

# **Dekarboxylázová aktivita bakterie *Serratia marcescens* v kyselém prostředí**

Bc. Monika Taťáková

---

Diplomová práce  
2012



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická

---

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická  
Ústav technologie a mikrobiologie potravin  
akademický rok: 2011/2012

# ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Monika TAŽÁKOVÁ**  
Osobní číslo: **T10426**  
Studijní program: **N 2901 Chemie a technologie potravin**  
Studijní obor: **Technologie, hygiena a ekonomika výroby potravin**

Téma práce: **Dekarboxylázová aktivita bakterie *Serratia marcescens* v kyselém prostředí.**

Zásady pro vypracování:

## I. Teoretická část

1. Popsat biogenní aminy a mikroorganismy, které je produkují
2. Charakterizovat faktory ovlivňující růst bakterie *Serratia marcescens* a její produkci biogenních aminů
3. Popsat metody stanovení biogenních aminů

## II. Praktická část

1. Stanovení růstové křivky *Serratia marcescens* v kyselém prostředí
2. Stanovení produkce putrescinu a kadaverinu bakterií *Serratia marcescens* v kyselém prostředí

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

1. VELÍŠEK, J., HAJŠLOVÁ, J. Chemie potravin II. 3. vydání. Tábor: Osis, 2009, 623 s. ISBN 978-80-86659-16-9
2. 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. Gaithersburg: Aspen Publishers, Inc., 2001. s. 119-140. ISBN 0-8342-1843-7
3. KOTSOUMANIS, K., TASSOU, C., NYCHAS, G. J. E. Biogenic amines in foods. In: JUNEJA, V. K., SOFOS, J. N. (ed.). Pathogens and toxins in foods: challenges and interventions. Washington, DC: ASM Press, 2010. s. 248-274. ISBN 978-1-55581-459-5
4. HALÁSZ, A., BARÁTH, A., SIMON-SARKADI, L., HOLZAPFEL, W. Biogenic amines and their production by microorganisms in food. Trends in food science & technology, 1994, 5, s. 42-49

Vedoucí diplomové práce:

**Ing. Zuzana Lazárková, Ph.D.**

Ústav analýzy a chemie potravin

Datum zadání diplomové práce:

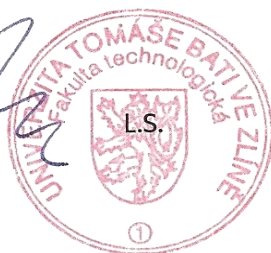
**1. února 2012**

Termín odevzdání diplomové práce:

**2. května 2012**

Ve Zlíně dne 10. února 2012

  
doc. Ing. Roman Čermák, Ph.D.  
*děkan*



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

## PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

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

Ve Zlíně *22. 4. 2012* .....

*Taťáková*  
.....

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

## **ABSTRAKT**

Tato diplomová práce se zabývá sledováním účinků vybraných faktorů na růst a dekarboxylázovou aktivitu bakterie *Serratia marcescens*. V první části jsou obecně popsány biogenní aminy, zejména jejich rozdělení, vznik a výskyt v potravinách. Dále je diplomová práce zaměřena na mikroorganismy produkující biogenní aminy a faktory ovlivňující jejich tvorbu. Poslední oddíl teoretické části je věnován některým metodám užívaným ke stanovení biogenních aminů. Praktická část zahrnuje stanovení růstové křivky *Serratia marcescens* a obsahu dvou biogenních aminů, kadaverinu a putrescinu, v různých podmínkách teploty, pH a NaCl. Biogenní aminy byly stanoveny pomocí vysoce účinné kapalinové chromatografie. Pro růst bakterie *Serratia marcescens*, stejně jako pro produkci biogenních aminů, bylo optimální prostředí s nízkým obsahem soli, vyšším pH a vyšší teplotou.

Klíčová slova:

dekarboxylázová aktivita, *Serratia marcescens*, biogenní aminy, pH, NaCl, teplota, růstová křivka, kadaverin, putrescin

## **ABSTRACT**

This diploma thesis deals with monitoring the effects of selected factors on the growth and decarboxylase activity of the bacteria *Serratia marcescens*. The first part generally describes biogenic amines, particularly their distribution, formation and occurrence in foods. Furthermore, diploma thesis is focused on microorganisms producing biogenic amines and factors affecting their production. The last section of theoretical part is devoted to some methods used to determination of biogenic amines. The practical part includes determination of *Serratia marcescens* growth curve and content of two biogenic amines, cadaverine and putrescine, in various conditions of temperature, pH and NaCl. Biogenic amines were determined by high performance liquid chromatography. Environment with low salt concentration, higher pH and higher temperature was optimal for bacterial growth, as well as for the production of biogenic amines.

### **Keywords:**

decarboxylase activity, *Serratia marcescens*, biogenic amines, pH, NaCl, temperature, growth curve, cadaverine, putrescine

Tímto bych ráda poděkovala vedoucí mé diplomové práce Ing. Zuzaně Lazárkové, Ph.D. za řádné vedení, trpělivost, odbornou pomoc, podnětné připomínky a cenné rady poskytnuté během zpracování této práce. Děkuji také doc. Ing. Františku Buňkovi, Ph.D. a doc. RNDr. Leoně Buňkové, Ph.D. za spolupráci a pomoc při vyhodnocování výsledků praktické části. Dále bych chtěla poděkovat Ing. Ludmile Zálešákové, Ing. Haně Miklíkové a Olze Haukové za ochotu a pomoc v laboratoři.

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



# OBSAH

<b>ÚVOD</b> .....	<b>11</b>
<b>I TEORETICKÁ ČÁST</b> .....	<b>12</b>
<b>1 BIOGENNÍ AMINY</b> .....	<b>13</b>
1.1 ROZDĚLENÍ BIOGENNÍCH AMINŮ .....	14
1.2 VZNIK BIOGENNÍCH AMINŮ.....	16
1.3 VÝSKYT BIOGENNÍCH AMINŮ.....	20
1.3.1 Nefermentované potraviny.....	20
1.3.2 Fermentované potraviny.....	21
1.4 LEGISLATIVA .....	22
<b>2 MIKROORGANIZMY PRODUKUJÍCÍ BIOGENNÍ AMINY</b> .....	<b>24</b>
2.1 BAKTERIE MLÉČNÉHO KVAŠENÍ .....	24
2.1.1 Startovací a probiotické kultury .....	25
2.2 BAKTERIE Z ČELEDI <i>ENTEROBACTERIACEAE</i> .....	27
2.2.1 Rod <i>Serratia</i> .....	29
<b>3 FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ TVORBU BIOGENNÍCH AMINŮ</b> .....	<b>30</b>
3.1 PH PROSTŘEDÍ .....	30
3.2 TEPLOTA .....	31
3.3 PŘÍTOMNOST NaCl.....	32
3.4 OSTATNÍ FAKTORY .....	33
<b>4 METODY STANOVENÍ BIOGENNÍCH AMINŮ</b> .....	<b>34</b>
4.1 CHROMATOGRAFICKÉ METODY .....	34
4.1.1 Tenkovrstvá chromatografie (TLC).....	35
4.1.2 Plynová chromatografie (GC).....	35
4.1.3 Iontově-výměnná chromatografie (IEC) .....	36
4.1.4 Vysoce účinná kapalinová chromatografie (HPLC) .....	36
4.2 DALŠÍ METODY .....	38
<b>II PRAKTICKÁ ČÁST</b> .....	<b>39</b>
<b>5 CÍL PRÁCE</b> .....	<b>40</b>
<b>6 MATERIÁL A METODIKA</b> .....	<b>41</b>
6.1 POUŽITÉ PŘÍSTROJE A CHEMIKÁLIE .....	41
6.1.1 Přístroje .....	41
6.1.2 Chemikálie .....	41
6.2 KULTIVAČNÍ MÉDIA .....	42
6.3 STANOVENÍ RŮSTOVÉ KŘIVKY A OBSAHU BIOGENNÍCH AMINŮ .....	43
6.3.1 Příprava bakteriální suspenze .....	43
6.3.2 Příprava médií a kultivace .....	43
6.3.3 Optimalizace sledovaných faktorů.....	44

6.3.4	Stanovení počtu kolonií a měření optické hustoty .....	44
6.3.5	Stanovení obsahu biogenních aminů .....	45
6.3.6	Statistické vyhodnocení výsledků .....	46
<b>7</b>	<b>VÝSLEDKY A DISKUZE .....</b>	<b>47</b>
7.1	STANOVENÍ RŮSTOVÉ KŘIVKY .....	47
7.1.1	Stanovení růstové křivky – 10 °C .....	48
7.1.2	Stanovení růstové křivky – 20 °C .....	50
7.1.3	Stanovení růstové křivky – 37 °C .....	52
7.1.4	Dílčí diskuze .....	55
7.2	STANOVENÍ PRODUKCE BIOGENNÍCH AMINŮ .....	56
7.2.1	Stanovení obsahu kadaverinu – 10 °C .....	57
7.2.2	Stanovení obsahu kadaverinu – 20 °C .....	59
7.2.3	Stanovení obsahu kadaverinu – 37 °C .....	61
7.2.4	Dílčí diskuze .....	63
7.2.5	Stanovení obsahu putrescinu – 10 °C .....	64
7.2.6	Stanovení obsahu putrescinu – 20 °C .....	67
7.2.7	Stanovení obsahu putrescinu – 37 °C .....	69
7.2.8	Dílčí diskuze .....	71
7.3	YIELD FAKTOR.....	72
	<b>ZÁVĚR .....</b>	<b>76</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....</b>	<b>78</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK .....</b>	<b>88</b>
	<b>SEZNAM OBRÁZKŮ .....</b>	<b>89</b>
	<b>SEZNAM TABULEK.....</b>	<b>90</b>
	<b>SEZNAM PŘÍLOH.....</b>	<b>91</b>

## ÚVOD

Bezpečnost potravin může být ohrožována různými faktory biologického, fyzikálního nebo chemického původu. V poslední době patří mezi často sledované kontaminanty potravin i biogenní aminy [1].

Biogenní aminy vznikají působením bakteriálních dekarboxyláz na volné aminokyseliny. Jedná se o nízkomolekulární bazické dusíkaté látky, které mohou vykonávat v organismu člověka významné fyziologické funkce. Slouží například jako prekurzory některých hormonů, nukleových kyselin nebo proteinů. Jejich nadbytečné množství však může vést k alimentárním intoxikacím. Proto je s ohledem na prevenci v potravinářství nutná včasná detekce bakterií, které tyto sloučeniny produkují. Biogenní aminy mohou tedy v potravinách fungovat jako indikátory procesu kažení [1, 2].

Hlavní podmínkou pro vznik a produkci biogenních aminů je tedy přítomnost aminokyselin v daném substrátu, přítomnost mikroorganismů s dekarboxylázovou aktivitou a vhodné podmínky pro růst a množení mikroorganismů. Tvorba těchto aminů bakteriemi může být ovlivněna také řadou vnějších faktorů, působících zejména na kinetiku dekarboxylázových reakcí. Mezi vnější faktory ovlivňující tvorbu biogenních aminů u bakterií patří hlavně teplota a pH prostředí, aero-/anaerobióza, dostupnost zdrojů uhlíku (např. glukózy), přítomnost růstových faktorů, růstová fáze buněk, koncentrace NaCl aj. [3].

Mikroorganismy, které produkují dekarboxylázy, se mohou v produktech vyskytovat přirozeně nebo mohou být zaneseny před technologickým zpracováním, v jeho průběhu anebo po ukončení výroby. Dekarboxylázy byly zjištěny u bakterií z čeledi *Enterobacteriaceae*, kam se řadí i bakterie *Serratia marcescens* [4].

Podstatou této práce je právě sledování dekarboxylázové aktivity bakterie *Serratia Marcescens* v různých podmínkách prostředí.

## **I. TEORETICKÁ ČÁST**

## 1 BIOGENNÍ AMINY

Biogenní aminy jsou bazické dusíkaté sloučeniny vznikající především dekarboxylací aminokyselin nebo aminací a transaminací aldehydů a ketonů. Jsou to nízkomolekulární organické báze, které vykazují biologickou aktivitu. Jedná se o produkty běžné metabolické aktivity zvířat, rostlin i mikroorganismů [5, 6].

Navzdory tomu, že jsou biogenní aminy pro lidský organizmus nepostradatelné, ve zvýšených koncentracích jsou toxické a z potravinářského hlediska je tak můžeme zařadit mezi endogenní cizorodé látky. Mezi nejdůležitější biogenní aminy patří histamin, tyramin, putrescin a kadaverin. Tyto biogenní aminy vznikají především v průběhu technologického procesu výroby potravin [7].

Histamin je nejvíce prostudovaným biogenním aminem. V lidském těle působí jako lokální tkáňový hormon, ovlivňuje krevní tlak, sekreci žaludeční šťávy a účastní se při anafylaktickém šoku a alergických reakcích. Na druhou stranu je označován za nejčastějšího původce potravinových intoxikací. Hlavní pozornost se soustřeďuje na obsah histaminu v rybích produktech [8, 9, 10].

Tyramin je biogenní amin odvozený od tyrozinu. Slouží jako prekurzor dopaminu, lokální tkáňový hormon, ovlivňuje krevní tlak a kontrakce hladkého svalstva. Obvykle pro jednotlivce nepředstavuje riziko, není-li přijímán v nadměrném množství. Negativně může působit při podávání léků inhibujících monoaminoxidázu. Obsah tyraminu se sleduje zejména ve fermentovaných potravinách a sýrech [9, 11, 12].

Kadaverin a putrescin jsou považovány za indikátory nežádoucích přeměn bílkovin. Zahříváním putrescinu může vznikat pyrolidin a z kadaverinu piperidin, z nichž se vytváří působením tepla *N*-nitrozopyrolidin a *N*-nitrozopiperidin. Putrescin a kadaverin jsou proto posuzované jako potenciální karcinogeny. Bylo také zjištěno, že kadaverin a putrescin umocňují toxické účinky histaminu a tyraminu, neboť inhibují enzymy, které tyto aminy detoxikují. V organizmu se však mohou podílet na stabilizaci biologicky významných makromolekul (nukleových kyselin), subcelulárních struktur (ribozomů) a na stimulaci buněčného dělení [6, 12, 13, 14].

Normální příjem biogenních aminů je ve střevním traktu savců metabolizován velmi výkonným detoxikačním systémem založeným na aktivitě příslušných enzymů. Hlavní úlohu zde sehrávají enzymy monoaminoxidáza (MAO, EC 1.4.3.4) a diaminoxidáza

(DAO, EC 1.4.3.6). Ty působí ve střevním epitelu a tak se do krevního oběhu dostávají až oxidační produkty biogenních aminů. Koncové metabolity jsou také rychle vylučovány močí. Avšak v případě nadměrného příjmu biogenních aminů, alergií či užití inhibitorů může být detoxikační systém narušen a biogenní aminy se tak mohou hromadit v těle [15, 16, 17].

Rizikovou skupinou jsou například lidé s poruchami gastrointestinálního traktu, neboť činnost aminooxidáz v jejich střevech je obvykle nižší než u zdravých jedinců. Také léky s inhibičními účinky na MAO a DAO, jako jsou antihistaminika a psychofarmaka, je nutné brát v úvahu, protože mění metabolismus biogenních aminů, způsobují jejich nahromadění, což může vést k vážným zdravotním potížím [12, 17].

Detoxikační kapacita je značně individuální, v dětství je omezená a snižuje se s rostoucím věkem [18].

## 1.1 Rozdělení biogenních aminů

Biogenní aminy můžeme dělit podle dvou základních kritérií, a to podle chemické struktury nebo dle počtu jejich aminových skupin.

