfosfátu

(0,005 %w/v) při 30 ± 1 °C nebo 37 ± 1 °C v rozmezí 1 až 3 dnů. MPB byl upraven na výsledné pH 6, respektive na pH 7.

Pro tyto studie byl vybrán *Enterobacter aerogenes* CCM 2531, který byl získán z České sbírky mikroorganismů v Brně (CCM).

Pro účel sledování dekarboxylázové aktivity uvedeného kmene byla vždy připravena suspenze buněk, která byla v MPB s přidavkem aminokyseliny histidinu o koncentraci 0,2 % (w/v) kultivována přes noc, aby došlo k pomnožení buněk a zároveň k zahájení dekarboxylázové aktivity bakterií.

Příslušný bujón (s různým obsahem histidinu, NaCl, popř. přidavkem pyridoxalfosfátu a o příslušném pH) o objemu 5 ml byl vždy zaočkován 25 µl suspenze bakterií. Vliv aerobního/anaerobního prostředí na produkci biogenních aminů byl sledován tak, že polovina zkumavek byla kultivována aerobně a druhá anaerobně. Anaerobního prostředí bylo dosaženo zakápnutím kultivačního média sterilním parafinovým olejem. Odběr vzorků pro analýzy probíhal v časech 24, 48 a 72 hod a to tak, že vždy byly náhodně odebrány od každého kmene a každé úrovně faktoru 2 zkumavky. Celý experiment byl opakován třikrát.

4.3 Analýza produkce biogenních aminů

Produkce histaminu byla zjišťována pomocí iontově-výměnné chromatografie. Chemikálie pro přípravu pufrů a standardů pro iontově výměnnou chromatografii byly dodány firmou Ingos, Praha, Česká Republika. Ninhydrin, metylcellosolvu (4 mol/l), acetátový pufr (pH 5,5) a hydrindantin byly zakoupeny také od Ingos, Praha jako sestava ninhydrinových reagens (pro postkolonovou derivatizaci) a standardů pro analýzu. Biogenní aminy (tyramin, histamin, putrescin, kadaverin, spermidin a spermin) pro přípravu standardu byly získány ze Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, USA.

Kultivační médium bylo po inkubaci centrifugováno (10000×30 minut při 4 °C) v mikrozkumavkách. Směs byla přefiltrována přes filtr o porozitě 0,45 µm. Testované vzorky byly dle potřeby ředěny dávkovacím pufrem. 100 µl připravené směsi bylo automaticky nastříknuto do analyzátoru aminokyselin AAA400 (Ingos), jehož součástí byla kolona 55×3,7 mm naplněná iontoměničem Ostion LG ANG (Ingos). Detekce probíhala po postkolonové ninhydrinové derivatizaci spektrofotometrickým detektorem při vlnové délce 570 nm.

Biogenní aminy byly eluovány podle následujícího programu: pufr A po dobu 0 – 60 min, pufr B po dobu 60 – 86 min. Poté byla kolona obnovena 0,2 mol/l NaOH po dobu 15 minut a stabilizována po dalších 19 minut pufr A. Teplota kolony byla nastavena na 65 °C. Průtoková rychlost pufru byla 0,3 ml/min, ninhydrinového činidla 0,2 ml/min. Eluce probíhala při teplotě 65 °C (0 – 41 min a 111 – 120 min) a 45 °C (41 – 111 min).

Každá směs byla analyzována minimálně duplicitně.

4.3.1 Roztoky pro iontově-výměnnou chromatografií

• Pufr A (citronan sodný)

monohydrát kyseliny citronové (Lach-Ner).....	1,50 g
dihydrát citronanu sodného (Lach-Ner).....	21,00 g
NaCl (Lach-Ner).....	5,00 g
KBr (Lach-Ner).....	41,65 g
Izopropanol (Lach-Ner).....	250,00 ml

Jednotlivé komponenty byly smíchány a doplněny do 1 litru deionizovanou vodou.

• Pufr B (citronan litný)

monohydrát kyseliny citronové (Lach-Ner).....	9,56 g
citronan litný (Lach-Ner).....	2,08 g
LiCl (Lach-Ner).....	6,68 g
azid sodný (Lach-Ner).....	0,10 g
thiodiglykol (Lach-Ner).....	2,50 ml

Jednotlivé komponenty byly smíchány a doplněny do 1 litru deionizovanou vodou.

• Dávkovací pufr I

monohydrát kyseliny citronové (Lach-Ner).....	14,00 g
NaCl (Lach-Ner).....	11,50 g
azid sodný (Lach-Ner).....	0,10 g
thiodiglykol (Lach-Ner).....	5,00 ml

Jednotlivé komponenty byly smíchány a doplněny do 1 litru deionizovanou vodou.

• **Ninhydrinové činidlo** (ZMBCchemik, Václav Havlíček, Vrané nad Vltavou)

ninhydrin	20 g
hydrindantin.....	1 g
methylcellosolve (4mol/l).....	750 ml
acetátový pufr (pH 5,5).....	250 ml

Jednotlivé komponenty byly smíchány v uvedeném poměru.

4.4 Kultivace *E. aerogenes* v syntetickém médiu s aminokyselinami

V další části práce byl sledován růst *E. aerogenes* v syntetickém médiu s aminokyselinami za účelem zjištění, zda některá z aminokyselin není pro růst *E. aerogenes* esenciální. Syntetické médium bylo připraveno smícháním následujících aminokyselin (glycin, cystein, izoleucin, valin, leucin, tyrozin, fenylalanin, arginin, serin, metionin, treonin, prolin, histidin, ornitin, lyzin, asparagin, tryptofan, kyselina glutamová, kyselina diaminopimelová a citrulin) v koncentraci 0,1 g/l přičemž v každé připravené směsi jedna aminokyselina chyběla. Takto připravená kultivační média byla rozpipetována v množství 200 μ l do jamek mikrotitrační destičky a zaočkována 5 μ l suspenze bakterie *Enterobacter aerogenes* CCM 2531 narostených přes noc. Destička byla přichystána tak, aby bylo možné hodnoty měřit duplicitně tzn., že byly vedle sebe umístěny dvě stejná kultivační média pro jednu bakteriální suspenzi. Stejně tak byla uskutečněna i pozitivní a negativní kontrola.

Vzorky, které měly sloužit k pozitivní kontrole, obsahovaly kultivační médium masopeptonový bujón s přídavkem aminokyselin. Jako negativní kontrola posloužily vzorky kultivačních pŮd aminokyselinami, ale bez bakteriální suspenze. Zde nebyl žádný nárůst mikroorganismů očekáván.

Testovaný kmen byl kultivován při teplotě 25 ± 1 °C za občasného protřepávání po dobu 24 hodin. Bakteriální nárůst, resp. změna optické hustoty, byla měřena na přístroji TECAN Sunrise TW/TC (TECAN, Rakousko) při vlnové délce 600 nm v 30-ti minutových intervalech. Před měřením byly vzorky protřepávány po dobu 10-ti sekund. Měřicí přístroj disponuje softwarem pro komplexní redukci dat Magellan, pomocí něhož byl TECAN řízen.

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

Produkce biogenních aminů v potravinách je závislá na mnoha faktorech, mezi které řadíme koncentraci sacharidů, které slouží jako zdroj uhlíku a energie pro bakterie, koncentraci NaCl, dostupnost kyslíku, ale také přítomnou mikroflórou, množství prekurzorů, teplotu, pH, aktivitu vody, redoxní potenciál aj.[6]

Produkce biogenních aminů je rovněž omezena množstvím dostupných aminokyselin v prostředí, [35] a proto bylo kultivační médium (MPB) obohaceno o 0,1; 0,2; 0,3; 0,5; 1,0 a 2,0 % (w/v) aminokyseliny histidinu, která sloužila jako prekurzor pro tvorbu histaminu.

Kultivační teplota rovněž významně ovlivňuje tvorbu biogenních aminů. Námi zvolené teploty (30 a 37 °C) vyhovují optimální růstové teplotě kmenu *Enterobacter aerogenes* CCM 2531, a tím i produkci biogenního aminu. Přesto byly zjištěny rozdíly v produkci histaminu v závislosti na těchto kultivačních teplotách.

Mezi další významné faktory ovlivňující tvorbu biogenních aminů pH prostředí. Mnohé studie prokázaly, že optimální pH pro jejich tvorbu 2,5 – 6,5, tedy kyselé prostředí. [39] V práci jsme se zaměřili na pH 6 a 7, která jsou nejvhodnější pro růst testovaného kmene *E. aerogenes* CCM 2531.

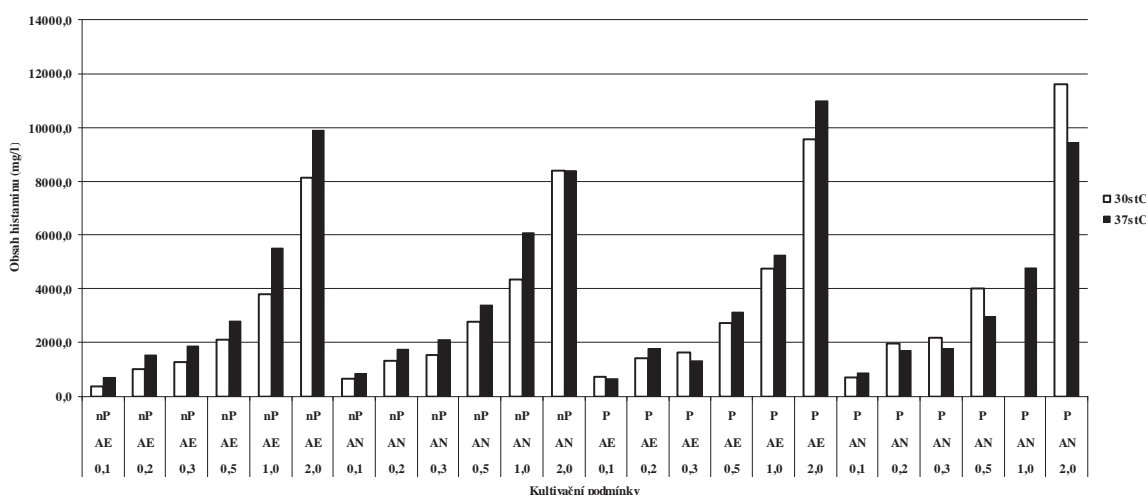
5.1 Vliv vnějších faktorů na produkci histaminu při pH 7

V první části experimentu byl sledován vliv kultivační teploty na produkci histaminu kmenem *Enterobacter aerogenes* CCM 2531 v médiu o pH 7 po dobu tří dnů.

1.den

Po 24 hodinách kultivace byla v médiu bez přídavku pyridoxalfosfátu při teplotě 37 °C produkce histaminu vyšší než při teplotě 30 °C (viz. Obr.8)

Produkce histaminu kmenem *E. aerogenes* CCM 2531 s přídavkem pyridoxalfosfátu se již liší v závislosti na přístupu kyslíku. V aerobním prostředí byla produkce histaminu při teplotě 37 °C vyšší, zatímco v anaerobním prostředí byla produkce histaminu při teplotě 37 °C nižší ve srovnání s kultivační teplotou 30 °C.