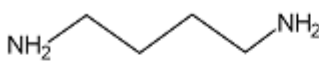
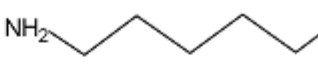
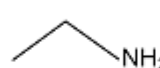

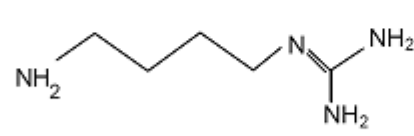
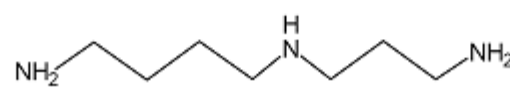
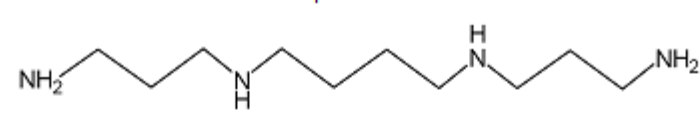
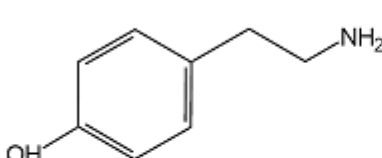
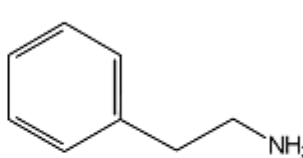
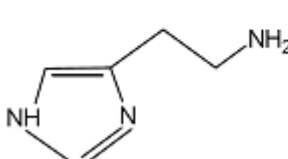
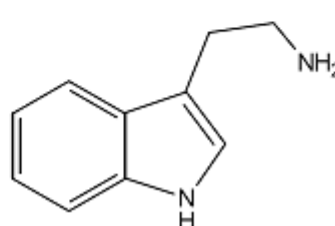
Podle chemické struktury můžeme biogenní aminy rozdělit na:

- alifatické (putrescin, kadaverin, spermin a spermidin)
- aromatické (tyramin, fenyletylamin)
- heterocyklické (histamin, tryptamin)

Dle počtu aminových skupin rozlišujeme:

- monoaminy (tyramin, fenyletylamin)
- diaminy (putrescin, kadaverin)
- polyaminy (spermin, spermidin a příp. agmatin)

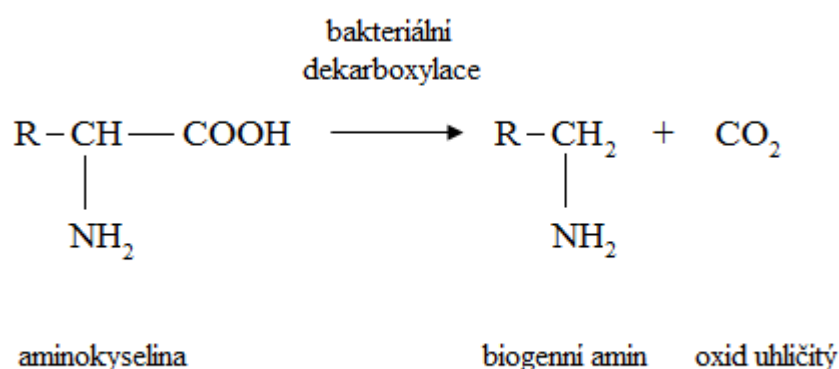
Pro zjednodušení se někdy mezi polyaminy řadí i diaminy, podobně jako se do skupiny aromatických aminů zjednodušeně řadí heterocyklické aminy [6, 19]. Chemická struktura některých biogenních aminů je zaznamenána na Obr. 1.

Alifatické aminy	
<p>Putrescin</p> 	<p>Kadaverin</p> 
<p>Etylamin</p> 	<p>Metylamin</p> 
<p>Agmatin</p> 	
<p>Spermidin</p> 	
<p>Spermin</p> 	
Aromatické aminy	
<p>Tyramin</p> 	<p>Fenyletylamin</p> 
Heterocyklické aminy	
<p>Histamin</p> 	<p>Tryptamin</p> 

Obr. 1. Chemická struktura vybraných biogenních aminů [20]

## 1.2 Vznik biogenních aminů

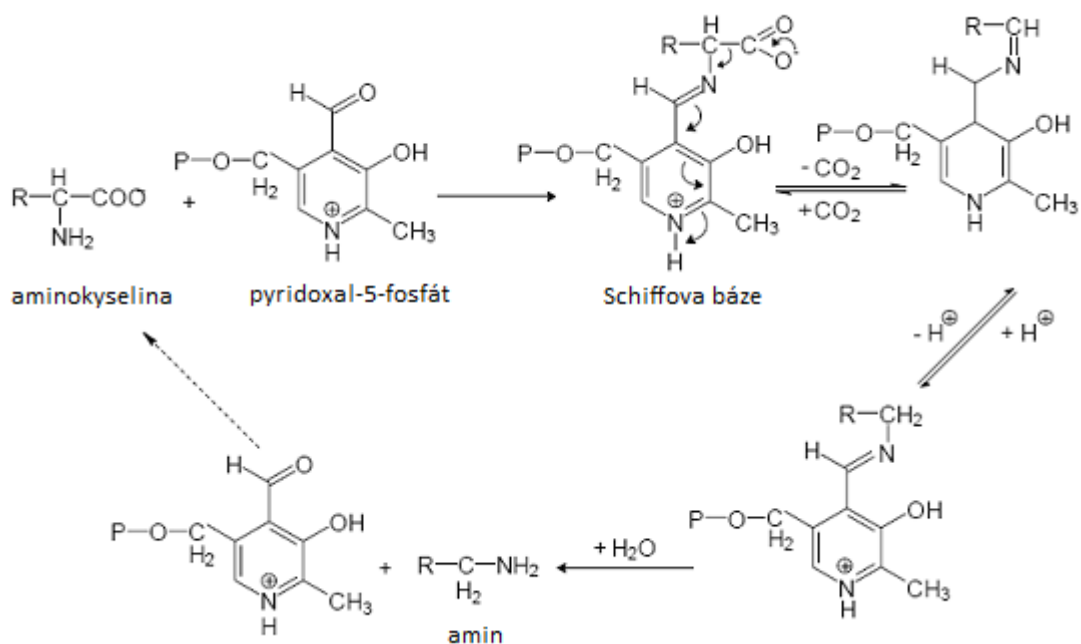
Z hlediska potravin a výživy je rozhodující cestou vzniku biogenních aminů dekarboxylace přirozených aminokyselin působením enzymů některých bakterií. Dekarboxylace je proces, při němž se odbourává karboxylová skupina  $-\text{COOH}$  a vytváří se oxid uhličitý (viz Obr. 2). Účinným enzymem je potom dekarboxyláza obsahující jako kofaktor pyridoxalfosfát. Touto cestou vznikají zejména histamin, tyramin, fenyletylamin a kadaverin [9, 21].



Obr. 2. Schéma vzniku biogenního aminu z aminokyseliny [21]

Podrobnější průběh dekarboxylace je zaznamenán na Obr. 3. Z aminokyseliny a pyridoxalfosfátu se vytváří Schiffova báze. Kladně nabitě atomy dusíku pyridinového kruhu přitahují elektrony, čímž se vytváří příznivý mezomerní stav. Tento stav může nastat jen v případě, že se na  $\alpha$ -C atomu aminokyseliny vyloučí substituent jako kation. Může to být zbytek R (jen ve speciálních případech například u serinu) anebo karboxylová skupina (dekarboxyláza). Mezomerní mezistav se potom stabilizuje prostřednictvím adice jednoho protonu na  $\alpha$ -C a hydrolýzou Schiffovy báze na primární amin [12].



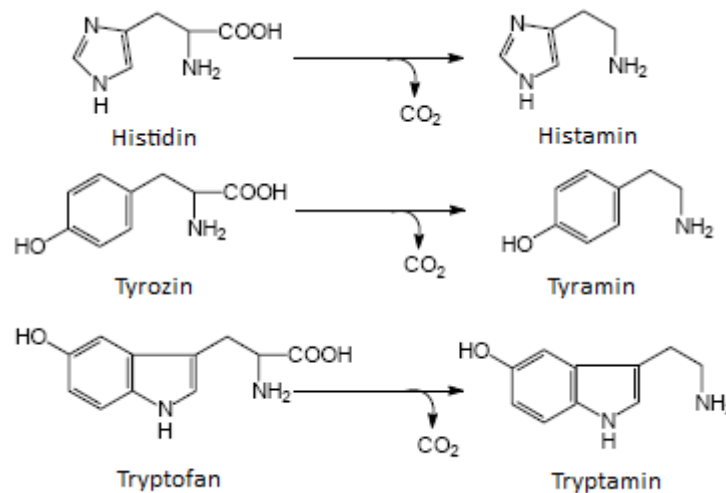


Obr. 3. Dekarboxylace aminokyselin [12]

Při dekarboxylaci se konfigurace nemění. Dekarboxylázy jsou většinou specifické na L-formu aminokyseliny. Možná je však ještě jiná cesta dekarboxylace, kdy namísto pyridoxal-5-fosfátu působí pyruvoylový zbytek vázaný na amino skupinu fenylalaninového bočního řetězce enzymu. Mechanismus dekarboxylace přitom zůstává stejný [12].

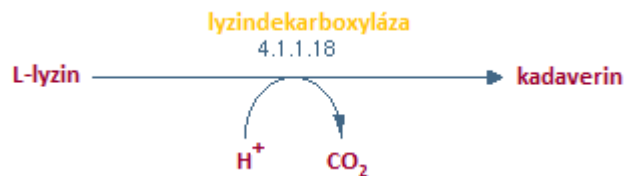
Mimo dekarboxylaci mohou biogenní aminy vznikat i dalším způsobem, a to z aminokyselin a karbonylových sloučenin působením transamináz. Při jejich transformaci na další biologicky aktivní produkty se mohou uplatňovat některé oxygenázy a metyltransferázy. Jména většiny biogenních aminů odpovídají názvům svých původních aminokyselin [9, 17].

Histamin vzniká z histidinu působením histidindekarboxylázy. Dekarboxylací fenylalaninu vzniká 2-fenyletylamin, z tyrozinu činností tyrozindekarboxylázy tyramin a dekarboxylací tryptofanu tryptofandekarboxylázou vzniká tryptamin [9]. Tvorbu některých biogenních aminů znázorňuje Obr. 4.



Obr. 4. Tvorba histaminu, tyraminu a tryptaminu [12]

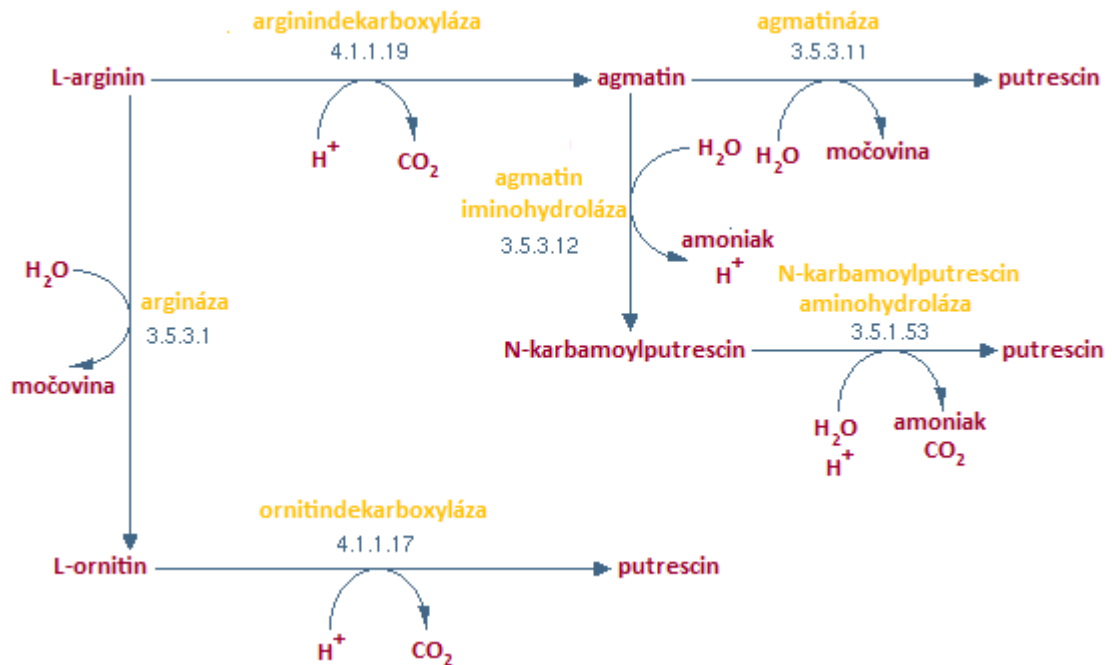
Z lyzinu vzniká jako produkt dekarboxylace lyzindekarboxylázou kadaverin [9] (viz Obr. 5).



Obr. 5. Tvorba kadaverinu [22]

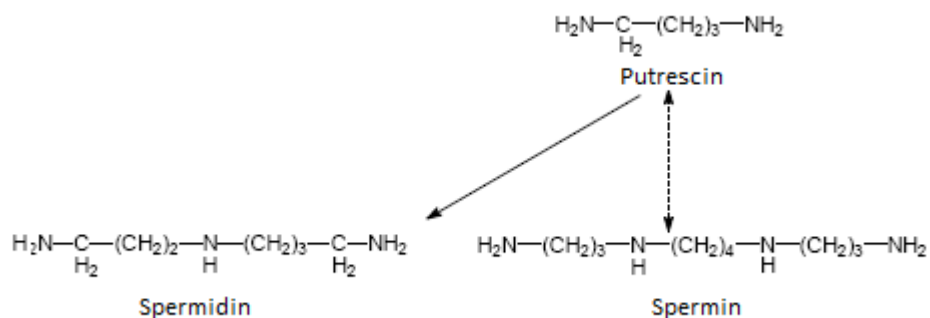
Putrescin může vznikat dvěma odlišnými dráhami vycházejícími z argininu. Může být tvořen buď přímo z ornitinu (vzniklého z argininu) ornitindekarboxylázou, anebo nepřímo z argininu přes meziprodukt pomocí arginindekarboxylázy. Tvorba putrescinu z ornitinu probíhá buďto anabolicky, kdy vzniká putrescin jako polyamin či prekurzor spermidinu, nebo katabolicky, kdy slouží jako zdroj uhlíku a dusíku. Existují také dvě varianty dekarboxylace argininu. V obou případech je nejprve arginin dekarboxylován pomocí arginindekarboxylázy na agmatin. Následně může být agmatin převeden pomocí enzymu agmatinázy buď přímo na putrescin, anebo může být hydrolyzován enzymem agmatiniminohydrolázou na N-karbomoylputrescin a amoniak. Putrescin nakonec vzniká

odstraněním ureidové skupiny z N-karbomoylputrescinu [23, 24, 25]. Všechny způsoby vzniku putrescinu popisuje Obr. 6.



Obr. 6. Tvorba putrescinu [23, 24, 25, 26]

Z putrescinu může dále vznikat metylací S-adenozylmetioninem spermidin a spermin [9] (viz Obr. 7).



Obr. 7. Tvorba spermidinu a sperminu [12]

Hlavním předpokladem pro tvorbu a vznik biogenních aminů za účasti mikroorganismů je dostupnost volných aminokyselin, přítomnost dekarboxyláza-pozitivních mikroorganismů a podmínky, které umožňují růst bakterií, dekarboxylázovou syntézu a aktivitu [5].

### 1.3 Výskyt biogenních aminů

Výskyt biogenních aminů lze očekávat prakticky ve všech potravinách, které obsahují bílkoviny a volné aminokyseliny, a které zároveň splňují podmínky mikrobiální a biochemické aktivity. Celková množství různých aminů závisí do značné míry na povaze potravin a přítomných mikroorganismů. V současné době jsou biogenní aminy přítomny v celé řadě potravinářských výrobků, včetně výrobků z ryb, masných výrobků, mléčných výrobků, dále mohou být biogenní aminy obsaženy v pivu, vínu, zelenině, ovoci, ořechách a čokoládě [27].

Obsahy biogenních aminů v potravině určitého druhu mohou kolísat ve velmi širokých mezích. Někdy může rozdíl činit až dva řády. Proto je téměř nemožné vytvořit a poskytnout věrohodné tabulkové údaje. I přesto se již podařilo nashromáždit dostatek informací o obsazích biogenních aminů, v menší míře i polyaminů, a poznatků o faktorech ovlivňujících jejich tvorbu v potravinách. Běžné obsahy jednotlivých aminů v potravinách se pohybují v řádu jednotek až desítek miligramů v kilogramu. Hodnoty ve stovkách  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  jsou považovány již za vysoké až velmi vysoké [18].

Jelikož jsou účinnými producenty biogenních aminů mléčné bakterie, dělí se potraviny zpravidla na fermentované, připravované některým z kvasných pochodů, a nefermentované, v nichž biogenní aminy vznikají především činností hnilobných bakterií [18, 21].

#### 1.3.1 Nefermentované potraviny

V nefermentovaných potravinách se přítomnost biogenních aminů nad určitou mez považuje za známku nežádoucí mikrobiální aktivity, tudíž se obsah některých aminů může využívat jako indikátor mikrobiálního kažení [5].

Ve skupině nefermentovaných potravin jsou nejzávažnějším problémem makrelovité (skombroidní) ryby, zejména makrely a tuňáci, ale také sled'ovité ryby, sledi, sardinky a ančovičky. Ve svalovině těchto ryb je poměrně velké množství volného, v bílkovinách

nevázaného histidinu. V případě, že ryby nejsou po vylovení účinně a rychle zchlazeny a vhodně skladovány, pomnoží se mikroflóra, která poté přítomný histidin dekarboxyluje na histamin. Obsah histaminu může být stovky až tisíce miligramů v kilogramu svaloviny. Následkem toho může docházet k onemocnění zvanému histaminóza neboli skombrotoxikóza [18].

Vyšší množství aminů bylo zjištěno také v pomerančovém džusu (noradrenalin, tryptamin), rajčatech (tyramin, tryptamin, histamin), banánech (tyramin, noradrenalin, tryptamin a serotonin), švestkách (tyramin, noradrenalin) a listovém špenátu (histamin) [10].

Fenyletylamin je přirozenou složkou kakaových bobů a vyskytuje se i v některých druzích hub. Histamin a kadaverin byly zaznamenány v karagenu mořských řas [5].

Zvýšený obsah polyaminů sperminu a spermidinu je v luštěninách, kvěťáku a brokolici.

Pečlivě ošetřené maso a nefermentované masné výrobky nepředstavují zdravotní riziko svým obsahem biogenních aminů. Stejně tak je tomu i u nefermentovaných mléčných výrobků, ovoce, zeleniny a výrobků z nich. Potraviny s vyšším obsahem bílkovin, které však byly v průběhu zpracování či skladování špatně ošetřeny, mohou obsahovat riziková množství zejména histaminu, a to již v době, kdy ještě sensorické příznaky kažení nejsou patrné [18].