Obr.8. Obsah histaminu v závislosti na kultivační teplotě

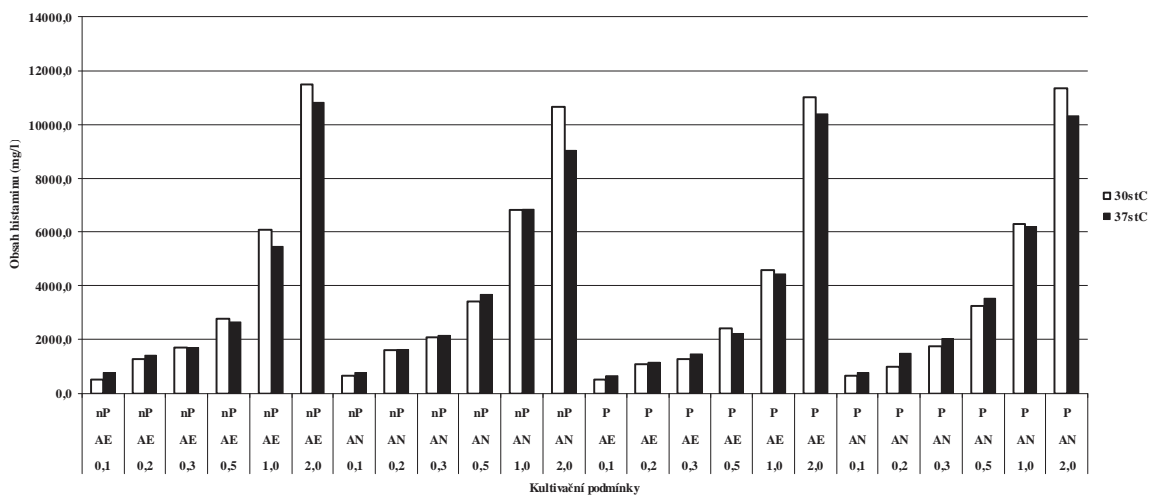
nP – bez přídavku pyridoxalfosfátu, P – přídavek (0,005 % w/v) pyridoxalfosfátu, AE - aerobní prostředí, AN -anaerobní podmínky, 30 a 37 – kultivační teplota ve °C; 0,1 – 2,0 – koncentrace aminokyseliny histidinu.

Z obrázku je rovněž patrné, že se obsah biogenního aminu histaminu s rostoucí koncentrací histidinu postupně zvyšoval. Maximální produkce histaminu (11,6 g/l média) byla po 24 hodinách kultivace v médiu o pH 7 zaznamenána při teplotě 30 °C za anaerobních podmínek v médiu s 2 % (w/v) histidinem a s přídavkem kofaktoru pyridoxalfosfátu.

2.den

Po 48 hodinách kultivace byla produkce histaminu při teplotě 30 °C vyšší téměř u všech analyzovaných vzorků než při teplotě 37 °C (viz. Obr.9)

Z grafu je opět zřejmé, že se obsah biogenního aminu histaminu postupně zvyšoval v závislosti na rostoucí koncentraci aminokyseliny histidinu. Při koncentraci 2,0 % (w/v) histidinu bylo množství histaminu nejvyšší a hodnoty produkce biogenních aminu byly srovnatelné v aerobním i anaerobním prostředí. Přídavek pyridoxalfosfátu ani přítomnost kyslíku neměly na produkci testovaného biogenního aminu výraznější vliv.



Obr.9. Obsah histaminu v závislosti na kultivační teplotě

nP – bez přídavku pyridoxalfosfátu, P – přídavek (0,005 % w/v) pyridoxalfosfátu, AE - aerobní prostředí, AN - anaerobní podmínky, 30 a 37 – kultivační teplota ve °C; 0,1 – 2,0 – koncentrace aminokyseliny histidinu.

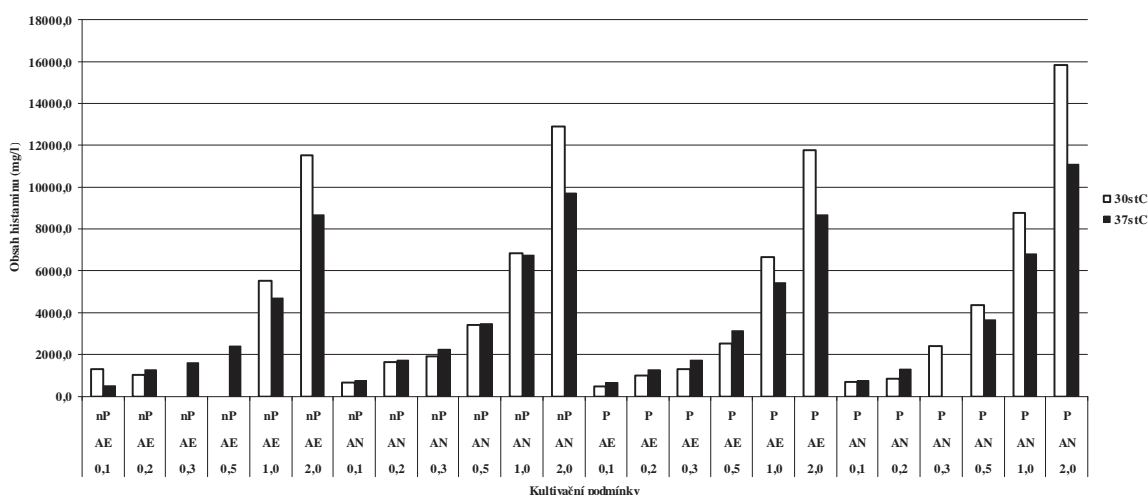
Maximální produkce histaminu (11,5 g/l média) byla po 48 hodinách kultivace v médiu o pH 7 zaznamenána při teplotě 30 °C při aerobních podmínkách v médiu s 2 % (w/v) histidinem a bez přídavku kofaktoru pyridoxalfosfátu.

3.den

Po třídní kultivaci (72 hodinách) byl obsah histaminu při teplotě 37 °C nižší v anaerobním i aerobním prostředí než při teplotě 30 °C.

Nejvyšší produkce byla zaznamenána v prostředí bez kyslíku s přídavkem pyridoxalfosfátu a to 15,8 g/l.

Stejně jako předcházející dva dny měla na produkci histaminu kmenem *E.aerogenes* CCM 2531 největší vliv koncentrace aminokyseliny histidinu a přídavek kofaktoru pyridoxalfosfátu.



Obr.10. Obsah histaminu v závislosti na kultivační teplotě

nP – bez přídavku pyridoxalfosfátu, P – přídavek (0,005 % w/v) pyridoxalfosfátu, AE - aerobní prostředí, AN - anaerobní podmínky, 30 a 37 – kultivační teplota ve °C; 0,1 – 2,0 – koncentrace aminokyseliny histidinu.

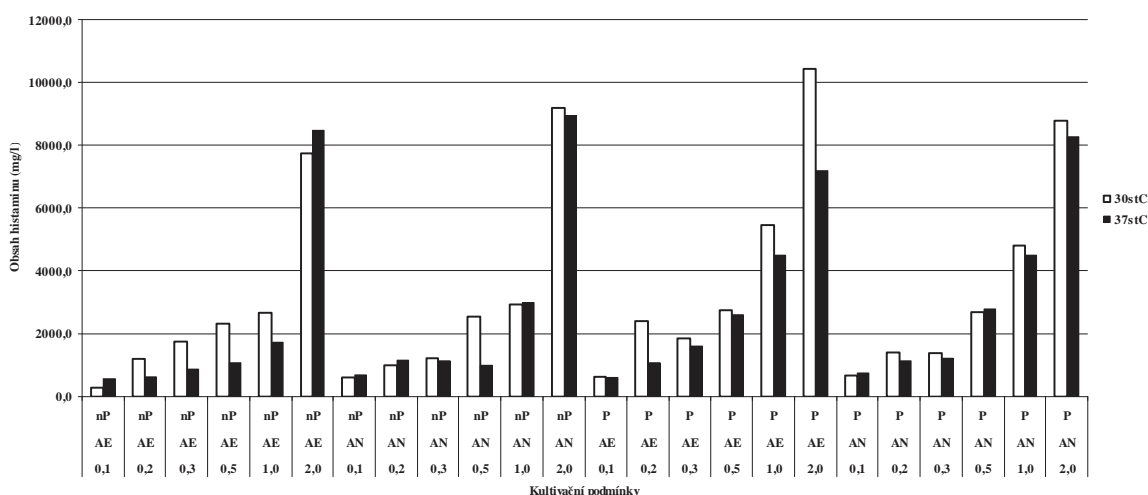
Pouze první den převládala produkce histaminu při teplotě 37 °C a pouze po 24 hodinové kultivaci měl na produkci histaminu vliv přístup kyslíku i přídavek pyridoxalfosfátu. Další dva dny byla zjištěna zvýšená produkce histaminu při teplotě 30 °C, přídavek pyridoxalfosfátu ani přístup kyslíku neměly již na produkci biogenního aminu výrazný vliv.

5.2 Vliv vnějších faktorů na produkci histaminu při pH 6

V další fázi experimentu byl opět sledován vliv teploty na produkci histaminu kmenem *Enterobacter aerogenes* CCM 2531 v médiu po dobu tří dnů, tentokrát při pH 6.

1.den

Z grafu na obrázku 11 je zřejmé, že po 24 hodinách byla vyšší produkce histaminu při teplotě 30 °C než při teplotě 37 °C téměř ve všech případech. Přítomnost kyslíku neměla na jeho produkci významný vliv. Nejznatelnější produkce histaminu byla při 2% (w/v) koncentraci histidinu.



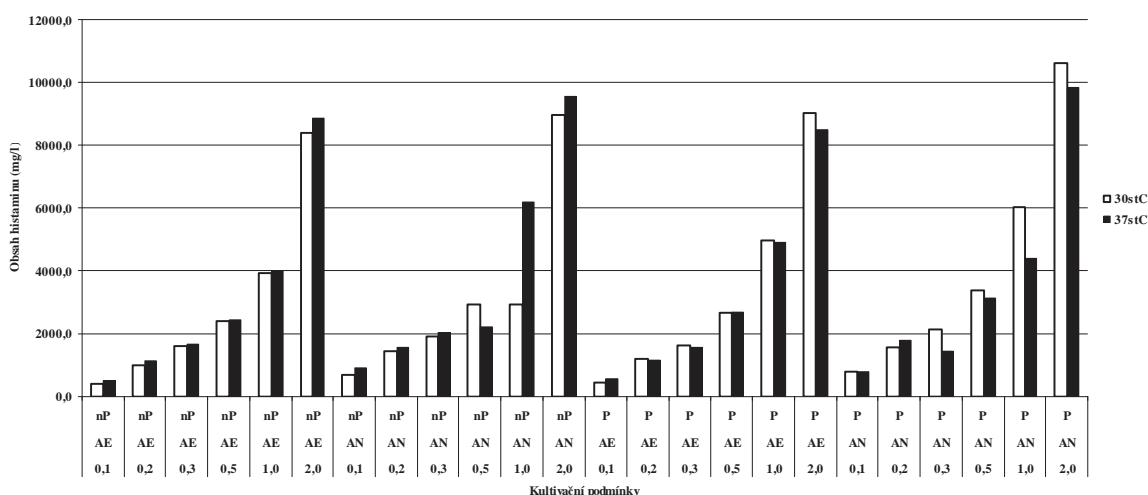
Obr.11. Obsah histaminu v závislosti na kultivační teplotě

nP – bez přídavku pyridoxalofosfátu, P – přídavek (0,005 % w/v) pyridoxalofosfátu, AE - aerobní prostředí, AN - anaerobní podmínky, 30 a 37 – kultivační teplota ve °C; 0,1 – 2,0 – koncentrace aminokyseliny histidinu.