### 1.3.2 Fermentované potraviny

Ze skupiny fermentovaných potravin jsou nejzávažnější sýry. Po rybách jsou druhou nejčastější potravinou spojovanou s otravami histaminem. Nejvyšší obsah těchto aminů je u sýrů vyráběných z nepasterovaného mléka za špatných hygienických podmínek, u sýrů zrajících pod mazem (tvarůžky, romadúr), poloměkých a plísňových sýrů, zatímco ve tvrdých sýrech holandského typu je obsah biogenních aminů relativně nízký [18, 27].

Ve fermentovaných masných výrobcích mohou biogenní aminy vznikat v důsledku mikrobiální činnosti související s fermentací anebo se mohou nacházet v produktech z nekvalitních surovin prostřednictvím mikrobiální kontaminace. Při správném výrobním procesu, kde se uplatňují startovací kultury, které nevykazují žádnou dekarboxylázovou aktivitu, vznikají jen velmi malá množství biogenních aminů. Tepelně neupravené a zrající maso obsahuje zpravidla vyšší množství histaminu a tyraminu, než maso a masné výrobky vařené. Vyšší koncentrace histaminu a tyraminu byla zjištěna také u fermentovaných

klobás. Biogenní aminy se mohou tvořit i po ukončení procesu fermentace, v průběhu skladování [27].

Mezi potraviny s vyšším obsahem biogenních aminů se řadí i spontánně kvašené kysané zelí, ve kterém se sleduje především obsah tyraminu. S dobou skladování obsah tyraminu stoupá. Obvykle se biogenní aminy nacházejí také ve fermentovaných výrobcích ze sóje, jako jsou omáčky, tempeh a miso. Výjimkou nejsou ani některé druhy nápojů. [18].

Víno a pivo jsou nápoje vyráběné alkoholickým kvašením. Pokud však dojde k jejich kontaminaci mléčnými bakteriemi, může obsah aminů dosáhnout hodnot, které je nutné brát v úvahu. Obsahy biogenních aminů v obou těchto nápojích jsou sice nižší, ale zato může být konzumováno značné množství v krátkém časovém úseku. Alkohol navíc potlačuje činnost detoxikačních střevních enzymů. Obsahy biogenních aminů nejsou ovlivňovány tím, zda se jedná o pivo běžné či nízkoalkoholické. Nejvyšší množství aminů bylo zjištěno v nápojích vyráběných ve starých pivovarech, tradiční technologií, kde se nedaří zajistit mléčné bakterie. Ve víně dochází k tvorbě biogenních aminů zejména ve fázi po hlavním kvašení, kdy působením mléčných bakterií probíhá prokvašování kyseliny jablečné v kyselinu mléčnou [18, 21].

#### 1.4 Legislativa

Nejvyšší přípustná množství biogenních aminů v potravinách jsou stanovena v jednotlivých zemích různě. Většinou se týkají potravin, které jsou pro danou zemi nějakým způsobem významné. Příkladem můžou být mořské ryby a výrobky z nich v přímořských státech anebo víno v oblastech s jeho největší spotřebou [18].

Obecně je legislativa týkající se výskytu biogenních aminů v potravinách málo specifická. Nařízení komise (ES) č. 2073/2005 stanovuje pouze jasnou hranici pro obsah histaminu v rybích produktech, zatímco horní limity pro biogenní aminy v ostatních potravinách byly prozatím jen navrhnuty či doporučeny. Orientačně se uvádí, že obsah histaminu by neměl v jednom kilogramu potraviny překročit hranici 100 mg a v jednom litru alkoholického nápoje by neměl být vyšší než 2 mg. Některé evropské země, jako je Německo, Holandsko, Finsko, Belgie, Francie, Švýcarsko a Rakousko, mají zavedeny maximální limity pro obsah histaminu ve víně. Tyto limity se pohybují v rozmezí 2 – 10 mg.l<sup>-1</sup>. Daná legislativa jim tak

umožňuje odmítnout vína, u nichž byl zákonný limit překročen. To může způsobovat problémy zejména maloobchodníkům, kteří se snaží do těchto zemí vína vyvážet [19, 28].

Do roku 2004 zahrnovala česká legislativa limity pro některé biogenní aminy v sýrech, rybách, pivu a vínu. V současnosti je dle vyhlášky Ministerstva zdravotnictví (MZd) č. 305/2004 Sb., kterou se stanoví druhy kontaminujících a toxikologicky významných látek a jejich přípustné množství v potravinách, platný pouze hygienický limit pro histamin v rybách a výrobcích z ryb ve výši  $100 \text{ mg.kg}^{-1}$ . Tento limit může být ve dvou vzorcích z devíti odebraných z jedné šarže překročen až do hodnoty  $200 \text{ mg.kg}^{-1}$ . Česká legislativa je tak v souladu s legislativou evropskou [15, 18, 29].

Zatím v žádné zemi nenařizuje legislativa výrobcům potravin deklarovat obsah biogenních aminů na obale, i když by takový údaj někteří jedinci určitě ocenili. Výrobcům by však tato povinnost způsobila značné obtíže hlavně z důvodu velkého kolísání obsahu aminů v rámci konkrétního druhu potravin. Možným řešením by potom mohly být jednoduché, rychlé a levné metody vyvinuté pro stanovení obsahu biogenních aminů v potravinách [18].

## 2 MIKROORGANIZMY PRODUKUJÍCÍ BIOGENNÍ AMINY

Produkce biogenních aminů obvykle vyplývá z přítomnosti bakterií, které jsou schopny v daném prostředí dekarboxylovat příslušné aminokyseliny. Mikrobiální enzymy dekarboxylázy mohou být přítomny v některých druzích bakterií, které se běžně v potravinách vyskytují a jejichž důsledkem zde biogenní aminy vznikají. Je třeba však poznamenat, že ne všechny kmeny těchto druhů jsou na tvorbu biogenních aminů pozitivní. Některé kmeny mají široké spektrum a mohou tak dekarboxylovat mnoho aminokyselin, zatímco jiné mají dekarboxylázovou aktivitu omezenou. Lze tak říci, že produkce biogenních aminů je vlastnost specifická spíše pro určité kmeny bakterií než vlastnost typická pro daný druh a různé kmeny téhož druhu se mohou v produkci biogenních aminů lišit. Schopnost dekarboxylace byla zaznamenána u mnohých zástupců rodů *Bacillus*, *Pseudomonas* a *Photobacterium*, stejně tak jako u čeledí *Enterobacteriaceae* a *Micrococcaceae*. Mimoto se schopností dekarboxylace vyznačuje i řada druhů bakterií mléčného kvašení. V Tab. 1 jsou uvedeny některé bakterie produkující biogenní aminy. Tvorbu biogenních aminů však nelze přisoudit pouze bakteriím, ale i kvasinkám a plísním [17, 30, 31].

### 2.1 Bakterie mléčného kvašení

Bakterie mléčného kvašení jsou heterogenní mikroorganismy, které zkvašují sacharidy (např. glukózu) převážně na kyselinu mléčnou. Jedná se především o grampozitivní, nesporulující, acidotolerantní bakterie, které rostou za mikroaerofilních až striktně anaerobních podmínek. Je jich celá řada, mezi nejvýznamnější rody patří *Aerococcus*, *Bifidobacterium*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* a *Weissella* [32, 33, 34].

Po biochemické stránce můžeme bakterie mléčného kvašení rozdělovat do dvou základních skupin, na homofermentativní a heterofermentativní. Homofermentativní bakterie, kterými jsou např. *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Lactococcus* a některé laktobacily, produkují primárně jako konečný produkt kyselinu mléčnou, zatímco heterofermentativní bakterie, jako jsou *Weissella* a *Leuconostoc*, produkují jako konečné produkty ekvimolární množství kyseliny mléčné, oxidu uhličitého a etanolu. Bakterie mléčného kvašení se řadí obvykle do skupiny mezofilních mikroorganismů. Některé z nich však dokážou růst i při teplotách



nižších jak 5 °C a vyšších jak 45 °C. Stejně tak většina kmenů roste při optimálním pH 4 až 4,5, ale existují i výjimky, které jsou aktivní spíše při pH 9,6 anebo naopak při pH 3,2. Kmeny jsou většinou slabě proteolytické a lipolytické a vyžadují pro svůj růst aminokyseliny, purinové a pyrimidinové báze a vitaminy skupiny B [35].

Mléčné bakterie se primárně využívají pro výrobu kysaných potravinových výrobků, podílejí se na tvorbě textury, chuti, vůně i nutriční hodnoty. Přirozeně se vyskytují v různém prostředí, a tak může fermentace probíhat například v mléce a mléčných výrobcích, mase, zelenině a cereáliích [32].

Produkce biogenních aminů byla popsána u řady mikroorganismů, které jsou používány při výrobě fermentovaných potravin jako startovací či probiotické kultury [36].

Tab. 1. Produkce biogenních aminů některými bakteriemi [12]

Potraviny	Bakterie	Produkovávané aminy
ryby	<i>Morganella morganii</i> , <i>Klebsiella pneumonia</i> , <i>Hafnia alvei</i> , <i>Proteus mirabilis</i> , <i>P. vulgaris</i> , <i>Clostridium perfringens</i> , <i>Enterobacter aerogenes</i> , <i>Bacillus spp.</i> , <i>Staphylococcus xyloso</i>	histamin, tyramin, kadaverin, putrescin, agmatin, spemidin, spermin
sýry	<i>Lactobacillus buchneri</i> , <i>L. bulgaricus</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>Streptococcus faecium</i> , <i>S. mitis</i> , <i>Bacillus macerans</i> , <i>Propionibacterium spp.</i>	histamin, kadaverin, putrescin, tyramin, fenyletylamin, tryptamin
maso a masné výrobky	rody <i>Pediococcus</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>Micrococcus</i> , čeled' <i>Enterobacteriaceae</i>	histamin, kadaverin, putrescin, tyramin, fenyletylamin, tryptamin
fermentovaná zelenina	<i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides</i> , <i>Pediococcus spp.</i>	histamin, kadaverin, putrescin, tyramin, tryptamin

### 2.1.1 Startovací a probiotické kultury

Startovací kultury jsou směsi převážně bakterií mléčného kvašení (*Lactobacillus*, *Pediococcus*) a kataláza-pozitivních koků (*Staphylococcus*, *Micrococcus*), namíchané tak,

aby výrobek dosahoval požadovaných finálních vlastností. Mohou ovlivňovat nejen kvalitu výrobku (barvu, texturu, údržnost), ale i nezávadnost a daný výrobní postup. V současné době je velmi populární používat při výrobě fermentovaných potravin také probiotické kultury. Ty mohou fungovat jako kultury startovací a současně pozitivně působit na lidské zdraví, neboť příznivě ovlivňují složení a rovnováhu střevní mikroflóry. Přesto, že by kultury těchto bakterií neměly být toxické ani patogenní, bohužel někteří zástupci patří mezi potenciální producenty biogenních aminů [36, 37].

Jako producenti histaminu jsou označovány například bakterie *Lactobacillus helveticus* a *Streptococcus lactis* používané jako startovací kultury v mlékárenském průmyslu. Stejná dekarboxylázová aktivita byla prokázána i u *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus plantarum*, *Streptococcus faecium*, *Streptococcus mitis* a u některých zástupců rodu *Propionibacterium*. *Streptococcus faecalis* a *Enterococcus faecalis* jsou často spojovány s tvorbou tyraminu v sýrech a mléčných produktech. Ze švýcarského sýru byla izolována bakterie produkující histamin *Lactobacillus buchneri* a pět velmi podobných kmenů této bakterii, co se týče produkce histaminu, bylo izolováno také ze sýru Gouda. Ve fermentovaných sójových potravinách typu miso byla zjištěna produkce tyraminu prostřednictvím *Enterococcus faecium* a *Lactobacillus bulgaricus* a produkce histaminu je zde spojována s *Lactobacillus* spp. a *Lactobacillus sanfrancisco* [27, 30].

Vysoké koncentrace volných aminokyselin v mase a masných výrobcích umožňují v důsledku mikrobiálních rozkladných změn tvorbu velkého množství aminů. Za tuto tvorbu jsou zodpovědné především mléčné bakterie *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus buchnerii*, *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus carnis*, *Lactobacillus divergens* a *Lactobacillus hilgardii*. Kromě těchto se na tvorbě histaminu v mase a masných výrobcích podílejí *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus* a někteří zástupci rodu *Leuconostoc*. Některé druhy enterokoků, zejména *Enterococcus faecalis*, mají schopnost v těchto produktech tvořit tyramin [17, 27].

Také při výrobě vína se účastní tvorby biogenních aminů některé bakterie mléčného kvašení, zejména rody *Pediococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* a *Oenococcus*. Z laktobacilů je to nejčastěji *Lactobacillus hilgardii*, *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus brevis* a *Lactobacillus mali*. Hlavními producenty histaminu a tyraminu ve víně jsou také *Leuconostoc mesenteroides* a *Oenococcus oeni*. V pivu bývají častými producenty histaminu především některé druhy laktobacilů a pediokoků [17, 19].

## 2.2 Bakterie z čeledi *Enterobacteriaceae*

Zástupci z čeledi *Enterobacteriaceae* zaujímají v současné mikrobiologii ústřední pozice. Vzhledem k jejich rozdílným vlastnostem, historické, zdravotní a hospodářské roli jsou velmi významné zejména v oblasti lékařství, biochemie, molekulární biologie, potravinářské mikrobiologie i technologie. Některé z nich patří mezi nejvíce prostudované a sledované mikroorganismy vůbec, neboť se jedná také o lidské patogeny (ovlivňují zdraví lidí i zvířat). Mohou sloužit jako indikátory hygieny, sanitace a bezpečnosti potravin, jsou častými původci kažení potravin [38, 39, 40].

Čeď *Enterobacteriaceae* představuje skupinu gramnegativních, nesporulujících, fakultativně anaerobních a chemoorganotrofních mikroorganismů. Buňky tvoří většinou rovné tyčinky o velikosti 0,1 až 1,5  $\mu\text{m}$  v průměru, některé rody vytváří i delší vláknité formy. Mohou být nepohyblivé i pohyblivé, pohyb je zprostředkováván pomocí peritrichálních bičíků. Mají schopnost okyselovat glukózu, ale i řadu jiných cukrů a cukerných alkoholů. Někdy může být proces okyselování doprovázen tvorbou plynu. Ve většině případů jsou bakterie oxidáza negativní a kataláza pozitivní, převážně také redukuje nitráty [39, 41].

Bakterie z čeledi *Enterobacteriaceae* jsou velmi rozšířené v přírodě a životním prostředí. Nacházejí se v půdě, vodě, ovoci, zelenině, zrnech, kvetoucích rostlinách a stromech. Mnoho druhů je zodpovědných za onemocnění rostlin, což může mít za následek významné ekonomické ztráty. Dále se také mohou vyskytovat v živočišných organizmech, a to od cizopasných červů a hmyzu až po člověka. Existují určité odlišnosti v jejich ekologii, rozmezí hostitele, či patogenitě (pro člověka, zvířata, hmyz a rostliny). Řada druhů primárně napadá intestinální trakt a způsobuje průjmová onemocnění, jiné jsou oportunně patogenní. Mimo střevní infekce způsobují bakteriémie, meningitidy, infekce ran, močových cest, respiračního traktu, včetně nozokomiálních infekcí (vznikajících při pobytu v nemocnici). Jsou tedy významné ze zdravotního i ekonomického hlediska [39, 41, 42, 43].

Optimální teplota růstu pro většinu těchto bakterií je kolem 37 °C. Některé druhy však rostou lépe i při teplotách nižších a dokonce mohou být při této nižší teplotě i více metabolicky aktivní. Jejich generační doba je velmi krátká [41].

Zatímco některé mikroorganismy dokážou tolerovat vysoké teploty nad 50 °C, bakterie ze skupiny *Enterobacteriaceae* nejsou příliš tepelně odolné a měly by být usmrceny běžnými pasteračními teplotami. Z tohoto důvodu se využívají jako indikátorové mikroorganismy u vařených či jinak tepelně opracovaných potravin. Nicméně tepelná odolnost může být ovlivňována do určité míry také různými faktory, zejména vodní aktivitou anebo působením nízkých teplot při předchozí expozici. Optimální vodní aktivita se u enterobakterií pohybuje v rozmezí hodnot 0,94 až 0,99, avšak v případě zmrazení potravin mohou bakterie přežít relativně dlouhou dobu i při minimálních hodnotách aktivity vody. Co se týče kyselosti prostředí, tak pro většinu druhů je optimální pH v rozmezí 4,4 až 9,0, ale najdou se i takové, kterým vyhovuje spíše kyseléjší prostředí (pH pod 4). Takovéto druhy jsou většinou zodpovědné za kažení fermentovaných nebo jiných technologicky kyselých potravin [39].

V současné době čeleď *Enterobacteriaceae* zahrnuje nejméně 34 rodů, 149 druhů a 21 poddruhů. Významné jsou především rody *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Hafnia*, *Klebsiella*, *Kluyvera*, *Morganella*, *Plesiomonas*, *Proteus*, *Salmonella*, *Serratia*, *Schigella*, *Yersinia* a další [39, 41].