Z obrázku 11 je rovněž patrné, že se obsah biogenního aminu histaminu s rostoucí koncentrací histidinu postupně zvyšoval. Maximální produkce histaminu (10,4 g/l média) byla po 24 hodinách kultivace v médiu o pH 6 zaznamenána při teplotě 30 °C za aerobních podmínek v médiu s 2 % (w/v) histidinu a s přídavkem kofaktoru pyridoxalofosfátu.

2.den

Z grafu na obrázku 12 je zřejmé, že pokud probíhala kultivace v médiu bez přídavku pyridoxalofosfátu, tak byla po 48 hodinách vyšší produkce histaminu zaznamenána při teplotě 37 °C, zatímco v prostředí s přídavkem pyridoxalofosfátu byla vyšší produkce histaminu detekována při teplotě 30 °C. Přítomnost kyslíku neměla na jeho produkci významný vliv. Nejznatelnější produkce histaminu byla detekována při 2% koncentraci histidinu.



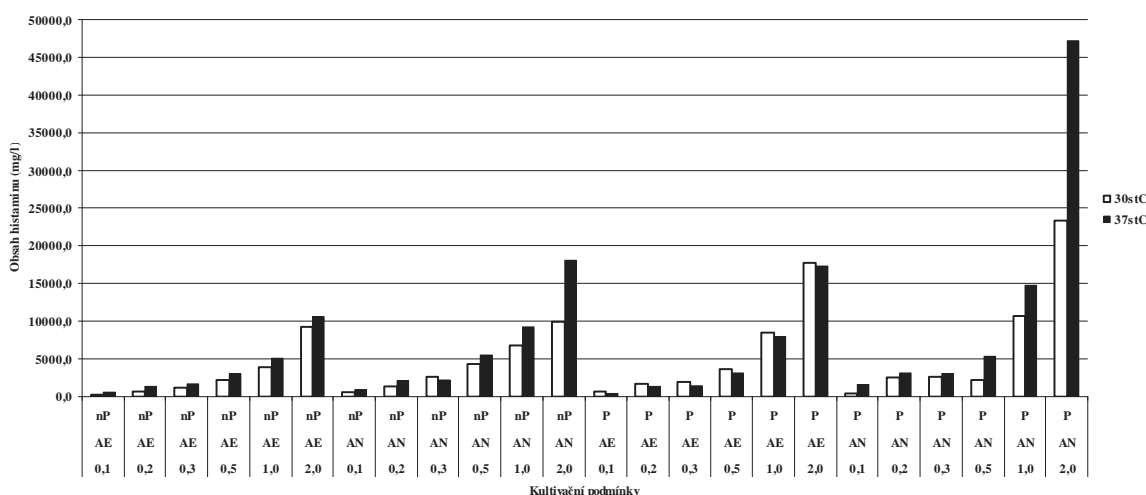
Obr.12. Obsah histaminu v závislosti na kultivační teplotě

nP – bez přídavku pyridoxalfofosfátu, P – přídavek (0,005 % w/v) pyridoxalfofosfátu, AE - aerobní prostředí, AN - anaerobní podmínky, 30 a 37 – kultivační teplota ve °C; 0,1 – 2,0 – koncentrace aminokyseliny histidinu.

Z obrázku 12 je rovněž patrné, že se obsah biogenního aminu histaminu s rostoucí koncentrací histidinu postupně zvyšoval. Maximální produkce histaminu (10,6 g/l média) byla po 48 hodinách kultivace v médiu o pH 6 zaznamenána při teplotě 30 °C za anaerobních podmínek v médiu s 2 % (w/v) histidinu a s přídavkem kofaktoru pyridoxalfofosfátu.

3.den

Po třech dnech kultivace v médiu o pH 6 byla produkce histaminu nejvyšší v anaerobním prostředí s přídavkem pyridoxalfofosfátu při teplotě 37 °C, a to 47,3 g/l, což je přibližně dvojnásobné množství než při teplotě 30 °C (viz. obr.13)



Obr.13. Obsah histaminu v závislosti na kultivační teplotě

nP – bez přídavku pyridoxalofosfátu, P – přídavek (0,005 % w/v) pyridoxalofosfátu, AE - aerobní prostředí, AN - anaerobní podmínky, 30 a 37 – kultivační teplota ve °C; 0,1 – 2,0 – koncentrace aminokyseliny histidinu.

V anaerobním prostředí bez přídavku pyridoxalofosfátu byla také přibližně dvojnásobně vyšší produkce histaminu při teplotě 37 °C než při teplotě 30 °C a to 18,1 g/l. V ostatních případech rostla produkce histaminu se zvyšující se koncentrací histidinu, ale jeho obsah byl mnohem nižší.

První dva dny byla zvýšená produkce histaminu pozorována při teplotě 30 °C, pouze třetí den převládala produkce histaminu při teplotě 37 °C.

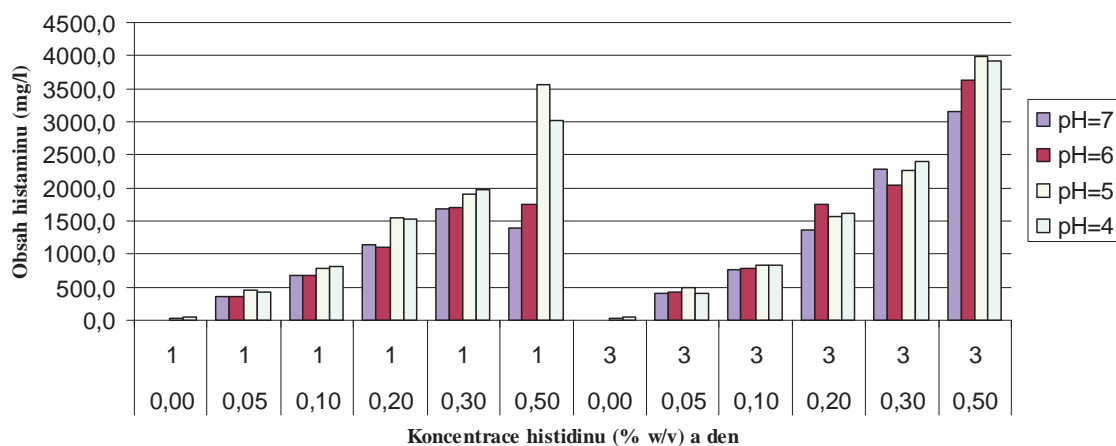
Obecně bylo zjištěno, že při nižších koncentracích aminokyseliny histidinu byl relativní výtěžek biogenního aminu histaminu vyšší.

5.3 Vliv pH na produkci histaminu

Z předcházejících výsledků je patrné, že přítomnost kyslíku ani přídavek kofaktoru pyridoxalofosfátu neměly na produkci histaminu u testovaného kmene *Enterobacter aerogenes* CCM 2531 výraznější vliv. Proto byla v dalším experimentu sledována produkce histaminu pouze v závislosti na pH (4, 5, 6 a 7) při kultivační teplotě 30 °C po dobu tří dnů.

Zároveň bylo z předcházejících experimentů zjištěno (vzhledem k relativnímu výtěžku histaminu), že na produkci histaminu má největší vliv přítomnost aminokyseliny histidinu

v nižších koncentracích. Proto byl v této fázi experimentu testován vliv přítomnosti histidinu v koncentracích do 0,5 % (w/v).



Obr.14. Obsah histaminu v závislosti na pH

1, 3 – testovací dny, 0,00-0,50- koncentrace aminokyseliny histidinu (% w/v)

Obecně lze konstatovat, že se obsah biogenního aminu histaminu s rostoucí koncentrací histidinu postupně zvyšoval.

Nejvyšší produkce histaminu byla zaznamenána v kultivačním médiu při pH 5 a koncentraci 0,50 % (w/v) histidinu první (3,6 g/l) i třetí den (4,0 g/l). Naopak při pH 7 byla jeho produkce nejnižší. Při koncentraci histidinu do 0,20 % (w/v) v kultivačním médiu nebyly zjištěny znatelné rozdíly v produkci histaminu v obou testovaných dnech. Mírné rozdíly byly zaznamenány až při vyšší koncentraci (0,30 a 0,50 % w/v) histidinu v kultivačním médiu.

Z výsledků je rovněž patrné, že produkce histaminu byla vyšší při nižším pH. Tento jev je v souladu i s poznatky jiných autorů (např. Fernández et al., [51]), podle kterých je dekarboxylázová aktivita bakterií vyšší při nižším pH. Dekarboxylázové enzymy mohou být bakteriemi využívány k regulaci vnitrobuněčného pH za účelem jejich přežití a růstu v kyselém prostředí.

Gardini et al. [35] popsal účinky vlivu pH, a teploty na parametry růstu a produkci biogenních aminů kmenem *Enterococcus faecalis* E37. Podle jejich studie bylo více biogenních aminů produkováno ve vyšším pH, což se s našimi výsledky neshoduje.

Z výsledků je rovněž patrné, že se zvyšující se koncentrací přidané aminokyseliny, která je substrátem pro sledovaný produkt (biogenní amin), bylo detekováno vyšší množství histaminu. Z výsledků lze také vypožorovat, že mezi obsahem histaminu a koncentrací aminokyseliny histidinu nebyla zjištěna přímá úměrnost.

Obecně byla zaznamenána vyšší produkce histaminu v přítomnosti pyridoxalfosfátu, který působí jako kofaktor dekarboxylázových enzymů. Nicméně přítomnost kofaktoru neměla výraznější vliv na produkci histaminu u *E.aerogenes* CCM 2531 za daných testovaných podmínek.

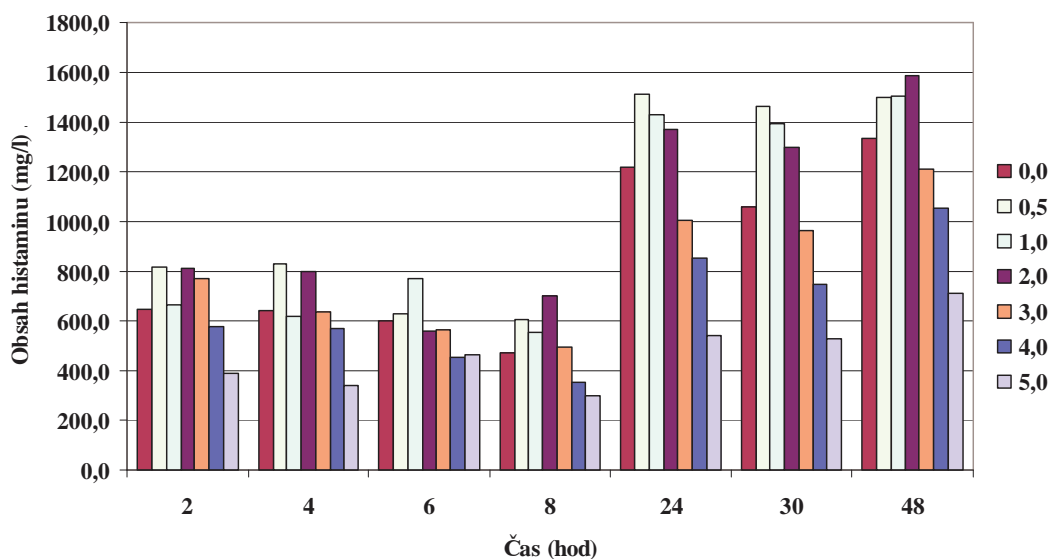
Zjištění, že při nižší testovací teplotě bylo produkováno vyšší množství histaminu, se neshoduje se studií Bover-Cid et al. [52], podle které vzniklo při skladovací teplotě 4 °C ve fermentovaných salámech nižší množství biogenních aminů než při skladování při 15 °C. [52] Rozdíl je dán faktem, že obě teploty 30 a 37 °C vyhovují optimální růstové teplotě testované bakterie a tím i produkci biogenního aminu. Nižší teploty produkci biogenních aminů tak u námi testovaného kmenu *E. aerogenes* CCM 2531 nepotlačují.

Dalším faktorem, který byl sledován za účelem ovlivnění produkce histaminu u kmene *E. aerogenes* CCM 2531, byl vliv aerobního a anaerobního prostředí. Z výsledků je patrné, že v případě většiny testovaných parametrů došlo k nepatrně vyšší produkci histaminu v prostředí, ve kterém nebyl kyslík dostupný.

Tyto výsledky jsou v souladu s dalšími studii (např. Buňková et al., Molenaar et al., Pereira, et al.), ve kterých se uvádí, že dekarboxylázové enzymy mají větší aktivitu v prostředí bez přístupu kyslíku. [53], [54], [55]

5.4 Vliv obsahu NaCl na produkci histaminu

V další části experimentu byla sledována produkce histaminu při pH 6 během 48 hodin kultivace v závislosti na koncentraci NaCl.



Obr. 15 Obsah histaminu v závislosti na čase a obsahu NaCl

0,0-5,0- koncentrace NaCl (% w/v), 2, 4, 6, 8, 24, 30, 48- čas (hod)

V časech 2, 4, 6 a 8 hodin byla zjištěna nejvyšší produkce histaminu při všech testovaných koncentracích NaCl (0,0; 0,5 ; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0 w/v) 829,7 mg/l. Nejnižší obsah histaminu byl zaznamenán při 5% (w/v) koncentraci NaCl a to 298,6 mg/l. V časech 24, 30 a 48 hodin byla produkce histaminu znatelně vyšší. Nejvyšší produkce histaminu byla pozorována po 48 hodinách při 2% (w/v) koncentraci NaCl a to zhruba 1600 mg/l. V literatuře [52] se uvádí, že produkce biogenních aminů bývá zpravidla zaznamenána v pozdní logaritmické nebo stacionární fázi růstu bakterií. To je i v souladu s našimi výsledky. Nejvyšší produkce histaminu byla zaznamenána po 48 hod při koncentraci 2 % (w/v) NaCl a to 1589,2 mg/l.

Chander et al. [56] zjistili, že rychlost tvorby biogenních aminů kmenem *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* byla značně omezena při zvýšení koncentrace chloridu sodného v médiu z 0 % na 6 %, což se shoduje i s našimi výsledky, kdy v případě kultivace bakterií v bujónu obohaceném o NaCl v koncentraci vyšší než 3,0 % (w/v) bylo detekováno nižší množství biogenního aminu histaminu.

Tylor a Woychik [57] zjistili, že koncentrace NaCl 3,5 - 5, 5 % (w/v) působí inhibičně na produkci histaminu u gramnegativních bakterií *Klebsiella pneumoniae*, kdežto nižší koncentrace NaCl jsou vůči snížení histaminu neúčinné.

Gardini et al. [35] popsali účinky koncentrace chloridu sodného na parametry růstu a produkci biogenních aminů kmenem *Enterococcus faecalis* E37. Se vzrůstající koncentrací chloridu sodného byl vznik biogenních aminů u bakterie *Enterococcus faecalis* potlačen, což se shoduje i s našimi výsledky.

Sumner et.al [58] sledovali vliv různých koncentrací NaCl (0; 0,5; 1,5; 3,5 a 5,5 % (w/v)) na produkci histaminu u bakterie *Lactobacillus buchneri*. Jeho maximální produkce byla zaznamenána při přidavku 0,5 % (w/v) NaCl do kultivačního média (MRS). Koncentrace 5,5 % (w/v) NaCl už působila inhibičně na produkci histaminu testované bakterie, ale její růst ještě inhibován nebyl.

Z testovaného kmene bakterie *Enterobacter aerogenes* CCM 2531 byla připravena suspenze buněk, která byla kultivována přes noc v médiu obsahujícím aminokyselinu histidin v koncentraci 0,2 % (w/v), aby došlo k pomnožení buněk a zároveň k zahájení dekarboxylázové aktivity bakterií [52].

Z výsledků experimentů je patrné, že kmen *Enterobacter aerogenes* CCM 2531 produkoval histamin téměř za všech testovaných podmínek.

Zvolené kultivační teploty (30 a 37 °C) vyhovují optimální růstové teplotě kmenu *E. aerogenes* CCM 2531, a tím i produkci biogenního aminu. Obecně byla zjištěna vyšší produkce histaminu při teplotě 30 °C, tedy při nižší kultivační teplotě.

Výraznější vliv na produkci histaminu měla hodnota pH prostředí, respektive kultivačního bujónu. Nejvyšší produkce histaminu byla zaznamenána v kultivačním médiu při pH 5, naopak při pH 7 byla jeho produkce nejnižší. Je tedy patrné, že produkce histaminu je vyšší při nižším pH. Fernández et al. [59] uvádí, že nízké hodnoty pH přispívají k menší produkci biogenních aminů, avšak Gonzáles-Fernández et al. [60] zjistili, že se bakterie dokážou proti nízkému pH bránit zvýšením dekarboxylázové aktivity, což vede k vyšší tvorbě biogenních aminů, které vykazují zásaditou reakci a tím zvyšují pH prostředí buňky. Tento předpoklad byl potvrzen i výsledky experimentů s *E. aerogenes* v předkládané diplomové práci.

Pyridoxal-5-fosfát působí jako kofaktor dekarboxylázových enzymů. V jeho přítomnosti byla zaznamenána vyšší produkce histaminu, což se shoduje s výsledky jiných studií. [7]

Dalším faktorem, který byl v této diplomové práci sledován, byl vliv aerobního a anaerobního prostředí. Rod *Enterobacter* je popisován jako fakultativně anaerobní bakterie

[39], což znamená, že kyslík ke svému životu nepotřebují, ale v jeho přítomnosti jej dokáží využívat v metabolických reakcích. Z výsledků experimentů této práce je patrné, že na produkci histaminu neměla přítomnost, respektive nepřítomnost, kyslíku významný vliv, což se projevilo nevýraznými rozdíly v produkci histaminu po kultivaci za aerobních nebo anaerobních podmínek.

5.5 Vliv přítomnosti aminokyselin a NaCl na růst *Enterobacter aerogenes* CCM 2531

Ve druhé fázi diplomové práce byly provedeny experimenty s růstem bakterie *Enterobacter aerogenes* CCM 2531 v přítomnosti aminokyselin jako prekurzorů biogenních aminů. Test byl proveden paralelně tak, že bylo připraveno syntetické médium, které obsahovalo vždy devatenáct aminokyselin z celkových dvaceti a přídavek NaCl v koncentraci 2,0 % (w/v).

Růst bakterií 1.den v médiu s přídavkem NaCl

Po 24hodinové kultivaci v bujónu s NaCl o koncentraci 2 % (w/v) byl nejzřetelnější nárůst buněk testovaného kmene ve zkumavce, která neobsahovala aminokyselinu cystein. Mírný nárůst byl pozorován u zkumavek, které neobsahovaly aminokyseliny metionin, glycin, prolin, fenylalanin, citrulin, arginin, kyselinu diaminopimelovou a tyrozin. Naopak nárůst nebyl pozorován u zkumavek, kde nebyl přidán valin, serin, leucin, ornitin, lyzin, izoleucin, tryptofan, kyselina glutamová, aspargin, histamin a treonin. Výsledky tohoto experimentu jsou shrnuty v tabulce 4.

Tab.4. Růst Enterobacter aerogenes po 24 hodinách kultivace v syntetickém médiu s aminokyselinami a s přidavkem NaCl

Cys	++	Leu	0	Ileu	0	His	0
Met	+	Phe	+	Trp	0	Thre	0
Gly	+	Orn	0	Glu	0		
Pro	+	Citr	+	Asp	0		
Val	0	Arg	+	Diamino	+		
Ser	0	Lys	0	Tyr	+		

Uvedená aminokyselina nebyla do syntetického média přidána, 0 – růst nebyl detekován

Růst bakterií 2. den v médiu s přidavkem NaCl

Po 48hodinové kultivaci v syntetickém médiu s aminokyselinami a s přidavkem NaCl nebyl nárůst pozorován ve zkumavkách, které neobsahovaly aminokyseliny valin, serin, leucin, lyzin, izoleucin a tryptofan. V ostatních zkumavkách byl pozorován pouze mírný nárůst. Výsledky jsou shrnuty v tabulce 5.

Tab.5. Růst Enterobacter aerogenes po 48 hodinách kultivace v syntetickém médiu s aminokyselinami a s přidavkem NaCl

Cys	++	Leu	0	Ileu	0	His	+
Met	+	Phe	+	Trp	0	Thre	+
Gly	+	Orn	+	Glu	+		
Pro	+	Citr	+	Asp	+		
Val	0	Arg	+	Diamino	+		
Ser	0	Lys	0	Tyr	+		

Uvedená aminokyselina nebyla do syntetického média přidána, 0 – růst nebyl detekován

Růst bakterií 1. den v médiu bez přídavku NaCl

Po 24hodinové kultivaci testované bakterie v syntetickém médiu obsahujícím směs aminokyselin bez přídavku NaCl byl nejznatelnější nárůst ve zkumavce, která neobsahovala aminokyseliny valin a serin, naopak v kultivačním médiu bez kyseliny glutamové a histidinu nebyl pozorován žádný nárůst. U ostatních zkumavek byl nárůst mírný, jak ukazují výsledky v tabulce 6.