Některé druhy bakterií z čeledi *Enterobacteriaceae*, zejména *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris* a *Serratia marcescens*, jsou především jako kontaminující mikroflóra zodpovědné za tvorbu kadaverinu, putrescinu a histaminu v potravinách. Přestože jsou tyto bakterie termolabilní, vyskytují se v mlékárenských výrobcích, nejčastěji v důsledku nedostatečného pasteračního režimu nebo špatné hygieny a sanitace v závodě. Byl dokázaný zvýšený obsah kadaverinu a putrescinu v sýrech vyrobených z mléka kontaminovaného těmito bakteriemi. Při skladování čerstvé zeleniny a čerstvých salátů byl zjištěn také zvýšený obsah putrescinu, přičemž se předpokládá souvislost mezi přítomností populace *Enterobacteriaceae*, která tvoří 90 % přítomné mikroflóry, a produkcí putrescinu [4, 44].

Činností enterobakterií byl zaznamenán také zvýšený obsah kadaverinu a putrescinu v mase a masných výrobcích. Například z klobás byly izolovány *Enterobacter cloacae* a *Serratia* jako hlavní producenti těchto aminů. Enterobakterie jako *Morganella morganii* (*Proteus morganii*), *Klebsiella pneumoniae* a *Hafnia alvei* jsou značnými producenty histaminu v rybích produktech [5, 30, 45].

### 2.2.1 Rod *Serratia*

Jedná se o gramnegativní rovné tyčinky, obvykle se pohybující pomocí peritrichálních bičíků. Rostou převážně za fakultativně anaerobních podmínek a vyznačují se chemoorganotrofní výživou. Některé druhy mají schopnost vytvářet červený pigment. Okyselují glukózu i další sacharidy, což je často doprovázeno tvorbou plynu. Jsou oxidáza negativní a kataláza pozitivní. Serácie se mohou vyskytovat v humánním klinickém materiálu, půdě, na povrchu rostlin a v prostředí obecně, dále ve střevním traktu hlodavců a hmyzu. Jsou potencionálními patogeny pro člověka. *Serratia marcescens* je považována za častého původce závažných infekcí, zejména exxtraintestinálních a nozokomiálních. Mohou způsobovat také mastitidy u krav i různé infekce zvířat [40, 41].

Bakterie obvykle dobře rostou při teplotách 20 až 37 °C, v rozmezí pH 5 až 9 a v přítomnosti 0 až 4 % NaCl. Někdy může být růst potlačen, pokud je pH nižší než 4,5 nebo pokud teplota překročí 45 °C [46, 47].

Typickým zástupcem tohoto rodu je právě *Serratia marcescens*, dalšími druhy jsou například *Serratia ficaria*, *Serratia fonticola*, *Serratia grimesii*, *Serratia liquefaciens*, *Serratia odorifera*, *Serratia plymuthica*, *Serratia proteamaculans* a *Serratia rubidaea* [39, 42].

Serácie jsou významnými producenty zejména kadaverinu a putrescinu v potravinách. Mohou být součástí mikroflóry masa a masných výrobků, mléka a mléčných výrobků, zeleniny a zeleninových salátů. V neposlední řadě jsou zodpovědné také za tvorbu histaminu v rybách a rybích produktech [39, 40, 42, 45].

### 3 FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ TVORBU BIOGENNÍCH AMINŮ

Produkce biogenních aminů bakteriemi může být ovlivňována několika vnějšími faktory, které působí zejména na kinetiku dekarboxylázových reakcí, růst mikroorganismů a jejich schopnost dekarboxylace. Jedná se převážně o fyzikálně chemické parametry, z nichž významné jsou především:

- pH prostředí,
- teplota,
- koncentrace NaCl, aj. [48, 49, 50].

Stručný přehled několika základních faktorů ovlivňujících dekarboxylázovou aktivitu mikroorganismů znázorňuje Tab. 2.

*Tab. 2 Faktory ovlivňující dekarboxylázovou aktivitu [12]*

Faktory	Vliv na dekarboxylázovou aktivitu
<b>pH</b>	dekarboxylázová aktivita je intenzivnější v kyselém prostředí (pH 4 až 5,5)
<b>teplota</b>	20 až 37 °C je optimální teplota pro růst většiny mikroorganismů s dekarboxylázovou aktivitou, nízké teploty zastavují jejich růst
<b>přítomnost NaCl</b>	aktivuje tyrozindekarboxylázu, inhibuje histidindekarboxylázu
<b>obsah glukózy</b>	0,5 až 2 % je optimální koncentrace pro růst mikroorganismů s dekarboxylázovou aktivitou, 3 % inhibují syntézu dekarboxyláz
<b>přítomnost NaNO<sub>2</sub></b>	aktivuje tyrozindekarboxylázu
<b>množství přítomných aminů</b>	histamin, agmatin a putrescin inhibují histidindekarboxylázu

#### 3.1 pH prostředí

Hodnota pH je jedním z klíčových faktorů ovlivňujících dekarboxylázovou aktivitu a tvorbu biogenních aminů v potravinách. V daném prostředí může kyselost působit

zpravidla dvěma mechanismy. Buďto může být v důsledku vysoké kyselosti prostředí inhibován růst přítomných mikroorganismů, anebo naopak mohou bakterie v takovém prostředí produkovat větší množství dekarboxyláz, jakožto výsledek působení jejich ochranného systému vůči překyselení [17, 51].

Obecně lze říci, že dekarboxylázová aktivita mikroorganismů je intenzivnější spíše v kyselém prostředí s pH optimem v rozmezí 4 až 5,5. Pro každou potravinu může být však toto optimum jiné. Bylo například prokázáno, že největší množství tyraminu v makrelách se nachází právě při nízkém pH, vyšší koncentrace histaminu ve víně byla zjištěna při pH nad 3,77 a pH 5,0 bylo demonstrováno jako optimální hodnota pro syntézu tyraminu v sýrech. Také v mase tuňáka pruhovaného byla stanovena největší produkce histaminu při pH 4,0 a zvýšením pH na hodnotu 6,0 bylo zjištěno, že až 70 % z předchozí aktivity zde zůstává zachováno [5, 52].

I samotné pH prostředí může být různě upravováno. V potravinářství se využívá například glukono- $\delta$ -lakton. Jeho přidáním dochází v potravinách k poklesu pH, což má za následek omezení růstu mikroorganismů (zejména enterokoků a enterobakterií) a tedy i snížení produkce biogenních aminů (zejména histaminu, putrescinu a tyraminu). Tento způsob se uplatňuje hlavně u klobás a dalších uzenářských výrobků. Platí tedy, že prudké snížení pH zabraňuje růstu amino-pozitivních mikroorganismů, obzvláště mikroorganismů z čeledi *Enterobacteriaceae*.

Tvorba biogenních aminů tak závisí spíše na množství a růstu dekarboxylujících bakterií než na růstových podmínkách samotných [5, 45].

### 3.2 Teplota

Teplota má výrazný vliv na tvorbu biogenních aminů v potravinách. Nejedna studie uvádí, že obsah biogenních aminů závisí na době a teplotě skladování. Obecně platí, že s rostoucí teplotou a dobou skladování produkce biogenních aminů stoupá. Vyšší teplota zpravidla umocňuje proteolytické a dekarboxylační reakce, což se projeví zvýšenou koncentrací aminů. Naopak při nízkých teplotách je v důsledku potlačení mikrobiálního růstu a snížení enzymové aktivity kumulace biogenních aminů v potravinech minimální. Mimoto je důležité brát v úvahu i teplotu působící na potraviny při jejich zpracování, která se může na tvorbě aminů taktéž významně podílet [17, 51, 52].

Optimální teplota pro tvorbu biogenních aminů mezofilními bakteriemi se pohybuje obvykle v rozmezí 20 až 37 °C, zatímco při teplotách nižších jak 5 °C anebo vyšších jak 40 °C produkce biogenních aminů klesá. Při 15 °C mohou mikrobiální dekarboxylázy zůstat aktivní, i přesto, že se téměř všechna populace dostává do stacionární fáze růstu anebo zaniká. Některé psychrotrofní bakterie se mohou aktivně podílet na tvorbě biogenních aminů i při velmi nízkých teplotách, obvykle nepřekračujících 5 °C. Například bakterie *Morganella psychrotolerans* je schopná růst a produkovat toxické koncentrace histaminu i při teplotách do 2 °C. To je častým problémem obzvláště při skladování chlazených či mrazených potravin, zejména ryb. Tvorba histaminu, kadaverinu a putrescinu byla zaznamenána například u pstruha duhového, tuňáka a mořské štiky. Jedná se zpravidla o chlazené čerstvé ryby uložené v ledu [50, 51, 52, 53].

Koncentrace biogenních aminů není výrazně ovlivňována vařením. Většina z nich je tepelně stabilních, s výjimkou sperminu, jehož obsah v průběhu tepelného opracování klesá [27].

### 3.3 Přítomnost NaCl

Chlorid sodný hraje důležitou roli v průběhu mikrobiálního růstu a ovlivňuje činnost aminokyselinových dekarboxyláz, podílejících se na tvorbě biogenních aminů. Jeho účinek může být jak stimulační, tak inhibiční, což závisí především na specifitě mikroorganismů vyskytujících se v daném prostředí. Přítomnost chloridu sodného zpravidla aktivuje tyrozindekarboxylázu a inhibuje histidindekarboxylázu [16, 50, 51].

Rozdílná množství vody a soli v potravinech a jejich vzájemný poměr mohou významně ovlivňovat rozmnožování mikroorganismů. Sůl brání produkci biogenních aminů tím, že snižuje vodní aktivitu. Mikroorganismy poté nemají dostatečné množství volné vody potřebné ke svému přežití. Vysoká koncentrace NaCl může také vést k postupnému narušení samotných dekarboxyláz [45, 54, 55].

Ve většině případů platí, že vysoká koncentrace soli potlačuje tvorbu biogenních aminů. Uvádí se například, že koncentrace 3,5 až 5,5 % NaCl je pro syntézu histaminu inhibiční. Na druhou stranu ale existují i takové kmeny halofilních mikroorganismů, u nichž chlorid sodný dekarboxylázovou aktivitu zesiluje [17, 45, 50].



### 3.4 Ostatní faktory

Přítomnost zkvasitelných sacharidů, například D-glukózy, obecně zvyšuje dekarboxylázovou činnost a růst bakterií. Jako optimální se jeví koncentrace 0,5 až 2,0 % glukózy, zatímco při hodnotách vyšších jak 3 % je enzymová aktivita mikroorganismů inhibována [16].

Dostupnost kyslíku má také významný vliv na syntézu biogenních aminů. Každému mikroorganismu vyhovují jiné podmínky pro růst a stejně tak i pro tvorbu biogenních aminů. Fakultativně anaerobní mikroorganismy produkují menší množství aminů za anaerobních podmínek než za podmínek aerobních. Mezi další faktory patří i redoxní potenciál. Bylo zjištěno, že snížení redoxního potenciálu v médiu stimuluje produkci histaminu [5, 27].

Decarboxylázová aktivita mikroorganismů může být potlačena i v důsledku nahromadění daného aminu v prostředí [5].

Pochopení těchto mechanismů je nezbytné pro zamezení vzniku biogenních aminů. Výrobci potravin by proto měli všechny tyto faktory brát v úvahu a podle nich optimalizovat výrobu a podmínky skladování [5, 10].

## 4 METODY STANOVENÍ BIOGENNÍCH AMINŮ

Detekce biogenních aminů je důležitá vzhledem k jejich potencionální toxicitě, pro ověřování výrobních procesů potravin a v neposlední řadě také z toho důvodu, že mohou sloužit jako ukazatele kvality samotných surovin i hotových výrobků. Studie výskytu biogenních aminů, stejně tak jako kontrola jejich limitů, by nebyly možné bez použití podpůrných analytických metod [30, 51].

Pro stanovení biogenních aminů v potravinách bylo vyvinuto několik různých technik. Nejčastěji používané jsou chromatografické metody zahrnující mimo jiné tenkovrstvou chromatografii (TLC), plynovou chromatografii (GC), iontově-výměnnou chromatografii (IEC) a vysoce účinnou kapalinovou chromatografii (HPLC) [6, 56, 57]. Dále se mohou uplatňovat elektromigrační metody jako je kapilární elektroforéza (CE) a enzymatické metody včetně imunologické analýzy ELISA (imunoanalýza s enzymem vázaným na imunosorbent). Pro detekci bakterií produkujících biogenní aminy se stále častěji využívají i metody molekulární biologie, zejména polymerázová řetězová reakce (PCR) [31, 52, 58, 59].

Z analytického hlediska není stanovení biogenních aminů v potravinách vůbec jednoduché. Rozdílná chemická struktura, smíšené prostředí, přítomnost potenciálně rušivých sloučenin a výskyt několika biogenních aminů současně většinou v nízkých koncentracích jsou hlavními problémy při prováděné analýze. Proto se obvykle před samotnou separací provádí ještě extrakce aminů ze vzorku vhodným činidlem a jejich následné dočištění. Pro tyto účely se nejčastěji používají kyseliny chlorovodíková, trichloroctová a chloristá, dále metylalkohol, petroleter a jiná organická rozpouštědla [8, 12, 17, 56, 60].

### 4.1 Chromatografické metody

Chromatografie je obecně separační metoda, při které se oddělují složky obsažené ve vzorku na základě rychlosti jejich pohybu. Vzorek se nanáší mezi dvě fáze, přičemž jedna je nepohyblivá (stacionární fáze) a přes ni se pohybuje druhá, která se proto nazývá fáze mobilní. Pohybem mobilní fáze je pak vzorek touto soustavou unášen. Složky, které se vážou ochotněji ke stacionární fázi než k fázi mobilní, se při pohybu zdržují více než ty, které se ke stacionární fázi poutají hůře. Tím dojde k postupné separaci složek.

Chromatografických metod je velké množství, pro stanovení biogenních aminů se využívají některé z nich [61, 62].

#### 4.1.1 Tenkovrstvá chromatografie (TLC)

TLC je pravděpodobně jedna z prvních a zároveň nejjednodušších metod používaných pro stanovení biogenních aminů. Vzorek se nanáší na tenkou vrstvu, kterou se nechá vzlínat mobilní fáze. Hlavní výhodou této metody je to, že nevyžaduje speciální a drahá zařízení, není tedy nákladná na laboratorní vybavení. Na druhou stranu je známo, že TLC metody jsou většinou časově náročné a získané výsledky mají jen semikvantitativní (orientační) charakter. Také z tohoto důvodu je hlavním zájmem analytiků dané metody neustále zlepšovat. V současnosti již například existuje i rychlá kvantitativní TLC metoda pro stanovení biogenních aminů v tekutém médiu. Úprava zde spočívá ve vynechání kroku extrakce. Pro vyhodnocení je nezbytný pouze fotoaparát a UV transiluminátor. U této metody doposud nebyly zjištěny falešně pozitivní výsledky [17, 20, 30, 61].

V případě klasické TLC se většinou po extrakci vzorku provádí derivatizace biogenních aminů prostřednictvím činidla danzylchloridu. Stanovení je obvykle ukončeno densitometrickým vyhodnocením [16, 52].

#### 4.1.2 Plynová chromatografie (GC)

V plynové chromatografii se vzorek dávkuje do proudu plynu. Ten jej dále unáší kolonou, ve které se složky následně separují. Může se používat kolona kapilární, která je pro separaci biogenních aminů vhodnější, anebo náplňová. Mobilní fáze se poté nazývá nosný plyn. [16, 61].

Využití GC pro analýzu biogenních aminů není příliš časté. Pro detekci těkavých aminů se tato metoda uplatňovala spíše v minulosti. Biogenní aminy jsou stanoveny ve formě derivátů pomocí vodivostních či plamenových ionizačních detektorů [16, 20].

Často se plynová chromatografie používá v kombinaci s hmotnostní spektrometrií jako tzv. GC-MS. Jedná se o velmi citlivou, přesnou a rychlou metodu, která jako první umožňuje stanovení diaminů, polyaminů a aromatických aminů současně. Tato analýza byla provedena např. u hroznové šťávy a vína. Doposud byly metody GC použity například ještě

pro stanovení kadaverinu, putrescinu a histaminu v mase a konzervovaných rybách [20, 63].

#### 4.1.3 Iontově-výměnná chromatografie (IEC)

Asi nejjednodušší metodou pro stanovení aminů v potravinách je iontově-výměnná chromatografie s použitím automatického analyzátoru aminokyselin [52].

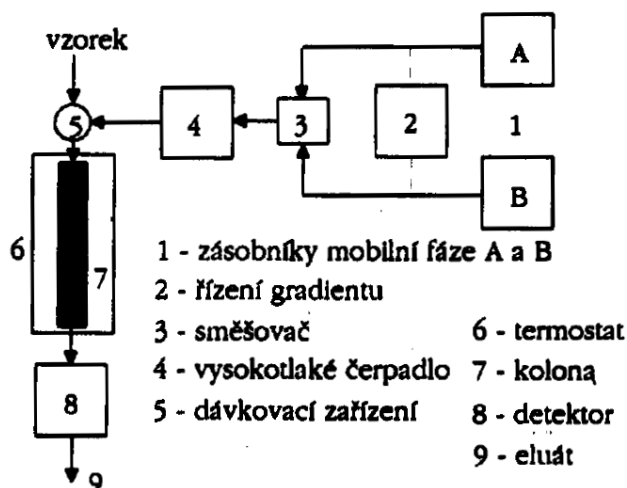
Separční proces je založen na elektrostatické interakci a difúzi látek. Stacionární fází je zde měnič iontů. V podstatě se jedná o makromolekulární matici nesoucí vhodné funkční skupiny kyselé či zásadité povahy. Každá z těchto skupin je pevně vázaným ionem, na který je iontovou vazbou připojen protiion s opačným nábojem. V průběhu separace je tento protiion zaměněn za stejně nabitý ion separované složky. Dochází tak ke zpětné záměně přebytkem ionů z mobilní fáze. Ve funkci mobilní fáze se mohou uplatňovat roztoky solí anebo pufrů [61, 64, 65].