Tab.6. Růst *Enterobacter aerogenes* po 24 hodinách kultivace v syntetickém médiu s aminokyselinami bez přídavku NaCl

Cys	+	Leu	+	Ileu	+	His	0
Met	+	Phe	+	Trp	+	Thre	+
Gly	+	Orn	+	Glu	0		
Pro	+	Citr	+	Asp	+		
Val	+++	Arg	+	Diamino	+		
Ser	+++	Lys	+	Tyr	+		

Uvedená aminokyselina nebyla do syntetického média přidána, 0 – růst nebyl detekován

Růst bakterií 2. den v médiu bez přídavku NaCl

Po 48hodinové kultivaci *E. aerogenes* CCM 2531 v syntetickém médiu s aminokyselinami bez přídavku NaCl byl zjištěn nejznatelnější nárůst ve zkumavkách, které neobsahovaly aminokyselinu valin, serin, lyzin a kyselinu glutamovou. Nulový nárůst byl pozorován v kultivačním bujónu bez histidinu. V případě ostatních kultivačních půd byl zjištěn velmi mírný nárůst, jak lze vyčíst z tabulky 7.

Bakterie čeledi *Enterobacteriaceae* jsou obecně kultivačně nenáročné, proto byl jejich růst detekován ve většině případů. Přídavek NaCl v koncentraci 2 % (w/v) neměl na jejich růst příliš velký vliv.

Tab.7. Růst *Enterobacter aerogenes* po 24 hodinách kultivace v syntetickém médiu s aminokyselinami bez přídavku NaCl

Cys	+	Leu	+	Ileu	+	His	0
Met	+	Phe	+	Trp	+	Thre	+
Gly	+	Orn	+	Glu	++		
Pro	++	Citr	+	Asp	+		
Val	+++	Arg	+	Diamino	+		
Ser	+++	Lys	++	Tyr	+		

Uvedená aminokyselina nebyla do syntetického média přidána, 0 – růst nebyl detekován

V syntetickém médiu obsahujícím vždy devatenáct aminokyselin z celkových dvaceti s přídavkem nebo bez přídavku NaCl bylo obecně pozorováno, že přídavek NaCl neměl na růst kmene *Enterococcus aerogenes* CCM 2531 výraznější vliv.

Bakterie čeledi *Enterobacteriaceae* jsou ve srovnání např. s bakteriemi mléčného kvašení kultivačně méně náročné, tudíž nebylo zjištěno, že pro ně byla některá z testovaných aminokyselin esenciální.

Bakterie mléčného kvašení např. rodu *Lactococcus* vyžadují pro svůj růst komplexní média a je pro ně esenciálních mnoho aminokyselin. Novak et al. [61] zjistil, že v minimálním médiu pro růst *L. lactis* subsp *lactis* je potřeba 6 esenciálních aminokyselin (kyselina glutamová, izoleucin, leucin, metionin, serin a valin).

ZÁVĚR

Cílem předkládané diplomové práce bylo sledování vlivu vnějších faktorů na produkci biogenního aminu histaminu kmenem *Enterobacter aerogenes* CCM 2531. Prověřovány byly následující faktory: vliv pH prostředí, vliv přídavku aminokyselin o různé koncentraci, vliv kofaktoru pyridaxal-5-fosfátu, vliv přídavku NaCl, vliv teploty a vliv aerobního a anaerobního prostředí.

Zjištěné výsledky lze shrnout do následujících bodů:

- při teplotě 30 °C byla obecně zjištěna vyšší produkce histaminu než při teplotě 37 °C.
- při pH 7 byla největší produkce histaminu zaznamenána v prostředí bez kyslíku s přídavkem pyridoxalfosfátu, při pH 6 byla za stejných podmínek zjištěna vyšší produkce histaminu,
- obsah histaminu se s rostoucí koncentrací histidinu a dobou kultivace postupně zvyšoval, nejvyšší produkce byla zaznamenána při koncentraci 2 % (w/v) aminokyseliny histidinu,
- s přídavkem kofaktoru pyridoxalfosfátu byla detekována vyšší produkce histaminu
- přítomnost kyslíku neměla na produkci histaminu kmenem *E. aerogenes* CCM 2531 výrazný vliv,
- při nižším pH (pH 5) byla produkce histaminu výraznější než při pH 6 a 7,
- při vyšších koncentracích NaCl (5 % (w/v)) v kultiavačním prostředí byla produkce histaminu nejnižší (298,6 mg/l), nejvyšší produkce histaminu byla pozorována po 48 hodinách kultivace v médiu s přídavkem 2 % (w/v), a to 1600 mg/l.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] VELÍŠEK, J. *Chemie potravin 3*. 2. vyd. Tábor: OSSIS, 2002. 343 s. ISBN 80-86659-02-X
- [2] KRÍŽEK, M., KALÁČ, P. *Biogenní aminy v potravinách a jejich role ve výživě*. Czech Journal of Food Science. 1998, roč. 16, č. 4, 110-116 s.
- [3] VÍTOVÁ E.: *Hygiena potravin 1*. vyd. Fakulta chemická. Vysoké učení technické v Brně 2004, 128 s. ISBN 80-214-2680-2
- [4] STEINHAUSEROVÁ I. *Otravy biotoxiny ryb a mořských živočichů*. Veterinářství 2004; roč. 54, 172-175 s.
- [5] RUIZ-CAPILLAS, C., JIMÉNEZ-COLMENERO, F., *Biogenic amines in meat and meat products. Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, vol. 44, no. 7–8, 2004, p. 489–499
- [6] KAROVIČOVÁ, J.; KOHAJDOVÁ, Z. *Biogenic amines in food*. Chemical Papers. 2005, 59 (1), p. 70–79. ISSN 0366–6352
- [7] SHALABY, A. R. *Significance of biogenic amines to food safety and human health*. Food Research International. 1996, vol. 29, p. 675-690
- [8] ADAMS, M. R., NOUT, M. J. R. *Toxic Nitrogen Compounds Produced during Processing: Biogenic Amines, Ethyl Carbamides, Nitrosamines. Fermentation and Food Safety*. Gaithersburg MD: Aspen Publisher, 2001, p. 119 – 140, ISBN 978-0-8342-1843-7
- [9] A-Z slovník pro spotřebitele, dostupný z:
<http://www.agronavigator.cz/az/vis.aspx?id=76786>
- [10] KRÍŽEK, M., KALÁČ, P., *Biogenní aminy v potravinách a jejich role ve výživě*, 1998. č. 4, 151-159 s.
- [11] BRINKL, B., DAMINK, C., JOOSTEN, H. *Occurrence and formation of biologically active amines in foods*, International Journal of Food Microbiology., 1990, vol.11, p. 73-84
- [12] KRÍŽEK, M.: *The determination of biogenic amines in silage*. Archives of Animal Nutrition, Berlin, 41, 1991. vol. 1, p. 97-104

- [13] BĚLOHLÁVKOVÁ, S., FUCHS, M. *Scombroid syndrom*. *Alergie*, 2005, č.3, 217-220 s.
- [14] Státní zdravotní ústav Brno, Vědecký výbor pro potraviny, *Potravinová přecitlivělost: alergie a intolerance*, dostupné z <http://www.chpr.szu.cz/vedvybor/vyp.htm>
- [15] SLÁDKOVÁ, P., KOMPRDA, T., BURDYCHOVÁ, R. *Skríning startovacích čar a probiotických kultur určených pro výrobu fermentovaných masných výrobků na schopnost tvorby biogenních aminů*. In MendelNet '07 Agro. 1. vyd. Brno : MZLU v Brně, 2007, 1-7 s. ISBN 978-80-7375-119-7.
- [16] Ministerstvo školství, mládeže a tělovýchovy, dostupné z
www: http://smd.gytool.cz/downloads/DUSIKATE_DERIVATY_cb.pdf
- [17] KOHAJDOVÁ, Z.; KAROVIČOVÁ, J.; GREIF, G. *Biogénne aminy v potravinách*. *Potravinárstvo*. 2008, 2, (1), 30–49 s.
- [18] SILLA SANTOS, M.H. *Biogenic amines: their importance in foods*. *International Journal of Food Microbiology*, 1996, 29 s., ISBN – 213-231
- [19] HALÁSZ, A., BARÁTH, A., SIMON-SARKADI, L., HOLZAPFEL, W. *Biogenic amines and their production by microorganisms*. *Trends in Food Science & Technology* 1994, vol. 5, p. 42–49
- [20] INNOCENTE, N., BIASUTTI, M., PADOVESE, M., MORET, S. *Determination of biogenic amines in cheese using HPLC technique and direct derivatization of acid extract*. *Food Chemistry*, 2007, vol. 101, no. 3, p. 1285–1289
- [21] KALAČ, P., KRAUSOVÁ, P. *A review of dietary polyamines: Formation, implications for growth and health and occurrence in foods*. *Food Chemistry*, 2005, Vol. 90, p. 219–230
- [22] KOPEC, K. *Tabulky nutričních hodnot ovoce a zeleniny*. Praha: ÚZPI, 1998, ISBN 80-86153-64-9
- [23] GREIF, G., GREIFOVÁ, M., *Štúdium analýzy biogénnych aminov vo vybraných mliečnych výrobkoch*, *Mliekarenstvo*. -37-2 (2006), dostupné z:
<http://www.gate2biotech.cz/biogenni-aminy-v-mlecnych-vyrobcich/>

- [24] KOMPRDA, T. *Obecná hygiena potravin*. Brno, MZLU, 2004, 145 s. ISBN 978-80-7157-757-7
- [25] PIPEK, P. *Fermentované salámy a probiotika*. Potravinářská revue, 2008, roč. 5, č.3, 13-16 s. ISSN 1801-9102
- [26] VALSAMAKI, K., POLYCHRONIADOU, A., *Biogenic amine production in Feta cheese*, Food Chemistry, 2000, 71, p. 260-266
- [27] FOX, P. F., McSWEENEY, P. L. H., COGAN, T. M., GUINEE, T. P. *Toxins in cheese. Cheese – Chemistry, Physics and Microbiology. General Aspects*. 3rded. 2004. p. 561-571. ISBN 0-1226-3652-X.
- [28] SUZZI, G., GARDINI, F. *Biogenic amines in dry fermented sausages: a review*. International Journal of Food Microbiology, 2003, Vol. 88, p. 41-54.
- [29] SILLA SANTOS, M. H. *Toxic nitrogen compounds produced during processing: biogenic amines, ethyl carbamides, nitrosamines*. In ADAMS, M. R.; NOUT, M.J. R. (ed.). Fermentation and food safety. Springer - Verlag, 2001. EAN: 978-0-306-48296
- [30] KOSAŘ, K., PROCHÁZKA, S., a kol., *Technologie výroby sladu a piva.*, Praha, Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, a.s., 2000, 55-56 s., ISBN 80-902658-6-3.
- [31] KALACĚ, P., ŠAVEL, J., KRÍŽEK, M., PELIKÁNOVÁ, T., PROKOPCOVÁ, M., *Biogenic amine formation in bottledbeer*. Food Chemistry 79, 2002, p. 431-434.
- [32] HRABĚTOVÁ, S. *Situační a výhledová zpráva. Réva vinná a víno*. Praha: Ministerstvo zemědělství ČR, 2004. ISBN 80-7084-331-4.
- [33] MANGANI, S. *Putrescine Accumulation in Wine: Role of Oenococcus oeni*. Current microbiology, 2005, Vol. 51, p. 6-10
- [34] ARLORIO, M.; COISSON, J. D.; MARTELLI, A.: *Extraction methods for biogenic amines in wine and beer*. Italian Journal of Food Science, 1999, 11 (4), p. 355 - 360
- [35] GARDINI, F., MARTUSCELLI, M, CARUSO, M. C., GALGANO, F., CRUDELE, M.A., FAVATI, F., GUERZONI, M.E., SUZZI, G., *Effets of pH, temperature and NaCl concentration on the growth kinetics, proteolytic activity and biogenic amine production of Enterococcus faecalis*, International Journal of Food Mikrobiology, 2001, 64105-117