Připravené vzorky jsou obvykle automaticky nastříknuty do analyzátoru aminokyselin. Biogenní aminy jsou poté separovány na koloně naplněné iontoměničem za účasti vhodných pufrů. Často se používají pufrů s obsahem citronanu sodného či draselného. Detekce většinou probíhá po post-kolonové derivatizaci s ninhydridem nebo *o*-ftalaldehydem (OPA) pomocí spektrofotometrického detektoru [6, 66, 67].

Hlavní výhodou IEC metody spočívá v jednoduché přípravě a stanovení velkého počtu vzorků s dostatečnou citlivostí a přesností [68].

#### 4.1.4 Vysoce účinná kapalinová chromatografie (HPLC)

HPLC je v současnosti nejvíce používanou metodou pro stanovení biogenních aminů v potravinách. Základem této vysokotlaké chromatografie je klasické kolonové provedení, kdy je skleněná trubice plněna zrnitým sorbentem. Na horní vrstvu náplně se dávkuje malé množství vzorku a následně se přidává mobilní kapalná fáze. Při postupu kolonou se složky vzorku od sebe oddělují a v různých intervalech opouštějí spodní část kolony. K účinné separaci je nutné použít dostatečně malá zrníčka sorbentu. Ta kladou prostupující kapalině značný odpor, a proto je nutné pracovat při vysokém tlaku [60, 61]. Schéma kapalinového chromatografu ztvárňuje Obr. 8.



Obr. 8. Schéma kapalinového chromatografu [61]

Před samotnou detekcí biologicky aktivních aminů je zapotřebí pro zvýšení citlivosti provést chemickou derivatizaci. Při HPLC se využívá pre-kolonová anebo po-kolonová derivatizace. Na pre-kolonovou derivatizaci se nejčastěji používají činidla jako je benzoylchlorid, danzylchlorid, 9-fluorenylmetylchloroformát, fluorescein a dabsylchlorid. Na po-kolonovou derivatizaci se používají ninhydrin a *o*-ftalaldehyd (OPA) [8, 56, 69].

Největší uplatnění jako derivatizační činidlo má danzylchlorid. Danzylderiváty se dají po HPLC separaci detekovat pomocí UV/VIS detektoru, popřípadě také fluorimetricky. Dabsylchlorid je schopen reagovat s primárními i sekundárními aminoskupinami a jeho deriváty jsou stabilní i při pokojové teplotě. OPA reaguje pouze s primárními aminoskupinami, výsledkem čehož jsou intenzivně fluoreskující produkty. Před aplikací benzoylchloridu je nutné vzorek alkalizovat. Benzoylderiváty jsou potom velmi stabilní a při UV detekci vysoce citlivé [8].

Metoda HPLC se využívá ke stanovení biogenních aminů u mnoha různých potravin. Dobrých výsledků bylo opakovaně dosaženo při sledování obsahu putrescinu, kadaverinu, histaminu a tyraminu v rybách a rybích produktech. Mimoto se HPLC uplatnila například při sledování biogenních aminů v majonéze, sýru, salámu, víně, mase a sójových produktech [8, 52].

Vysokotlaká chromatografie je citlivá a všestranná metoda. Poskytuje současně vysoké rozlišení a nízké detekční limity. Také úprava vzorku je relativně jednoduchá. Nicméně má

i své nevýhody, kterými jsou příliš drahé vybavení a časově náročná příprava a separace vzorků. Pro neustálé zlepšování bylo vyvinuto několik různých modifikací. Příkladem může být tzv. reverzní HPLC (RP-HPLC neboli reversed-phase HPLC) [20, 56, 59, 70].

## 4.2 Další metody

Do skupiny metod používaných pro analýzu biogenních aminů se řadí i kapilární elektroforéza. V posledních letech se hojně využívá, hlavně díky své vysoké citlivosti, jednoduchosti a spolehlivosti, je nenákladná. Dokáže pojmout velký počet vzorků v krátkém časovém intervalu, což je její hlavní výhodou. K separaci dochází na základě rozdílné migrační rychlosti jednotlivých látek v elektrickém poli. Proces probíhá v kapiláře (nejčastěji křemenné). V případě použití vhodného pufru zde mohou být aromatické a heterocyklické biogenní aminy separovány bez derivatizace. Ke stanovení lze použít laserem indukovanou, konduktometrickou, pulzní amperometrickou či nepřímou UV detekci [16, 17, 71].

Jiný přístup nabízí enzymatické a imuno-enzymatické metody. Ty jsou založeny na specifické vazebné reakci mezi antigenem a protilátkou. Při stanovení se využívají enzymy aminooxidázy, jejichž působením na biogenní aminy vzniká jako barevný reakční produkt peroxid vodíku. Produkce peroxidu může být následně detekována amperometrickými, chemiluminiscenčními a spektrofotometrickými metodami [8, 59, 72]. Enzymatické analýzy se vyznačují svou rychlostí a jednoduchostí. Nejsou náročné na přístrojové vybavení a dokonce je lze použít i ve formě testovacích proužků. Nejvíce se uplatňují při sledování histaminu. Zvláště oblíbená je imunologická metoda ELISA [16, 17, 52].

Prostřednictvím PCR lze s využitím specifických primerů rychle a včas zachytit bakterie nesoucí geny zodpovědné za produkci dekarboxyláz. Molekulární metody tak umožňují odhalit potenciální riziko vzniku biogenních aminů ještě před jejich samotnou produkcí [31, 73].

## **II. PRAKTICKÁ ČÁST**

## 5 CÍL PRÁCE

Cílem diplomové práce bylo zjistit, jak může teplota, kyselost prostředí a obsah soli v prostředí ovlivňovat růst a dekarboxylázovou aktivitu bakterie *Serratia marcescens*.

K hlubšímu proniknutí do této problematiky bylo nutné v teoretické části popsat biogenní aminy, zejména jejich rozdělení, vznik a výskyt v potravinách, dále mikroorganismy, které je produkují a metody používané k jejich stanovení. V neposlední řadě bylo třeba charakterizovat základní faktory ovlivňující růst bakterie i produkci biogenních aminů.

Pro naplnění výše uvedeného cíle bylo zapotřebí v praktické části stanovit růstové křivky *Serratia marcescens* v různých podmínkách prostředí, stejně jako produkci kadaverinu a putrescinu. Z poznatků v teoretické části a zjištěných výsledků bylo nutné vyvodit patřičné závěry.



## 6 MATERIÁL A METODIKA

### 6.1 Použité přístroje a chemikálie

#### 6.1.1 Přístroje

Centrifuga MIKRO 200 R (Hettich Zentrifugen, Německo)

pH tester Spear Eutech s pevnou vpichovou elektrodou (Eutech Instruments, Nizozemsko)

Spektrofotometr Libra S6 s diodovým polem (Biochrom, UK)

Autokláv Varioklav H+P 135S (H+P Labortechnik AG, Německo)

Kapalinový chromatogram HPLC (LabAlliance/Agilent Technologies/MicroSolv Technologies)

Temperační komora (Baumatic, Česká republika)

Chladnička RBI 41 208 (Gorenje, Slovinsko)

Váhy Kern 440-47W (KERN & Sohn GmbH, Německo)

Analytické váhy Adam AFA 210 LC (Schoeller instruments, Česká republika)

Biologický termostat (Laboratorní přístroje Praha, Česká republika)

Třepačka Vortex (Heidolph, Reax top, Německo)

#### 6.1.2 Chemikálie

Lyzin, arginin, ornitin (Sigma-Aldrich)

NaCl (Lach-Ner)

HCl 1 mol.l<sup>-1</sup> (Lachema), NaOH 1 mol.l<sup>-1</sup> (Ing. Petr Lukeš)

HClO<sub>4</sub> 0,6 mol.l<sup>-1</sup> (Ing. Petr Lukeš)

Kyselina boritá (Lach-Ner)

## 6.2 Kultivační média

### Masopeptonový bujón (MPB)

- masový výtazek (HiMedia) ..... 3,0 g
- pepton (HiMedia) ..... 5,0 g
- NaCl (Lach-Ner) ..... 3,0 g
- destilovaná H<sub>2</sub>O ..... 1000 ml

Složky byly naváženy a rozpuštěny v odpovídajícím množství destilované vody. Mimoto byla živná půda MPB obohacena o přídavek 0,2 % lyzinu, argininu a ornitinu a NaCl v koncentracích 0, 1, 3, 4, 5 a 6 %. Následně byl bujón vysterilován v autoklávu při 121 °C po dobu 15 minut.

### Dekarboxylázové médium (DM)

- pepton (HiMedia) ..... 5,0 g
- kvasničný extrakt (HiMedia) ..... 3,0 g
- arginin (Sigma-Aldrich) ..... 2,0 g (c = 0,2 %)
- lyzin (Sigma-Aldrich) ..... 2,0 g (c = 0,2 %)
- ornitin.2HCl (Sigma-Aldrich) ..... 3,1 g (c = 0,2 %, přepočteno na čistý ornitin)
- destilovaná H<sub>2</sub>O ..... 1000 ml

Navážené složky DM byly rozpuštěny v destilované vodě. Médium bylo poté obohaceno přídávkem NaCl. Sterilizace byla provedena v autoklávu při 121 °C po dobu 15 minut.

### Masopeptonový agar (MPA)

- hovězí výtazek (HiMedia) ..... 3,0 g
- pepton (HiMedia) ..... 5,0 g
- agar ..... 15,0 g
- NaCl (Lach-Ner) ..... 5,0 g
- destilovaná H<sub>2</sub>O ..... 1000 ml

Výše uvedené složky byly naváženy a rozpuštěny v 1000 ml destilované vody. Takto připravený agar byl sterilován při teplotě 121 °C po dobu 15 minut a ještě za tepla naplněn do sterilních Petriho misek. Po ztuhnutí byl použit jako tuhé médium pro kultivaci bakterie *Serratia marcescens*.

## 6.3 Stanovení růstové křivky a obsahu biogenních aminů

### 6.3.1 Příprava bakteriální suspenze

Do zkumavky s MPB byla zaočkována 1 kolonie bakterie *Serratia marcescens* CCM 303, která byla předem připravená na pevné půdě. Zkumavka byla umístěna do termostatu a kultivována při 37 °C po dobu cca 24 hodin. Po uplynutí této doby bylo 100 µl bakteriální suspenze zaočkováno do dalších zkumavek s MPB a opět kultivováno za stejných podmínek. Takto připravená suspenze byla použita jako vybužovací médium pro další stanovení.

### 6.3.2 Příprava médií a kultivace

V rámci sledování účinků vybraných faktorů bylo nutné upravit kultivační půdu MPB o přídavek aminokyselin a NaCl. Dále bylo použitím 1 mol.l<sup>-1</sup> HCl, resp. NaOH upraveno pH bujónu na 4, 5 a 6. Přesná složení a množství jsou uvedena v kapitole 6.2.

Cílem bylo vytvořit všechny možné kombinace pH a NaCl, což je celkem 18 kombinací (0, 1, 3, 4, 5, 6 % NaCl x pH 4, 5, 6). Takto připravené médium bylo rozpipetováno do zkumavek a vysterilováno. Jednotlivé sady zkumavek byly zaočkovány připravenou kulturou z bujónu a kultivovány při 10 °C (v chladicím boxu), 20 °C (v chladicím boxu) a 37 °C (v termostatu). Intervaly odběrů byly následující:

- 10 °C: 24 h, 48 h, 72 h, 96 h, 168 h, 240 h, 264 h, 336 h,
- 20 °C: 6 h, 10 h, 24 h, 36 h, 48 h, 60 h, 72 h, 96 h,
- 37 °C: 1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 6 h, 8 h, 10 h, 24 h.

### 6.3.3 Optimalizace sledovaných faktorů

Za účelem optimalizace sledovaných faktorů a složení kultivačního média bylo v počátcích tohoto experimentu provedeno několik pilotních pokusů. Ty byly zaměřeny hlavně na výběr vhodných koncentrací NaCl, stanovení vhodných teplot a časových intervalů odběrů.

Nejdříve byl pro kultivaci zvolen jak MPB, tak i DM. Vzhledem k tomu, že se hodnoty optické hustoty (OD) u obou médií nijak významně nelišily, byl pro další experimenty vybrán MPB.

Původně byly do experimentu zahrnuty i koncentrace NaCl 0,5 a 2 %. Jelikož však nijak významně neovlivňovaly bakteriální růst a rozdíly optických hustot byly v případě tolika koncentrací minimální, byly nakonec vynechány.

Stejně tak tomu bylo i u teploty, kdy kultivace původně probíhala při 6, 15 a 37 °C. Teplota 6 °C se však ukázala pro růst bakterie jako příliš nízká, a proto byly nakonec zvoleny teploty 10, 20 a 37 °C.

Také intervaly odběrů musely být sestaveny tak, aby vyhovovaly dané teplotě. U teploty 10 °C se nepředpokládal nijak výrazný nárůst, a proto doba mezi jednotlivými odběry mohla být delší. Naopak při teplotě 37 °C bakterie rostla velmi rychle, a tak odběry probíhaly téměř po hodině.

### 6.3.4 Stanovení počtu kolonií a měření optické hustoty

V případě každé sledované teploty, tj. 10 °C, 20 °C a 37 °C, byl v jednotlivých časových intervalech (uvedených v kapitole 6.3.2) stanoven počet buněk (CFU.ml<sup>-1</sup>) a změřena optická hustota.

Pro stanovení počtu kolonií bylo provedeno ředění 10<sup>-1</sup> – 10<sup>-5</sup>. Na misky s MPA byla následně aplikována ředění 10<sup>-3</sup>, 10<sup>-4</sup>, 10<sup>-5</sup> a po uplynutí 24 hodinové kultivace byly spočítány vyrostlé kolonie. Počet kolonií byl stanoven pouze u vybraných faktorů.

Optická hustota byla měřena u všech možných kombinací pH a NaCl. K měření byl použit spektrofotometr Libra S6 s diodovým polem a nastavenou vlnovou délkou 600 nm.

Ještě před samotným měřením optické hustoty bylo nutné obsah zkumavek zředit 0,6 mol.l<sup>-1</sup> HClO<sub>4</sub> v poměru 1:1 za účelem zastavení dalšího bakteriálního růstu.

Po důkladném promíchání zkumavek byla optická hustota proměřována proti blanku (sterilní MPB zředěný  $\text{HClO}_4$ ).

Na základě získaných výsledků počtu kolonií a optické hustoty byla sestrojena kalibrační křivka a pomocí přepočtů dle Gompertzova modelu (viz kapitola 6.3.6) byla získána samotná růstová křivka.

### 6.3.5 Stanovení obsahu biogenních aminů

Pro vlastní stanovení biogenních aminů bylo zapotřebí obsah zkumavek odstředit při 6000 g po dobu 10 minut. Supernatant byl následně v mikrozkuvkách typu Eppendorf zředěn borátovým pufrům ( $0,4 \text{ mol.l}^{-1}$  kyselina boritá upravená pomocí NaOH na pH 9,5) v poměru 1:4.

Následujícím krokem bylo další odstředění při 20000 g po dobu 30 minut. 1 ml získaného supernatantu byl přefiltrován přes  $0,22 \mu\text{m}$  filtr do vialek a bylo k němu přidáno  $10 \mu\text{l}$  tryptaminu jako vnitřního standardu. V případě potřeby byly vzorky doředěny borátovým pufrům na příslušnou koncentraci. Takto připravené vzorky byly podrobeny analýze prostřednictvím vysoce účinné kapalinové chromatografie.

Tab. 3. Eluční program

Čas (min)	$\text{CH}_3\text{COONa}$ (%)	Acetonitril (%)
0	70	30
13	70	30
20	50	50
43	0	100
46	0	100
50	70	30
55	70	30

Pro stanovení obsahu putrescinu a kadaverinu byl využit kapalinový chromatograf sestávající z autosampleru, binární pumpy (oba LabAlliance), degaseru, termostatu kolony a fluorescenčního detektoru (vše Agilent Technologies). Separace byla provedena na předkoloně Cogent HPS<sup>TM</sup> C18, 20 mm x 4 mm,  $5 \mu\text{m}$  a koloně s reverzní fází Cogent HPS<sup>TM</sup> C18, 150 mm x 4,6 mm,  $5 \mu\text{m}$  (obě MicroSolv Technologies). Nástřik na kolonu činil  $5 \mu\text{l}$ . Pro separaci byla využita gradientová eluce (eluční program viz Tab. 3) mobilní

fází 0,1 mol.l<sup>-1</sup> CH<sub>3</sub>COONa s acetonitrilem při objemové průtokové rychlosti 0,6 ml.min<sup>-1</sup>. Analýza probíhala při 30 °C. Signál byl snímán fluorescenčním detektorem při λ<sub>EX</sub> = 330 nm a λ<sub>EM</sub> = 440 nm.