- [36] SANTOS, W. C., SOUZA, M. R., CERQUIEIRA, M. M. O. P., GLÓRIA, M. B. A. *Bioactive amines formation in milk by Lactococcus in the presence or not of rennet and NaCl at 20 and 32 °C*. Food Chemistry, vol. 81, no. 4, June 2003, p. 595–606
- [37] List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature, dostupné z: www.bacterio.cict.fr
- [38] JANDA, J. M.: *New Members of the Family Enterobacteriaceae*, Springer New York, 2006, ISBN 978-0-387-25496-8
- [39] SEDLÁČEK, Ivo. *Taxonomie prokaryot*. 1. vyd. Brno : Masarykova univerzita, 2007. 270 s. ISBN 978-802-1042-070.
- [40] <http://www.sci.muni.cz/~xkarp/atlas-test/enterobacteriaceae.php.utf8>
- [41] obrázek dostupný z: <http://theprofessionalgroup.com/Enterobacter.htm>
- [42] Fakulta veterinárního lékařství, Mikrobiologie pro farmaceuty, dostupné z: http://fv1.vfu.cz/sekce_ustavy/mikrobiologie/mikrobiologie_pro_farmaceuty/praktikum03/index.html
- [43] Lékařská fakulta Univerzity Karlovy, Repetitorium z mikrobiologie, dostupné z: <http://old.lf3.cuni.cz/mikrobiologie/rep/klpn.htm>
- [44] Interaktivní atlas potravinářské mikrobiologie dostupný z: <http://www.fi.muni.cz/~xkarp/atlas-test/cronobacter.php>
- [45] Jan Smíšek, Mikrobiologie pro studenty 3.LF UK dostupné z: <http://mikrobiologie.unas.cz/soubory/enterobakterie.pdf>
- [46] VOTAVA, M. a kol: *Lékařská mikrobiologie speciální*, vyd. Neptun Brno, 2003, ISBN 80-902896-6-5
- [47] LAVIZZARI, T; BRECCIA, M; BOVER-CID, S; VIDAL-CAUROU, M C; VECIANA-NOGUÉS M T., *Histamine, cadaverine, and putrescine produced in vitro by enterobacteriaceae and pseudomonadaceae isolated from spinach.*, Journal of Food Protection 2010 Feb;73(2):385-9.)
- [48] DURLU-OZKAYA, F., AYHAN, K., VURAL, N. *Biogenic amines produced by Enterobacteriaceae isolated from products*. Meat Science, vol. 58, p. 163–166.

- [49] GARRITY, G.M., BRENNER, D.J., KRIEG, N.R., STALEY, J.R. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 2. Springer – Verlag, 2005.
- [50] GÖRNER F., VALÍK L'. *Aplikovaná mikrobiológia požívatin*. 1. vyd. Bratislava: Malé centrum, 2004 . 528 s. ISBN: 8096706497
- [51] FERNÁNDEZ, M., LINARES, D. M., RODRÍGUEZ, A., ALVAREZ, M. A., *Factors affecting tyramine production in Enterococcus durans IPLA 655*. Applied Microbiology and Biotechnology, roč. 73, 2007, s. 1400-1406.
- [52] BOVER-CID, S., HUGA, M., IZQUIERDO-PULIDO, M., VIDAL-CAROU, M.C., *Amino-acid decarboxylase activity of bacteria isolated from fermented pork sausages*. International, Food Microbiology, vol. 6, p. 185-189
- [53] BUŇKOVÁ, L., BUŇKA, F., POLLAKOVÁ, E., PODEŠVOVÁ, T., DRÁB, V., KRÁČMAR, S. *Effect of aero-/anaerobiosis on decarboxylase activity of selected lactic acid bacteria*. Potravinárstvo, 2010, vol. 4, no. 2, p. 05-07,
- [54] MOLENAAR, D., BOSSCHER, J.S., BRINK, B., DRIESSEN, A.J.M., KONINGS, W.N., *Generation of a proton motive force by histidine decarboxylation and electrogenic histidine/histamine antiport in Lactobacillus buchneri*. Journal of Bakteriology, 1993, 175 2864–2870.,
- [55] PEREIRA, C.I., MATOS, D., SAN ROMAO, M.V., CRESPO, M.T.B., *Dual role for the tyroxin decarboxylation pathway in Enterococcus faecium E17: response to an acid challenge and generation of a proton motive force*. 2009, Applied and Environmental Microbiology 75, 345–352.
- [56] BABU, S., CHANDER, H., BATISH, V. K., BATHIA, K. L. *Factors Affecting Amine Production by a Selected Strain of Lactobacillus bulgaricus 942*-Journal of Food Science, 1989, vol. 54, No. 4
- [57] TAILOR, S.L., WOYCHIK, N.A., *Simple medium for assessing quantitative production of histamine by Enterobacteriaceae*, Journal of Food Protection, 1982, vol. 45, p. 747-751
- [58] SUMNER, S.S., ROCHE, F., TAYLOR, S.L., *Factors Controlling Histamine Production in Swiss Cheese Inoculated with Lactobacillus buchneri*, Journal of Dairy Science, 1990, 73, p. 3050 – 3058

- [59] FERNÁNDEZ, M., LINARES, D.M., RODRÍGUEZ, A., ALVAREZ, M.A., *Factors affecting tyramine production in Enterococcus durans IPLA 655*, Applied Microbiology and Biotechnology, 2007, 73, p. 1400 – 1406
- [60] GONZÁLES-FERNÁNDES, C., SANTOS, E.M., JAIME, I., ROVIRA, J., *Influence of starter cultures and sugar concentrations on biogenic amine contents in chorizo dry sausage*, Food Microbiology, 2003, 20, p. 275 – 284
- [61] NOVAK, L., COCAIGN-BOUSQUET, M., LINDLEY, N. D., LOUBIERE, P., *Metabolism and energetics of Lactococcus lactis during growth in complex and synthetic media*. Applied and Environmental Microbiology, 1997, 63, p. 2665-2670.

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1. Vznik histaminu z histidinu	11
Obr. 2. Vznik kadaverinu z lysinu	11
Obr. 3. Vznik agmatinu a putrescinu z argininu	11
Obr. 4. Vznik putrescinu z ornithinu	12
Obr. 5. Vznik tyraminu z tyroxinu a jeho následná oxidace na oktopamin	12
Obr. 6. Tvorba biogenních aminů	14
Obr. 7. <i>Enterobacter aerogenes</i>	27
Obr. 8. Obsah histaminu v závislosti na kultivační teplotě	37
Obr. 9. Obsah histaminu v závislosti na kultivační teplotě	38
Obr. 10. Obsah histaminu v závislosti na kultivační teplotě	39
Obr. 11. Obsah histaminu v závislosti na kultivační teplotě	40
Obr. 12. Obsah histaminu v závislosti na kultivační teplotě	41
Obr. 13. Obsah histaminu v závislosti na kultivační teplotě	42
Obr. 14. Obsah histaminu v závislosti na pH	43
Obr. 15. Obsah histaminu v závislosti na čase a obsahu NaCl	45

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1- Biologický význam biogenních aminů	15
Tabulka 2- Množství biogenních aminů v pivu	22
Tabulka 3- Významné mikroorganizmy produkující biogenní aminy	23
Tabulka 4- Růst <i>Enterobacter aerogenes</i> v přítomnosti aminokyselin s přídavkem NaCl	47
Tabulka 5- Růst <i>Enterobacter aerogenes</i> v přítomnosti aminokyselin s přídavkem NaCl	47
Tabulka 6- Růst <i>Enterobacter aerogenes</i> v přítomnosti aminokyselin bez přídavku NaCl	48
Tabulka 7- Růst <i>Enterobacter aerogenes</i> v přítomnosti aminokyselin bez přídavku NaCl	49

SEZNAM PŘÍLOH

PŘÍLOHA I: Článek ve sborníku z mezinárodní konference Risk factors of food chain

PŘÍLOHA P I: ČLÁNEK PUBLIKOVANÝ VE VĚDECKÉM ČASOPISE

VLIV VNĚJŠÍHO PROSTŘEDÍ NA PRODUKCI HISTAMINU KMENEM *ENTEROBACTER AEROGENES* CCM 2531

EFFECT OF ENVIRONMENT ON HISTAMINE PRODUCTION OF *ENTEROBACTER AEROGENES* CCM 2531 STRAIN

*BUŇKOVÁ Leona, BUŇKA František, KLČOVSKÁ Pavlína, DOLEŽÁLKOVÁ Iva,
KRÁČMAR Stanislav*

*Ústav technologie tuků, tenzidů a kosmetiky, Fakulta technologická, Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně,
Zlín, Česká republika*

Abstract

High concentrations of biogenic amines may have negative effects on the human health. Higher content of these substances in food mostly depends on the decarboxylase activity of present microorganisms and generally, it is considered to be unfavorable. Therefore, the aim of our study was to examine the environmental factors (temperature, pH, presence of oxygen, aminoacids and pyridoxalphosphate addition) which can influence the decarboxylase activity of *Enterobacterias*. The highest histamine production was detected when *Enterobacter aerogenes* CCM 2531 was cultivated in broth enriched with 2.0% (w/v) of histidine and 0.005% (w/v) of pyridoxalphosphate, under anaerobic conditions with a temperature of 37°C and a pH of 6. The decarboxylase activity was influenced mainly by pH, oxygen availability and aminoacid concentration, other factors tested had a weaker impact on the histamine production.

Keywords: histamine, histidine, decarboxylase activity, pH, aerobic/anaerobi environment, *Enterobacterias*, *Enterobacter*

Úvod

Biogenní aminy jsou nízkomolekulární alifatické, aromatické nebo heterocyklické bazické sloučeniny odvozené od aminokyselin. Jsou významnými sloučeninami vyskytujícími se v živých organismech jako metabolické meziprodukty a produkty, které vykazují biologickou aktivitu. Biogenní aminy se nacházejí také v potravinách, kde vznikají činností některých mikroorganismů (zejména kvasných bakterií a bakterií mléčného kvašení), které mají aktivní dekarboxylázy odštěpující z aminokyselin karboxylovou skupinu. Základní podmínkou vzniku biogenních aminů je přítomnost dostupných aminokyselin v daném substrátu, přítomnost mikroorganismů s dekarboxylázovou aktivitou, vhodné podmínky pro jejich růst, množení a aktivita dekarboxyláz (Halász et al., 1994; Kalač & Křížek, 2005).