### 6.3.6 Statistické vyhodnocení výsledků

Jak růstová křivka, tak obsah putrescinu a kadaverinu byly modelovány pomocí Gompertzova modelu. Jednotlivé parametry modelu ( $A$ ,  $\mu_m$ ,  $\lambda$ ) byly odhadnuty pomocí nelineární regresní analýzy (Marquardt-Levenburgova metoda). Pro statistické vyhodnocení byl použit program Unistat® 5.5 a křivky byly sestrojeny v programu MS Excel.

Pro Gompertzův model růstové křivky platí následující vztah:

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

kde

$\lambda$ .....délka lag fáze [h]

$\mu_m$ .....maximální růstová rychlost [h<sup>-1</sup>]

$A$ .....asymptota, maximální hodnota logaritmu relativní četnosti populace, které bylo dosaženo:  $A = \ln [N_\infty/N_0]$  (kde  $N_\infty$  je počet buněk v posledním odběrovém čase a  $N_0$  je počet buněk na počátku) [48].

Pro Gompertzův model produkce biogenních aminů platí následující vztah:

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

kde

$\lambda_{BA}$  .....lag fáze (doba, než byla poprvé zaznamenána produkce biogenních aminů) [h]

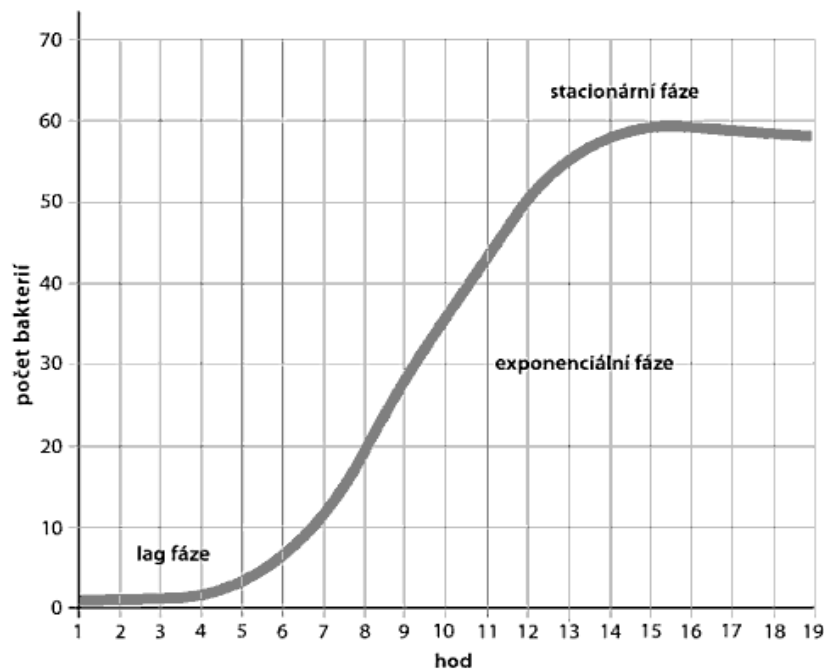
$\mu_{BA}$ .....maximální rychlost produkce biogenních aminů [mg.l<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>]

$A_{BA}$ .....asymptota, maximální produkovaná koncentrace biogenních aminů [mg.l<sup>-1</sup>] [48].

## 7 VÝSLEDKY A DISKUZE

### 7.1 Stanovení růstové křivky

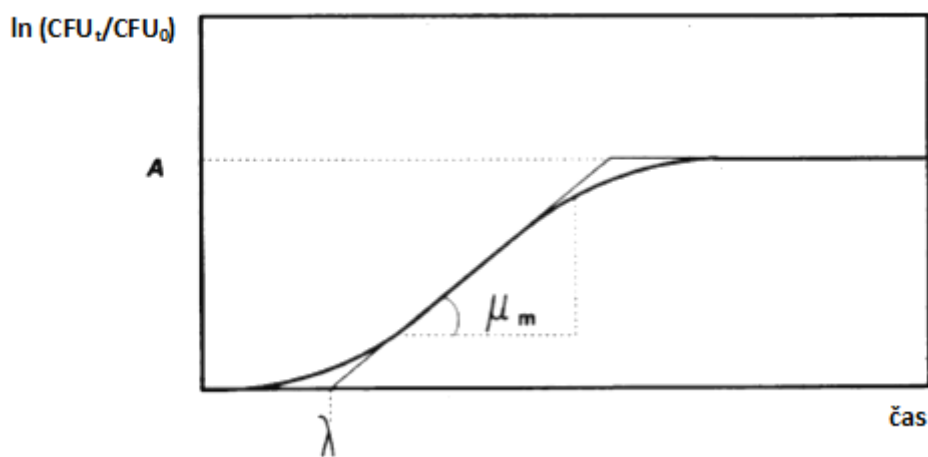
Zaznamenáváním počtu buněk po naočkování do živné půdy v čase, lze získat typickou růstovou křivku, z níž jsou patrné jednotlivé fáze množení. Těsně po naočkování se buňky přizpůsobují novým podmínkám a začíná se aktivovat metabolismus. Tato fáze, kdy se buňky nemnoží, se nazývá lag fáze. Následně se pomalu a nesynchronně buňky začínají dělit, křivka se ohýbá a přechází do fáze vyrovnaného růstu. Buňky se množí maximální konstantní rychlostí, dělí se stejným tempem. Počet buněk narůstá exponenciálně, a proto se tento úsek označuje jako exponenciální fáze. Pozvolna se intenzita množení snižuje a po fázi zpomalení přechází populace do stacionární fáze. Ta je charakteristická tím, že buněk nepřibývá ani neubývá. Po uplynutí další doby se počet živých buněk snižuje a populace se dostává do fáze hynutí [74]. Jednotlivé fáze růstu bakterií jsou znázorněny na Obr. 9.



Obr. 9. Základní fáze růstové křivky [74]

V našem případě byly růstové křivky sestaveny jednak z naměřených hodnot optických hustot a jednak z počtu buněk vyrostlých na Petriho miskách.

Ze získaných hodnot byly vypočteny logaritmy CFU v čase  $t$  oproti hodnotám CFU v čase  $0$ , vyjádřeno vztahem:  $y = \ln(\text{CFU}_t/\text{CFU}_0)$  (kde  $\text{CFU}_t$  vyjadřuje celkový počet kolonie tvořících jednotek na ml v čase  $t$  a  $\text{CFU}_0$  celkový počet kolonie tvořících jednotek na ml na začátku kultivace) a růstové křivky byly poté znázorněny pomocí tří základních parametrů Gompertzova modelu, jako závislost tohoto logaritmu na čase kultivace [48]. Příkladem takové růstové křivky je Obr. 10.



Obr. 10. Růstová křivka dle Gompertzova modelu [75]

Růst bakterie *Serratia marcescens* byl sledován ve třech teplotách ( $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $20\text{ }^{\circ}\text{C}$  a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), vždy za různých podmínek pH a koncentrace NaCl.

Hodnoty jednotlivých parametrů ( $A$ ,  $\mu_m$  a  $\lambda$ ) jsou pro jednotlivé kultivační teploty uvedeny v Tab. 4, 5 a 6.

### 7.1.1 Stanovení růstové křivky – $10\text{ }^{\circ}\text{C}$

Na základě sledování tří základních parametrů Gompertzova modelu byly z růstových křivek sestavených pro teplotu  $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ , vyvozeny následující závěry.

Lag fáze se u většiny kombinací pH a NaCl pohybovala kolem 30 hodin, a to zejména v nižších koncentracích NaCl do 4 %. Výjimku zde tvořily pouze hodnoty odpovídající pH 4, neboť v takto kyselém prostředí byla u všech koncentrací NaCl lag fáze prodloužena. Výrazný skok byl zaznamenán u 4 % NaCl a pH 4, kdy byla lag fáze nejdelší ze všech a trvala 95,21 hodin. V podobném tempu se nacházela fáze lagu i u 5 a 6 % NaCl, přičemž



doba trvání byla jen o něco kratší (průměrně kolem 70 hodin). Od těchto údajů se odlišovala pouze hodnota příslušící koncentraci 5 % NaCl a pH 6, která činila 22,87 hodin. Z těchto poznatků tak bylo možné usoudit, že pH 4 a zvyšující se koncentrace NaCl prodlužovaly dobu lag fáze.

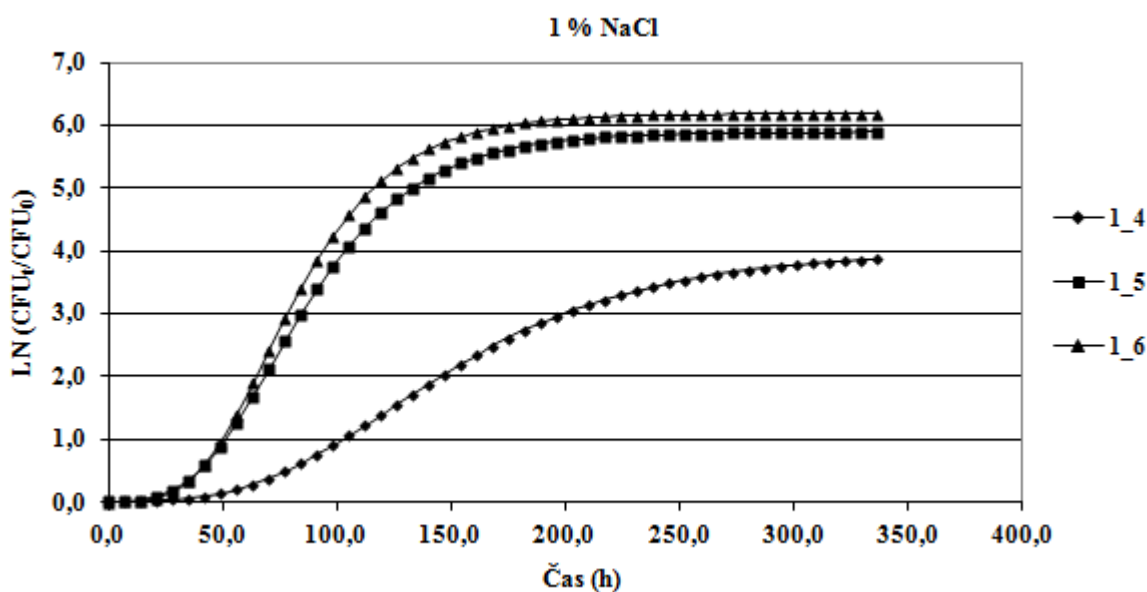
*Tab. 4. Parametry Gompertzova modelu –  
růstová křivka (10 °C)*

NaCl (%)	pH	A (-)	$\mu_m$ (h <sup>-1</sup> )	$\lambda$ (h)
0	4	3,15	0,02	41,15
	5	6,46	0,07	28,99
	6	7,61	0,05	28,58
1	4	3,99	0,02	61,09
	5	5,89	0,06	36,45
	6	6,18	0,07	37,47
3	4	3,51	0,02	61,92
	5	3,95	0,04	31,24
	6	4,85	0,04	24,80
4	4	1,63	0,01	95,21
	5	3,23	0,03	36,76
	6	3,01	0,03	30,26
5	4	0,48	0,00	78,62
	5	1,55	0,01	65,99
	6	2,38	0,02	22,87
6	4	0,54	0,01	74,35
	5	1,31	0,02	68,93
	6	0,38	0,01	68,93

Jak rychle mikroorganismus roste, bylo zjišťováno pomocí parametru  $\mu_m$ . Jako optimální se jevíly kombinace 0 % NaCl, pH 5 a 6 a 1 % NaCl, pH 5 a 6, neboť v těchto případech dosahovala růstová rychlost hodnot 0,05 – 0,07 h<sup>-1</sup>. Obecně lze říci, že ve většině případů byl zaznamenán rychlejší nárůst při pH 5 a 6 až do koncentrace NaCl 5 %. Na druhou stranu se ukázalo, že prostředí s pH 4 není pro růst bakterie příliš vhodné, poněvadž při této kyselosti ani v jedné z koncentrací nedosáhla růstová rychlost hodnoty vyšší jak 0,02 h<sup>-1</sup>. Také se zvyšující se koncentrací soli byl růst mikroorganismů potlačen, kdy se u 5 a 6 % pohybovala růstová rychlost maximálně v rozmezí 0,00 – 0,02 h<sup>-1</sup>. Nulová hodnota maximální růstové rychlosti byla nalezena u kombinace 5 % NaCl a pH 4, což v podstatě potvrzuje výše uvedené údaje.

Pro maximální nárůst buněk (A) platily téměř stejné principy jako pro maximální růstovou rychlost. Ve většině případů to tedy znamenalo, že tam, kde byla růstová rychlost vyšší, byla zpravidla vyšší i maximální hodnota nárůstu buněk a naopak. Úplně nejvyšší hodnoty (7,61) bylo přitom dosaženo za podmínek 0 % NaCl a pH 6. Dále byly vysoké hodnoty zjištěny u 0 % NaCl pH 5 (6,46), 1% NaCl pH 5 (5,89) a 1 % NaCl pH 6 (6,18). Co se týče nízkých hodnot, tak ty opět převládaly u koncentrací 5 a 6 %, přičemž nejnižší hodnota (0,38) připadla na 6 % NaCl pH 6. U zbylých nejmenovaných kombinací pH a NaCl se průběh vyvíjel podobným způsobem jako u maximální růstové rychlosti.

Ukázku toho, za jakých podmínek bakterie dobře rostla a jak byl naopak její růst inhibován kyselostí prostředí, poskytuje Obr. 11. Ostatní růstové křivky pro kultivační teplotu 10 °C jsou součástí přílohy PI.

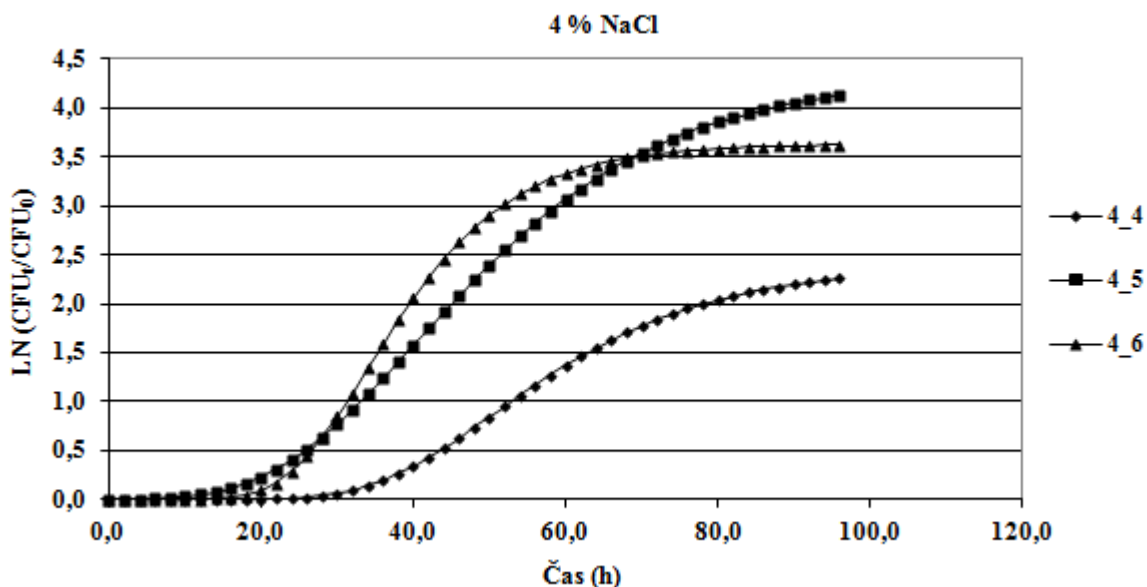


Obr. 11. Růstová křivka bakterie *Serratia marcescens* v podmínkách 1 % NaCl, pH 4, 5, 6 a teploty 10 °C

### 7.1.2 Stanovení růstové křivky – 20 °C

Z průběhu růstových křivek sestavených pro teplotu 20 °C vyplynulo, že doba lag fáze se s narůstajícím obsahem soli v médiu prodlužovala. Zlom nastal u koncentrace 4 % NaCl a pH 4, kdy byla fáze lagu nejdelší a trvala 34,72 hodin (viz Obr. 12; ostatní růstové křivky pro kultivační teplotu 20 °C jsou součástí přílohy PII). Do koncentrace 3 % NaCl se

hodnoty, vyjma těch, které příslušely pH 4, pohybovaly v intervalu 7 – 15 hodin, přičemž horní hranice intervalu dosahovaly převážně hodnoty odečtené při pH 6. U zbývajících koncentrací NaCl 4, 5 a 6 % nebyly zaznamenány výrazné výkyvy a hodnoty se v průměru pohybovaly kolem 25 hodin. Stejně jako u předchozí teploty, se i zde ukázalo, že v prostředí s pH 4 byla doba lag fáze u každé koncentrace nejdelší.



Obr. 12. Růstová křivka bakterie *Serratia marcescens* v podmínkách 4 % NaCl, pH 4, 5, 6 a teploty 20 °C

Nejrychleji rostla bakterie *Serratia marcescens* za podmínek 0 % NaCl pH 5, kdy růstová rychlost činila  $0,26 \text{ h}^{-1}$ . Pro růst vyhovující se dále jevíly kombinace 0 % NaCl pH 6, 1 % NaCl pH 5 a 1 % NaCl pH 6, neboť v jejich případě se růstová rychlost přibližovala hranici  $0,20 \text{ h}^{-1}$ . Naopak nejvíce utlumena byla rychlost růstu v prostředí s vyšším obsahem soli, konkrétně za podmínek 6 % NaCl a pH 4, kdy bylo dosaženo pouze hodnoty  $0,01 \text{ h}^{-1}$ . Vesměs všechny hodnoty růstové rychlosti zaznamenané u vyšších koncentrací soli byly nízké a nepřesáhly  $0,06 \text{ h}^{-1}$ , čemuž se vymykala pouze hodnota  $0,11 \text{ h}^{-1}$  u koncentrace 5 % NaCl a pH 6. Z růstových křivek bylo také zřejmé, že u téměř každé z koncentrací zvyšující se pH prostředí postupně urychlovalo bakteriální růst.

Maximální nárůst buněk opět prakticky kopíroval maximální růstovou rychlost, s tím rozdílem, že nejvyšší hodnota (7,96) v tomto případě náležela koncentraci 0 % NaCl

a pH 6. Nic se ale nezměnilo na tom, že celkově se nejvyšší hodnoty nacházely v podmínkách 0 a 1 % NaCl, pH 5 a 6, kde se pohybovaly kolem 7 – 8 a rozdíly mezi nimi byly minimální. Nejnižší naměřená hodnota (0,74) odpovídala stejným podmínkám jako u maximální růstové rychlosti, tedy 6 % NaCl a pH 4. Ze získaných výsledků tak bylo možné vyvodit, že vysoká koncentrace NaCl a nízké pH maximální hodnotu růstu snižovaly.

Tab. 5. Parametry Gompertzova modelu –  
růstová křivka (20 °C)

NaCl (%)	pH	A (-)	$\mu_m$ (h <sup>-1</sup> )	$\lambda$ (h)
0	4	4,25	0,09	20,02
	5	6,81	0,26	10,70
	6	7,96	0,19	7,91
1	4	4,08	0,08	17,59
	5	6,40	0,16	9,38
	6	7,96	0,18	12,88
3	4	3,52	0,11	22,56
	5	5,79	0,11	13,91
	6	5,98	0,13	14,80
4	4	2,40	0,06	34,72
	5	4,35	0,09	21,54
	6	3,63	0,13	23,32
5	4	1,32	0,02	24,18
	5	1,79	0,06	20,82
	6	3,31	0,11	18,38
6	4	0,74	0,01	28,14
	5	1,99	0,04	25,63
	6	1,68	0,05	25,39

### 7.1.3 Stanovení růstové křivky – 37 °C

Z růstových křivek zpracovaných pro teplotu 37 °C vyplynulo, že sledované parametry byly ovlivněny poněkud jinak než u předchozích dvou teplot.

Lag fáze v tomto případě nebyla vždy nejdelší při pH 4, u několika koncentrací trvala nejdéle dokonce při pH 6 a hodnoty  $\lambda$  u většiny koncentrací, v závislosti na pH, již nebyly seřazeny od největší po nejmenší či naopak, ale pohybovaly se různě. Ovšem na tom, že zvyšující se koncentrace soli lag fázi prodlužovala, se nic nezměnilo. Do koncentrace 3 % NaCl se doba lagu nacházela v rozsahu přibližně 2 – 4 hodin. To ale neplatilo za

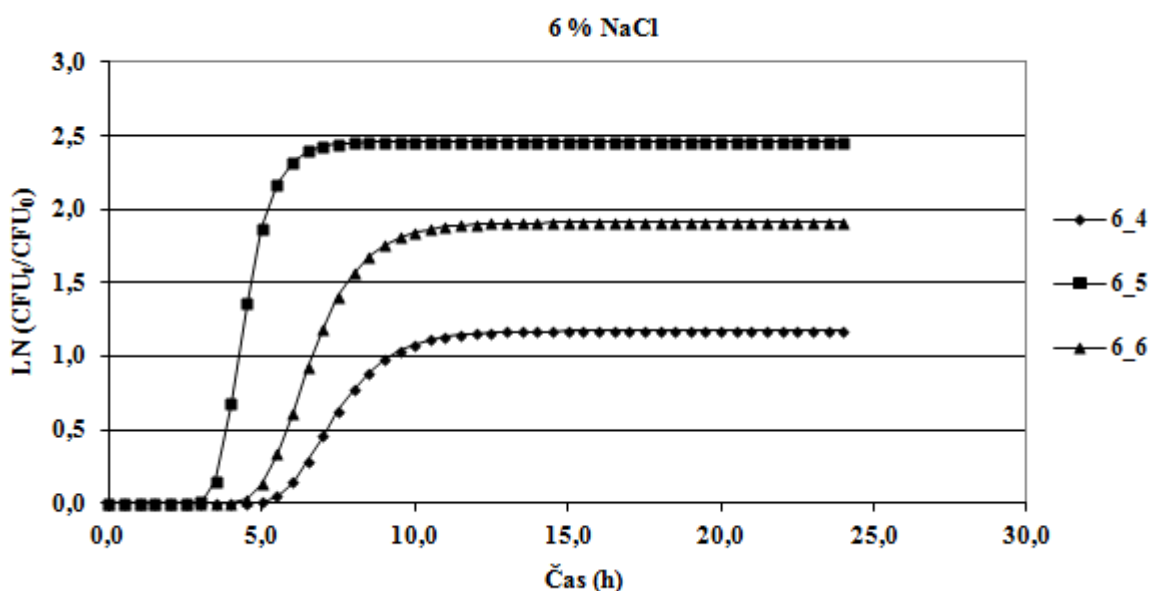
podmínek 1 % NaCl a pH 4, kdy hodnota činila 5,16 hodin a představovala tak skok od ostatních. Dále bylo zajímavé, že při koncentraci 0 % NaCl a pH 5 lag fáze trvala nejkratší dobu, a to 1,45 hodin, kdežto za stejného pH u koncentrace 3 % NaCl to byla hodnota z nich nejvyšší 3,86 hodin. Co se týče vyšších koncentrací soli, 4, 5 a 6 %, tak u každé z nich byla zaznamenána vysoká hodnota překračující hranici 5 hodin. U koncentrace 4 % NaCl pH 4 to byla doba 5,61 hodin, u 5 % NaCl a pH 6 to byla hodnota 5,38 hodin a v prostředí s 6 % NaCl a pH 4 trvala fáze lagu nejdéle, 5,70 hodin. Jelikož pH působilo na dobu lag fáze za odlišných koncentrací NaCl různě, nebylo možné jednoznačně jeho vliv zevšeobecnit.

*Tab. 6. Parametry Gompertzova modelu –  
růstová křivka (37 °C)*

NaCl (%)	pH	A (-)	$\mu_m$ (h <sup>-1</sup> )	$\lambda$ (h)
0	4	4,13	0,65	1,66
	5	7,76	1,06	1,45
	6	10,40	1,56	2,66
1	4	4,76	0,42	5,16
	5	7,30	0,96	2,71
	6	8,23	1,54	2,67
3	4	3,88	0,81	3,44
	5	5,80	0,72	3,86
	6	5,03	0,90	3,13
4	4	2,07	0,39	5,61
	5	3,85	1,14	4,45
	6	3,86	1,30	4,71
5	4	1,36	0,29	3,43
	5	1,78	0,76	4,88
	6	3,47	1,30	5,38
6	4	1,17	0,35	5,70
	5	2,46	1,41	3,52
	6	1,91	0,61	4,99

Na rychlost růstu mikroorganismů neměla sůl až tak výrazný vliv, neboť se růstová rychlost pohybovala v rámci všech koncentrací na stejné úrovni. Z růstových křivek nebylo zřejmé, že by koncentrace 6 % NaCl nějakým způsobem růst mikroorganismů výrazně ovlivňovala. Příkladem může být koncentrace 0 % NaCl pH 5, kdy maximální růstová rychlost dosáhla 1,06 h<sup>-1</sup> a naproti tomu koncentrace 6 % NaCl pH 5, kdy byla rychlost růstu dokonce vyšší a činila 1,41 h<sup>-1</sup>. Na druhou stranu zde hrála významnou roli kyselost

prostředí, neboť u většiny koncentrací zajišťovalo pH 4 nejnižší rychlost růstu. Nejpomaleji ( $0,29 \text{ h}^{-1}$ ) rostla bakterie v podmínkách 5 % NaCl a pH 4, naopak nejrychleji ( $1,56 \text{ h}^{-1}$ ) rostla při koncentraci 0 % NaCl a pH 6. Velmi rychlý nárůst byl zpozorován také v prostředí s 1 % NaCl a pH 6, kde hodnota  $\mu_m$  vystoupila až na  $1,54 \text{ h}^{-1}$ . Od výsledků ostatních se poněkud odlišovaly hodnoty odpovídající koncentraci 3 % NaCl, neboť v průměru dosahovaly maximální růstové rychlosti  $0,80 \text{ h}^{-1}$  a ani u jedné z kombinací pH a NaCl nebyla překročena hranice  $1 \text{ h}^{-1}$ . Bylo tak možné vyvodit, že v prostředí s touto koncentrací a pH 5 a 6 rostly mikroorganismy pomaleji, než v prostředí s 4 a 5 % NaCl a stejným pH a také v prostředí s 6 % NaCl byl nárůst rychlejší, pouze ale v případě pH 5.



Obr. 13. Růstová křivka bakterie *Serratia marcescens* v podmínkách 6 % NaCl, pH 4, 5, 6 a teploty  $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$

Do nejvyšších hodnot  $A$  narostly mikroorganismy podobně jako u předchozích teplot v podmínkách 0 % NaCl pH 5 (7,76), 0 % NaCl pH 6 (10,40), 1 % NaCl pH 5 (7,30) a 1 % NaCl pH 6 (8,23). Naopak nejnižší hodnota (1,17) příslušela koncentraci 6 % NaCl a pH 4. Mimo výše zmíněné se jednotlivé hodnoty sestav pH a NaCl pohybovaly v rozpětí čísel přibližně 4 – 6, do koncentrace 3 % NaCl, u vyšších koncentrací maximální hodnota nárůstu buněk nepřekročila hranici 4. Z průběhu růstových křivek tak bylo možné vydedukovat, že bakteriálnímu růstu svědčilo spíše méně kyselé prostředí (pH 5 a 6)

a naopak vysoké koncentrace soli jej eliminovaly (viz Obr. 13; ostatní růstové křivky pro kultivační teplotu 37 °C jsou součástí přílohy PIII.).

#### 7.1.4 Dílčí diskuze

Dostupná literatura uvádí, že optimální teplota růstu se u serácie pohybuje kolem 37 °C [46, 76]. S přihlédnutím k tomu musely být v případě námi sledovaných teplot 10 °C, 20 °C a 37 °C upraveny intervaly mezi jednotlivými odběry tak, aby byl nárůst u každé z nich patrný. Z toho vyplývá, že pro teplotu 10 °C, jakožto nejméně vhodnou pro růst této bakterie, byly zvoleny intervaly delší (24 – 336 h), pro teplotu 20 °C o něco kratší (6 – 96 h) a naopak pro teplotu 37 °C (optimální), byly zvoleny intervaly velmi krátké (1 – 24 h).

Asymptoty (tedy maximální hodnoty logaritmu relativní četnosti populace) se pohybovaly v rámci všech teplot u totožných kombinací pH a obsahu NaCl v podstatě na stejné úrovni. Rozdíly činily většinou maximálně jeden logaritmický řád (s výjimkou 0 % NaCl a pH 6, kdy byla hodnota  $A$  u 37 °C o více než dva logaritmické řády vyšší než u ostatních dvou teplot). Nejnižších hodnot  $A$  bylo ve všech případech dosaženo při kultivační teplotě 10 °C, což se jistě dalo předpokládat.

Rozdílných výsledků bylo dosaženo u délky lag fáze. V této fázi neprobíhá téměř žádné množení. Buňky pouze zvětšují svůj objem, organizují metabolické systémy a aktivují enzymy. Bakterie jsou v tomto stádiu velmi citlivé k nepříznivým faktorům a jedním z nich je právě teplota, která dokáže dobu lag fáze významně ovlivnit [77, 78]. Zatímco u teploty 10 °C byly obecně fáze lagu nejdelší a mnohdy trvaly přes 60 hodin, u 20 °C dosahovaly nejdelší lag fáze už jen 20 – 30 hodin a v případě kultivační teploty 37 °C nepřesáhla žádná lag fáze 6 hodin.

Stejně tak se lišily i maximální rychlosti růstu, neboť u teploty 10 °C rostly mikroorganismy nejpomaleji, přibližně rychlostí 0,00 – 0,07 h<sup>-1</sup>, u teploty 20 °C se nejvyšší růstová rychlost vyšplhala až k 0,26 h<sup>-1</sup> a hranice 1 h<sup>-1</sup> byla překročena u teploty 37 °C.

Na základě těchto zjištěných výsledků bylo možné potvrdit, že teplota 37 °C je pro růst bakterie velmi vhodná a souhlasit tak s uvedenou literaturou [46, 76]. Naopak teplota 10 °C je již pro serácii poměrně nízká, což souvisí i se zjištěním v jednom z našich pilotních pokusů, kdy při 6 °C již *Serratia marcescens* téměř nerostla. Při této teplotě bylo

dosaženo nejnižšího nárůstu počtu buněk, stejně jako nejnižší růstové rychlosti a nejdelší lag fáze. Ercolini *et al.* zkoumali ve své práci růst vybraných bakterií při 7 °C, 20 °C a 30 °C. Mimo jiné se jednalo také o bakterie z čeledi *Enterobacteriaceae*, přičemž stejně jako v našem případě rostly nejpomaleji při 7 °C, a některé z nich při takto nízké teplotě nerostly vůbec [79].

Z hlediska působení účinků pH a NaCl se teploty 10 °C a 20 °C prakticky kopírovaly. U obou nastal v průběhu fáze lagu zlom při koncentraci 4 % NaCl a pH 4, kdy byly naměřeny nejdelší hodnoty. Současně také pro obě kultivační teploty platilo, že kyselé prostředí (zejména pH 4) a zvyšující se koncentrace soli prodlužovaly dobu lag fáze. U teploty 37 °C nebyla sice fáze lagu vždy nejdelší při pH 4, ale za to účinek soli zde byl stejný jako u dvou předchozích teplot. Maximální růstové rychlosti bylo jak u teploty 10 °C, tak u teploty 20 °C dosaženo za podmínek 0 % NaCl pH 5, 6 a 1 % NaCl pH 5, 6, z čehož bylo možné usoudit, že vyšší pH prostředí a nízká koncentrace soli působí příznivě na bakteriální růst. Dále bylo zjištěno, že při teplotě 37 °C neměla sůl výrazný vliv na rychlost růstu mikroorganismů, neboť vysoké hodnoty byly zaznamenány i u koncentrace 6 %. Naproti tomu se zde jevila jako velmi důležitý faktor kyselost prostředí, kdy pH 4 tlumilo bakteriální růst a naopak pH 6 jej povzbuzovalo. Vliv pH a NaCl na maximální nárůst buněk byl v podstatě u všech teplot stejný. Spočíval v tom, že vysoké koncentrace soli a nízké pH zpravidla inhibovaly růst bakterie. Mezi optimální kombinace se tak zařadily koncentrace 0 a 1 % NaCl, pH 5 a 6, naopak mezi nepříznivé 6 % NaCl, pH 4. Z literatury je známo, že bakterie *Serratia marcescens* dobře roste v podmínkách 0 – 4 % NaCl a pH 5 – 9 [46, 47], což prakticky potvrzuje výše uvedené výsledky.

## 7.2 Stanovení produkce biogenních aminů

Stejně jako u růstových křivek byly použitím Gompertzova modelu sestaveny křivky vyjadřující dekarboxylázovou aktivitu bakterie *Serratia marcescens*, čili její schopnost produkovat biogenní aminy. Prioritně byl sledován obsah dvou biogenních aminů, a to kadaverinu a putrescinu, opět ve třech odlišných teplotách, za různých podmínek kyselosti prostředí a koncentrace soli. Křivky v tomto případě vyjadřovaly závislost obsahu biogenních aminů [ $\text{mg.l}^{-1}$ ] na čase kultivace.

Parametry Gompertzova modelu pro různé kultivační teploty jsou znázorněny v Tab. 7 – 9 (pro kadaverin) a v Tab. 10 – 12 (pro putrescin).



### 7.2.1 Stanovení obsahu kadaverinu – 10 °C

Prostřednictvím grafů upravených Gompertzovou modulací, byla pozorována tvorba kadaverinu při teplotě 10 °C. O tom, jaký vliv na produkci kadaverinu měla koncentrace soli či pH prostředí, vypovídala jednak fáze lagu, jednak rychlost produkce a také koncentrace biogenního aminu.