Biogenní aminy jsou pro člověka nepostradatelné, avšak ve vysokých koncentracích se mohou projevat jako látky psychoaktivní a vazoaktivní. Symptomy konzumace vysokých dávek biogenních aminů jsou zvracení, dýchací potíže, pocení, bušení srdce, hypotenze nebo hypertenze (histamin) a migrény (fenyletylamin, tyramin) (Kalač & Krausová, 2005). Při hodnocení toxického účinku je nutné zvažovat nejen přítomnost konkrétního amínu, ale i ostatních faktorů, jakými jsou množství spotřebované potraviny, přítomnost jiných toxických látek apod. Z tohoto důvodu je velmi obtížné stanovit hranici toxicity biogenních aminů. Koncentrace histaminu vyšší než 500 – 1000 mg/kg se považují pro člověka za nebezpečné. Zvýšené množství histaminu může vyvolat až anafylaktický šok (Silla Santos, 1996).

Tvorba biogenních aminů bakteriemi může být ovlivněna mnohými vnějšími faktory, které mohou působit zejména na kinetiku dekarboxylázových reakcí. Mezi vnější faktory ovlivňující tvorbu biogenních aminů u bakterií, patří teplota a pH prostředí, aero-/anaerobióza, dostupnost zdrojů uhlíku (např. glukózy), přítomnost růstových faktorů, růstová fáze buněk, koncentrace NaCl, vodní aktivita aj. (Gräff et al., 1997, 1998, 2006; Gardini et al., 2001, 2005; Santos et al., 2003; Fernández et al., 2007; Bover-Cid et al., 2008; Enberg & Dalgaard, 2008). Některé z výše zmíněných faktorů (např. koncentrace glukózy) mají malý vliv na produkci biogenních aminů, jiné naopak výrazněji ovlivňují

jejich synezu. Mezi posledně zmíněné faktory lze zařadit anaerobní prostředí (v případě fakultativně anaerobních bakterií), teplotu, pH nebo koncentraci NaCl (Gardini et al., 2001; Greif et al., 2006; Bover-Cid et al., 2008). Kromě výše zmíněných faktorů mohou produkci biogenních aminů ovlivňovat další chemické látky, jako jsou např. fenolické sloučeniny (Alberto et al., 2007), etanol (Gardini et al., 2005; Mazzoli et al., 2009), oxid siřičitý nebo další sacharidy (např. arabinóza) (Gardini et al., 2005).

Schopnost dekarboxylace aminokyselin byla zjištěna u mikroorganismů disponujícími příslušnými enzymy. Mezi takové mikroorganismy lze zařadit mnohé bakterie čeledi *Enterobacteriaceae* (Veciana-Nogués et al., 2004; Pircher et al., 2007), zástupce rodu *Pseudomonas* (Baixas-Nogueras et al., 2003), *Clostridium*, *Bacillus* (Halász et al., 1994), bakterie mléčného kvašení (Buřková et al., 2009) a mnohé další mikroorganismy. Produkce biogenních aminů je vlastnost specifická spíše pro určité kmény mikroorganismů než vlastnost typická pro daný druh, takže různé kmény téhož druhu se mohou lišit v produkci biogenních aminů (Arenas & Manca de Nadra, 2001; Buřková et al., 2009).

Sledování výskytu biogenních aminů v potravinách může být zdrojem cenných informací o bezpečnosti a kvalitě potravin a hygieně potravinářských provozů. Obsah biogenních aminů v potravinách může značně kolísat, někdy až v rozmezí dvou řádů. Obvyklé obsahy biogenních aminů v potravinách se pohybují řádově v jednotkách až desítkách miligramů na kilogram (Kalač & Křížek, 2005). Ani chladicí skladování nemusí zamezit vzniku biogenních aminů. Vinci & Antonelli (2002) zjistili, že se obsah biogenních aminů zvyšuje i během skladování při teplotě $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Odstranění již vzniklých biogenních aminů z potravin je velmi obtížné. Nejvhodnějším způsobem výroby potravin obsahujících malé množství biogenních aminů je však dodržování takových technologických postupů a hygienických podmínek výroby, které brání jejich vzniku (Halász et al., 1994; Silla Santos, 1996).

Cílem této práce bylo provést prvotní studii, ve které budou sledován soubor vnitřních faktorů, jež mohou ovlivnit produkci histaminu u enterobakterií, konkrétně u kmene *Enterobacter aerogenes* CCM 2531.

Materiál a metodika

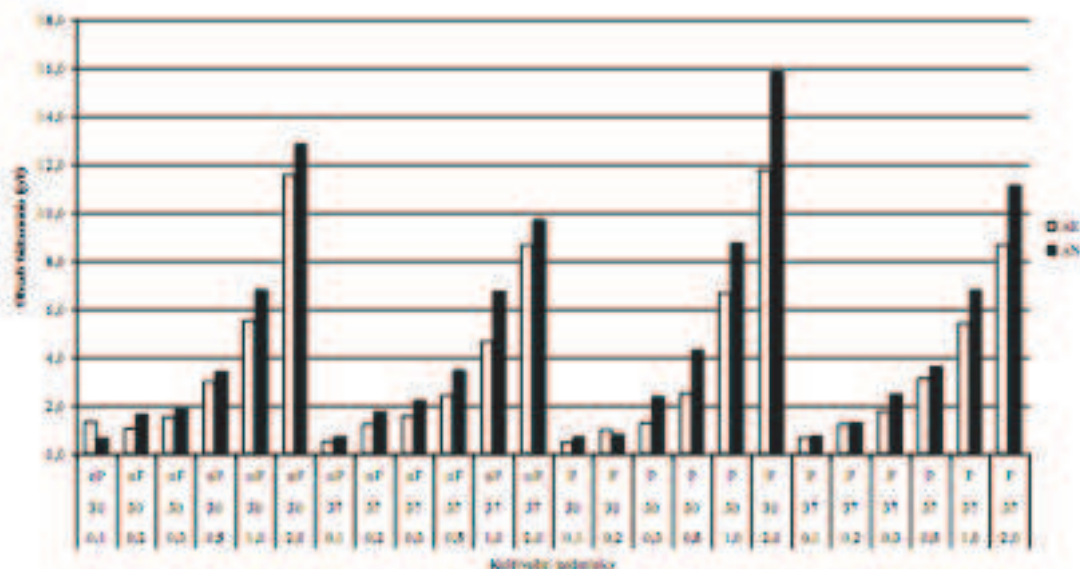
Vliv teploty, pH prostředí, dostupnosti kyslíku, přídavku aminokyseliny v různé koncentraci a pyridoxal-5-fosfátu (Sigma-Aldrich) na produkci histaminu byl testován u kmene *Enterobacter aerogenes* CCM 2531. Kultivace probíhala v masopeptonovém bujónu (MPB; HiMedia) s přídavkem histidinu (Sigma-Aldrich) o příslušné koncentraci (0,1; 0,2; 0,3; 0,5; 1,0 a 2,0 % w/v) a popř. i přídavkem pyridoxalfosfátu (0,005 %w/v) při $30 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ nebo $37 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ v rozmezí 1 až 3 dnů. MPB byl upraven na výsledné pH 6, respektive pH 7. Příslušný bujón o objemu 5 ml byl zaočkován vždy 25 μl suspenze bakterií narostlých přes noc v MPB s přídavkem 0,2 % (w/v) histidinu. Vliv aerobního/anaerobního prostředí na produkci biogenních aminů byl sledován tak, že polovina zkumavek byla kultivována aerobně a druhá anaerobně. Anaerobního prostředí bylo dosaženo zakápnutím kultivačního média sterilním parafinovým olejem (1 ml; Pliiva-Lachema). Odběr vzorků pro analýzu probíhal v časech 24, 48 a 72 hod a to tak, že vždy byly náhodně odebrány od každého kmene a každé úrovně faktoru 2 zkumavky. Celý experiment byl opakován třikrát.

Po inkubaci bakterií byly buňky odstraněny centrifugací ($10000 \times g$; 5 min) a supernatant byl filtrován přes 0,45 μm filtr. Produkce histaminu byla zjišťována pomocí iontově-výměnné chromatografie (IEC; Automatický analyzátor aminokyselin AAA400, Ingos Praha, ČR) v médiu po odstranění buněk a po filtraci podle Buřková et al. (2009). Každý izelát byl analyzován alespoň třikrát. Standard histaminu byl získán ze Sigma-Aldrich.

Výsledky a diskuze

Obsah biogenního amínu histaminu v bujónu po kultivaci *E. aerogenes* CCM 2531 se v čase u testovaných MPB po přídavku histidinu v koncentracích 0,3% (w/v) a vyšších bez ohledu na další sledované faktory postupně zvyšoval. Větší rozdíly byly sledovány mezi 24. a 48. hodinou než mezi 48. a 72. hodinou. Pokud bylo do MPB přidáno menší množství aminokyseliny, nebyly ve většině případů sledovány výraznější rozdíly mezi jednotlivými časovými intervaly odběrů. Tento jev může být způsoben tím, že v případě kultivace při nižších koncentracích aminokyseliny došlo k rychlejšímu nárůstu produkce histaminu a v uvedené časy odběrů se již produkce výrazněji neměnila. Obrázky 1 a 2 znázorňují produkci histaminu po 3 dnech kultivace v závislosti na sledovaných faktorech prostředí.

Kultivační teplota 30 °C a 37 °C neměla významný vliv na produkci histaminu kmenem *E. aerogenes* CCM 2531 (obr. 1 a 2), což může být dáno faktorem, že obě teploty vyhovují optimální růstové teplotě dané bakterie a tím i produkci biogenního aminu.



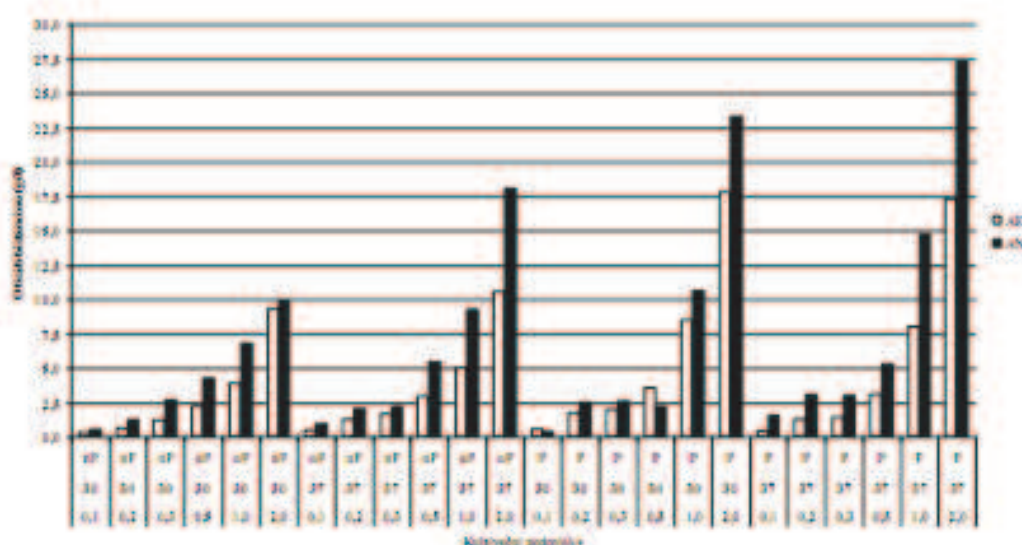
Obr. 1 Produkce histaminu u *E. aerogenes* CCM 2531 po 72 hodinách kultivace při pH=7

AE – aerobní prostředí; AN – anaerobní prostředí; nP – bez přidavku pyridoxalfosfátu; P – s přidavkem pyridoxalfosfátu; 30 a 37 – kultivační teplota ve °C; 0,1 – 2,0 – koncentrace aminokyseliny histidinu.

Z výsledků je rovněž patrné, že produkce histaminu byla nejvíce ovlivněna pH kalivačního prostředí, přičemž vyšší produkce byla zaznamenána při nižším pH, kdy bylo detekováno zhruba dvojnásobné množství biogenního aminu (obr. 1 a 2). Tento jev je v souladu s poznatky jiných autorů (např. Fernández et al., 2007), podle kterých je dekarboxylázová aktivita bakterií vyšší při nižším pH. Dekarboxylázové enzymy mohou být bakteriemi vytvářeny k regulaci vnitrobuněčného pH za účelem jejich přežití a růstu v kyselém prostředí.

Vyšší produkce histaminu byla zpravidla zaznamenána v přítomnosti pyridoxalfosfátu, který působí jako kofaktor dekarboxylázových enzymů (Šhalaby, 1996). Nicméně přítomnost kofaktoru neměla výraznější vliv na produkci histaminu za daných testovaných podmínek.

Z obrázků 1 a 2 je rovněž patrné, že se zvyšující se koncentrací přidávané aminokyseliny, která je substrátem pro sledovaný amin, bylo detekováno vyšší množství histaminu. Z výsledků lze zároveň vypočítat, že mezi obsahem histaminu a koncentrací aminokyseliny histidinu nebyla zjištěna přímá úměrnost, v případě vyšších koncentrací aminokyseliny byla konverze biogenního aminu nižší. Pokud vzájemně množství detekovaného histaminu k množství aminokyseliny v bujónu, zjistíme, že optimální koncentrace aminokyseliny pro produkci biogenního aminu se u *E. aerogenes* CCM 2531 pohybovala v rozmezí 0,1 – 0,3 % (w/v).



Obr. 2 Produkce histaminu u *E. aerogenes* CCM 2531 po 72 hodinách kultivace při pH=6
 AE – aerobní prostředí; AN – anaerobní prostředí; nP – bez přidavku pyridoxalfosfátu; P – s přidavkem pyridoxalfosfátu; 30 a 37 – kultivační teplota ve °C; 0,1 – 2,0 – koncentrace aminokyseliny histidinu.

Dalším faktorem, který byl sledován za účelem ovlivnění produkce histaminu u *E. aerogenes* CCM 2531, bylo aerobní a anaerobní prostředí. Z výsledků (obr. 1 a 2) je patrné, že u většiny testovaných parametrů došlo k vyšší produkci histaminu v prostředí, ve kterém nebyl kyslík dostupný. Tyto výsledky jsou v souladu s dalšími studiemi (např. Buřková et al., 2010), ve kterých se uvádí, že dekarboxylázové enzymy mají větší aktivitu v prostředí bez přístupu kyslíku.

Závěr

Anaerobní prostředí, pH a koncentrace aminokyseliny měly největší vliv na produkci histaminu u *Enterobacter aerogenes* CCM 2531. Vliv teploty a kofaktoru pyridoxalfosfátu již nebyl tak výrazný. Nejvyšší množství histaminu bylo detekováno v případě, že byly tyto enterobakterie kultivovány v MPB s pH 6, v přítomnosti 2,0 % (w/v) histidinu a 0,005 % (w/v) pyridoxalfosfátu při teplotě 37 °C bez přístupu kyslíku.

Poděkování

Práce vznikla za podpory projektu MŠMT: MSM 7088352101.

Literatura

- ALBERTO, M. R. - ARENA, M. E. - MANCA DE NADRA, M. C. 2007. Putrescine production from agmatine by *Lactobacillus hilgardii*: Effect of phenolic compounds. In *Food Control*, roč. 18, 2007, s. 898-903.
- ARENA, M. E. - MANCA DE NADRA, M. C. 2001. Biogenic amine production by *Lactobacillus*. In *Journal of Applied Microbiology*, roč. 90, 2001, s. 158-162.
- BAIXAS-NOGUERAS, S. - BOVER-CID, S. - VECLANA-NOGUÉS, M. T. - VIDAL-CAROU, M. C. 2003. Amino acid-decarboxylase activity in bacteria associated with Mediterranean lake spoilage. In *European Food Research and Technology*, roč. 217, 2003, s. 164-167.
- BOVER-CID, S. - MIGUÉLEZ-ARRIZADO, M. J. - BECKER, B. - HOLZAPFEL, W. H. - VIDAL-CAROU, M. C. 2008. Amino acid decarboxylation by *Lactobacillus curvatus* CTC273 affected by the pH and glucose availability. In *Food Microbiology*, roč. 25, 2008, s. 269-277.

- BUŇKOVÁ, L. - BUŇKA, F. - HLOBILOVÁ, M. - VAŇÁTKOVÁ, Z. - NOVÁKOVÁ, D. - DRÁB, V. 2009. Tyramine production of technological important strains of *Lactobacillus*, *Lactococcus* and *Streptococcus*. In *European Food Research and Technology*, roč. 229, 2009, s. 533-538.
- BUŇKOVÁ, L. - BUŇKA, F. - POLLAKOVÁ, E. - PODEŠVOVÁ, T. - DRÁB, V. - KRÁČMAR, S. 2010. Vliv aerobního/anaerobního prostředí na dekarboxylázovou aktivitu vybraných bakterií mléčného kvašení. In *Potravinářství*, roč. 4(2), 2010, s. 5-7.
- EMBORG, J. - DALGAARD, P. 2008. Modelling the effect of temperature, carbon dioxide, water activity and pH on growth and histamine formation on *Morganella psychrotolerans*. In *International Journal of Food Microbiology*, roč. 128, 2008, s. 226-233.
- FERNÁNDEZ, M. - LINARES, D. M. - RODRÍGUEZ, A. - ALVAREZ, M. A., 2007. Factors affecting tyramine production in *Enterococcus durans* IPLA 655. In *Applied Microbiology and Biotechnology*, roč. 73, 2007, s. 1400-1406.
- GARDINI, F. - MARTUSCELLI, M. - CARUSO, M. C. - GALGANO, F. - CRUDELE, M. A. - FAVATI, F. - GUERZONI, M. E. - SUZZI, G., 2001. Effects of pH, temperature and NaCl concentration on the growth kinetics, proteolytic activity and biogenic amine production of *Enterococcus faecalis*. In *International Journal of Food Microbiology*, roč. 64, 2001, s. 105-117.
- GARDINI, F. - ZACCARELLI, A. - BELLETI, N. - FAUSTINI, F. - CAVAZZA, A. - MARTUSCELLI, M. - MASTROCOLA, D. - SUZZI, G., 2005. Factors influencing biogenic amine production by a strain of *Genococcus oeni* in a model system. In *Food Control*, roč. 16, 2005, s. 609-616.
- GREIF, G. - GREIFOVÁ, M. - DVORAN, J. - KAROVIČOVÁ, J. - BUCHTOVÁ, V. 1998. Štádium rastu a produkcie biogénnych aminov niektorými mikroorganizmami za modelových podmienok. In *Czech Journal of Food Science*, roč. 17, 1998, s. 15-21.
- GREIF, G. - GREIFOVÁ, M. - KAROVIČOVÁ, J., 1997. Tvorba kadaverínu a amoniaku činnosťou niektorých baktérií za modelových podmienok. In *Czech Journal of Food Science*, roč. 16, 1997, s. 53-56.
- GREIF, G. - GREIFOVÁ, M. - KAROVIČOVÁ, J., 2006. Effects of NaCl concentration and initial pH value on biogenic amine formation dynamics by *Enterobacter* spp. bacteria in model conditions. In *Journal of Food and Nutrition Research*, roč. 45, 2006, s. 21-29.
- HALÁSZ, A. - BARÁTH, Á. - SIMON-SARKADI, L. - HOLZAPFEL, W. 1994. Biogenic amines and their production by microorganisms in food. In *Trends in Food Science and Technology*, roč. 5, 1994, s. 42-49.
- KALÁČ, P. - KRAUŠOVÁ, P., 2005. A review of dietary polyamines: Formation, implications for growth and health and occurrence in foods. In *Food Chemistry*, roč. 90, 2005, s. 219-230.
- KALÁČ, P. - KRÍŽEK, M., 2005. Biogénni aminy a polyaminy v potravinách a jejich vliv na lidské zdraví. In *Potravinářská revue*, roč. 2, 2005, s. 40-42.
- MAZZOLI, R. - LAMBERTI, C. - COISSON, J. D. - PURROTTI, M. - ARLORIO, M. - GIUFFRIDA, M. G. - GIUNTA, C. - PESSIONE, E., 2009. Influence of ethanol, malate and arginine on histamine production of *Lactobacillus hilgardii* isolated from Italian red wine. In *Amino Acids*, roč. 36, 2009, s. 81-89.
- PIRCHER, A. - BAUER, F. - PAULSEN, P. 2007. Formation of cadaverine, histamine, putrescine and tyramine by bacteria isolated from meat, fermented sausages and cheeses. In *European Food Research and Technology*, roč. 226, 2007, s. 225-231.
- SANTOS, W. C. - SOUZA, M. R. - CERQUEIRA, M. M. O. P. - GLÓRIA, M. B. A., 2003. Bioactive amines formation in milk by *Lactococcus* in the presence or not of rennet and NaCl at 20 and 32 °C. In *Food Chemistry*, roč. 81, 2003, s. 595-606.
- SILLA SANTOS, M. H., 1996. Biogenic amines: their importance in foods. In *International Journal of Food Microbiology*, roč. 29, 1996, s. 213-231.
- VECIANA-NOGUÉS, M. T. - BOVER-CID, S. - MARINÉ-FONT, A. - VIDAL-CAROU, M. C., 2004. Biogenic amine production by *Morganella morganii* and *Klebsiella oxytoca* in tuna. In *European Food Research and Technology*, roč. 218, 2004, s. 284-288.
- SHALABY, A. R., 1996. Significance of biogenic amines to food safety and human health. In *Food Research International*, roč. 29, 1996, s. 675 - 690.
- VINCI, G. - ANTONELLI, M. L., 2002. Biogenic amines: quality index of freshness in red and white meat. In *Food Control*, roč. 13, 2002, s. 519-524.

Kontaktní adresa

doc. RNDr. Luana Buňková, Ph.D. Ústav technologie tuků, tenzidů a kosmetiky, Fakulta technologická, Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, nám. T.G. Masaryka 275, 762 72 Zlín, Česká republika

☎ 00420 576 031 154

✉ bunkova@ft.utb.cz