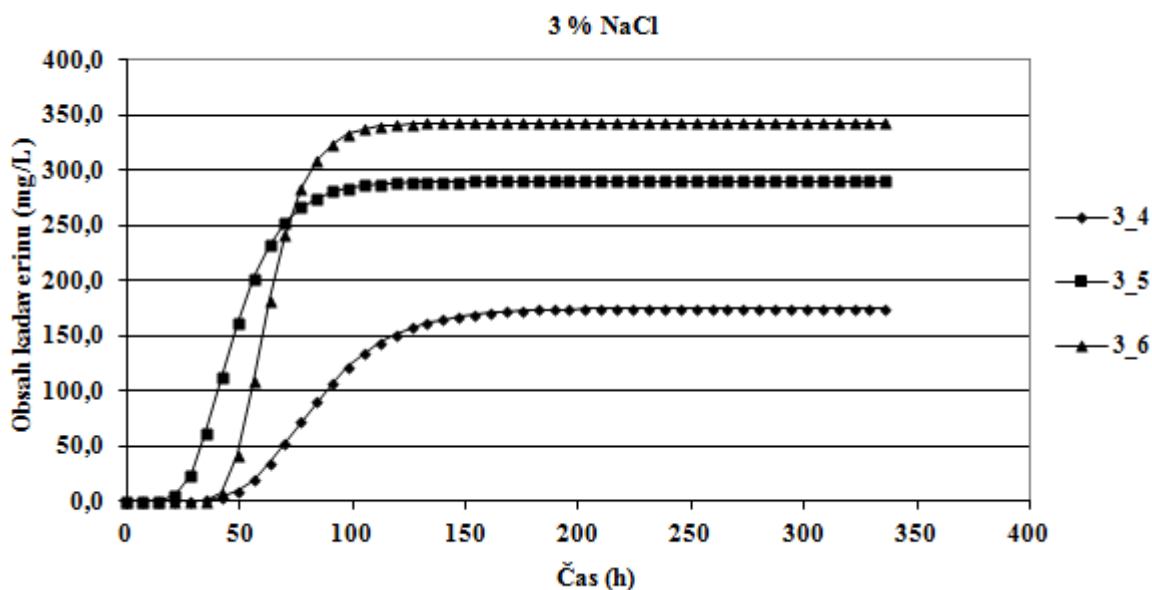
Tab. 7. Parametry Gompertzova modelu –  
produkce kadaverinu (10 °C)

NaCl (%)	pH	$A_{BA}$ (mg.l <sup>-1</sup> )	$\mu_{BA}$ (mg.l <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )	$\lambda_{BA}$ (h)
0	4	34,7	1,4	49,7
	5	79,7	5,1	30,8
	6	260,0	6,3	37,0
1	4	46,4	6,2	44,2
	5	136,4	5,3	33,4
	6	297,5	9,7	44,1
3	4	175,1	2,8	51,1
	5	289,9	7,4	26,8
	6	343,3	10,8	46,0
4	4	22,4	1,6	51,7
	5	61,0	4,8	66,6
	6	31,6	3,8	74,1
5	4	3,3	0,2	88,3
	5	7,2	0,3	81,6
	6	7,9	0,4	76,1
6	4	2,6	0,2	64,7
	5	2,4	0,2	99,4
	6	0,4	0,2	70,5

Lag fázi (tedy dobu, než byla poprvé zaznamenána produkce kadaverinu) ovlivňovala především koncentrace soli, neboť nejvyšší hodnota (99,4 hodin) byla zaznamenána při koncentraci 6 % NaCl a pH 5. Dále trvala fáze lagu relativně dlouho za podmínek 5 % NaCl pH 4 (88,3 hodin) a 5 % NaCl pH 5 (81,6 hodin). Na základě těchto údajů bylo možné vyvodit, že s narůstajícím obsahem soli se lag fáze postupně prodlužovala. Nejkratší doba překvapivě nenáležela 0 % NaCl, ale byla zjištěna v podmínkách 3% NaCl pH 5, kdy činila 26,8 hodin. Kyselost prostředí působila na délku lag fáze různě. Pouze do koncentrace 3 % NaCl se dalo jednoznačně konstatovat, že fáze lagu byly nejdelší při pH 4 a nejkratší při pH 5. Hodnoty  $\lambda_{BA}$  se přitom pohybovaly v rozmezí přibližně 30 – 50 hodin.

Od vyšších koncentrací již nebyl účinek pH tak jasný. Například u koncentrace 4 % NaCl byla lag fáze nejkratší při pH 4, zatímco při koncentraci 5 % NaCl trvala naopak v takto kyselém prostředí fáze lagu nejdéle.

Jak vyplynulo z průběhu křivek, tak pro rychlost produkce kadaverinu se jako optimální jevílo prostředí s nízkým obsahem soli a vyšším pH. Důkazem toho je skutečnost, že při koncentraci 1 % NaCl a pH 6 byla tvorba kadaverinu velmi rychlá ( $9,7 \text{ mg.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$ ). Nejrychleji jej však serávie dokázala produkovat v médiu s 3 % NaCl a pH 6, kdy maximální rychlost produkce dosáhla  $10,8 \text{ mg.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$ . Naopak minimální rychlostí probíhala dekarboxylace lyzinu v prostředí s 5 a 6 % NaCl, přičemž ani jedna ze zjištěných hodnot  $\mu_{BA}$  nepřekročila hranici  $0,4 \text{ mg.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$ . V tak vysoké koncentraci NaCl, jako je 6 %, se dokonce ani účinek pH neprojevil, neboť ve všech případech byl kadaverin produkován stejnou rychlostí, a to  $0,2 \text{ mg.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$ .



Obr. 14. Produkce kadaverinu v podmínkách 3% NaCl, pH 4, 5, 6 a teploty  $10 \text{ }^{\circ}\text{C}$

Největší množství kadaverinu ( $343,3 \text{ mg.l}^{-1}$ ) bylo vytvořeno za podmínek 3 % NaCl pH 6. Koncentrace soli 3 % se obecně projevila jako velmi příznivá, neboť ani u zbylých dvou pH nebyly koncentrace kadaverinu nižší než  $170 \text{ mg.l}^{-1}$  (viz Obr. 14; ostatní křivky znázorňující produkci kadaverinu při  $10 \text{ }^{\circ}\text{C}$  jsou součástí přílohy PIV). U žádné jiné z koncentrací NaCl nebyla překročena hodnota  $100 \text{ mg.l}^{-1}$  v rámci všech pH současně. Dále

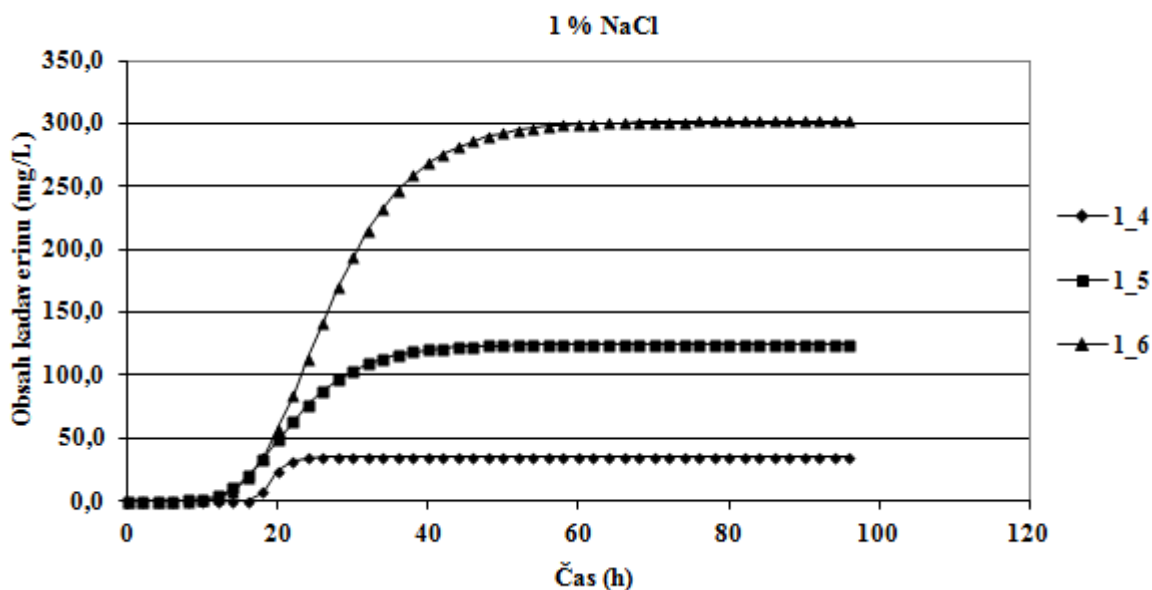
byla vysoká množství kadaverinu zaznamenána u 0 % NaCl pH 6 (260,0 mg.l<sup>-1</sup>) a 1 % NaCl pH 6 (297,5 mg.l<sup>-1</sup>). K výraznému poklesu došlo u koncentrací 5 a 6 % NaCl, kdy se hodnoty  $A_{BA}$  nacházely pouze v rozmezí 2 – 8 mg.l<sup>-1</sup>. Výjimkou zde byla pouze hodnota ze všech nejnižší (0,4 mg.l<sup>-1</sup>), která připadala na kombinaci 6 % NaCl pH 6. Lze tedy shrnout, že až do koncentrace 3 % NaCl maximální produkovaná množství kadaverinu postupně narůstala, přičemž nejnižší hodnoty příslušely pH 4 a nejvyšší pH 6. Jakmile byla ale koncentrace soli vyšší, měla maximální dosažená množství kadaverinu klesající trend a vliv pH se nedal jednoznačně určit.

### 7.2.2 Stanovení obsahu kadaverinu – 20 °C

Hodnoty délky přípravné fáze získané z křivek sestavených pro teplotu 20 °C bylo možné prakticky rozdělit do dvou částí, a to na hodnoty  $\lambda_{BA}$  náležící koncentracím NaCl do 3 % a na hodnoty vyšších koncentrací (4, 5 a 6 % NaCl). V první jmenované skupině trvala fáze lagu průměrně 14 hodin a nepřesáhla hranici 18 hodin. Nejkratší dobu přitom představovala hodnota 12,1 hodin, stanovená při koncentraci 3 % NaCl a pH 5. V případě vyšších koncentrací byla doba lag fáze podstatně delší a pohybovala se v intervalu 25 – 30 hodin. Nejdéle ze všech (33,4 hodin) probíhala fáze lagu za podmínek 4 % NaCl pH 6. Jelikož se hodnoty v rámci odlišných kombinací pH a NaCl pohybovaly různě, nebyl zaznamenán jednoznačně rostoucí či klesající trend. Jako zlomová se projevila pouze koncentrace 4 % NaCl, od které byly fáze lagu znatelně prodlouženy.

Rychlost produkce kadaverinu byla viditelně utlumena v prostředí s vyšším obsahem soli, což dokazovaly velmi nízké hodnoty, nepřesahující 0,5 mg.l<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>, příslušící koncentracím 5 a 6 % NaCl. Nejpomaleji byl kadaverin produkován v podmínkách 5 a 6 % NaCl a pH 4, kdy byla u obou kombinací zaznamenána stejná rychlost, a to 0,2 mg.l<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>. Naopak velmi dobře působila na tvorbu kadaverinu koncentrace 1 % NaCl a pH 6, neboť za těchto podmínek bylo dosaženo nejvyšší produkční rychlosti (14,7 mg.l<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>). Zbylé hodnoty se pohybovaly přibližně na stejné úrovni (kolem 6 – 11 mg.l<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>), s výjimkou těch, které náležely pH 4. V takto kyselém prostředí byla ve většině případů rychlost produkce výrazně snížena a zjištěné hodnoty  $\mu_{BA}$  se tak odlišovaly od ostatních.

Nejvyšší rychlost produkce a nejvyšší produkované množství kadaverinu znázorňuje Obr. 15. Ostatní křivky znázorňující produkci kadaverinu při 20 °C jsou součástí přílohy PV.



Obr. 15. Produkce kadaverinu v podmínkách 1 % NaCl, pH 4, 5, 6 a teploty 20 °C

Z výsledků maximálních produkovaných množství kadaverinu bylo možné vypočítat rostoucí trend u koncentrací 0 a 1 % NaCl. V těchto případech tedy platilo, že se zvyšující se koncentrací soli a zvyšujícím se pH narůstaly i koncentrace kadaverinu. Nejvyšší hodnota  $A_{BA}$  přitom náležela 1 % NaCl a pH 6 a činila 301,8 mg.l<sup>-1</sup>. V prostředí s 3 % NaCl bylo dosaženo také relativně vysokých výsledků, přičemž ale druhá nejvyšší hodnota (265,6 mg.l<sup>-1</sup>) příslušela pH 5. Od této koncentrace výše tak nebyl účinek pH zcela jednoznačný a hodnoty  $A_{BA}$  postupně začaly klesat. U koncentrace 4 % NaCl se v rámci všech pH maximální produkovaná množství kadaverinu pohybovala v rozmezí 20 – 60 mg.l<sup>-1</sup>, u 5 % NaCl to bylo už jen průměrně 5 mg.l<sup>-1</sup> a v prostředí s 6 % NaCl a pH 4 byla nalezena nejnižší hodnota  $A_{BA}$  (1,0 mg.l<sup>-1</sup>). Z výše uvedených informací tak bylo možné vyvodit, že koncentrace soli nižší jak 3 % stimulovaly produkci kadaverinu, naproti tomu koncentrace vyšší ji inhibovaly. Také je nutné poznamenat, že do 1 % NaCl patřily pH 4 vždy nejnižší hodnoty a pH 6 naopak nejvyšší, což již neplatilo vždy pro koncentrace soli 3, 4, 5 a 6 %.

Tab. 8. Parametry Gompertzova modelu –  
produkce kadaverinu (20 °C)

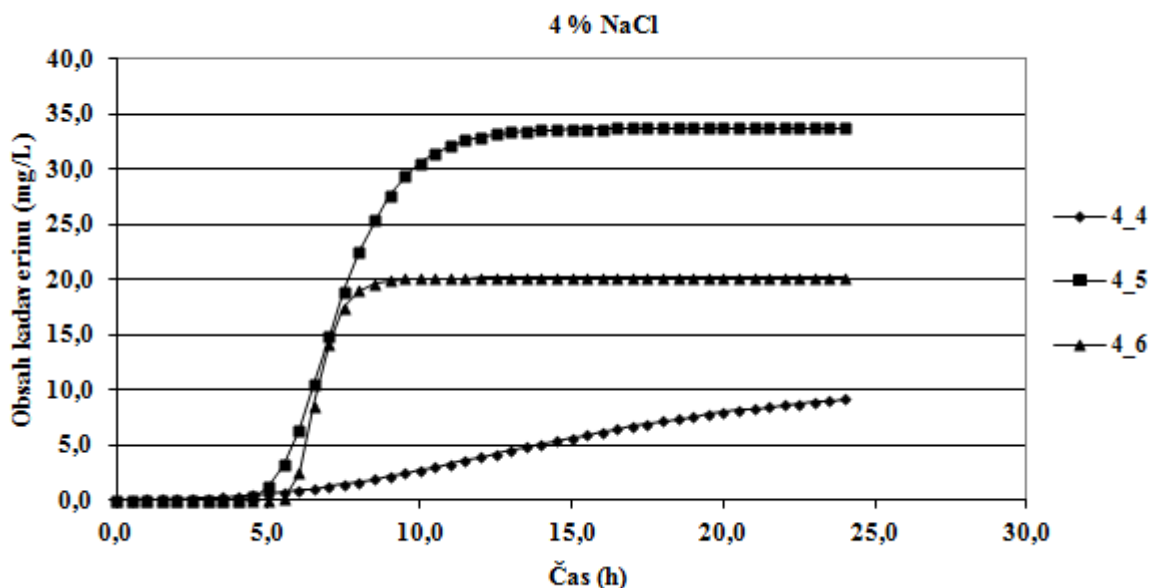
NaCl (%)	pH	$A_{BA}$ (mg.l <sup>-1</sup> )	$\mu_{BA}$ (mg.l <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )	$\lambda_{BA}$ (h)
0	4	26,4	2,0	14,6
	5	78,2	6,6	12,4
	6	161,2	11,3	12,8
1	4	34,7	8,8	17,2
	5	124,4	7,5	13,6
	6	301,8	14,7	16,3
3	4	92,8	4,2	15,2
	5	265,6	11,5	12,1
	6	174,3	9,6	14,9
4	4	21,9	2,5	26,5
	5	59,2	6,6	24,6
	6	26,5	5,8	33,4
5	4	2,7	0,2	24,8
	5	6,5	0,4	28,5
	6	7,2	0,5	25,7
6	4	1,0	0,2	26,9
	5	1,9	0,3	28,7
	6	1,9	0,3	26,8

### 7.2.3 Stanovení obsahu kadaverinu – 37 °C

Za podmínek kultivace při teplotě 37 °C trvala fáze lagu nejdéle u 5 % NaCl pH 5 (6,1 hodin) a 6 % NaCl pH 5 (6,2 hodin). V prostředí s obsahem soli 4, 5 a 6 % se obecně doba lagu pohybovala v rozmezí 5 – 6 hodin, přičemž se neprojevovalo, že by kyselost prostředí tyto hodnoty nějakým způsobem ovlivňovala. U koncentrací 0, 1 a 3 % NaCl, se v rámci všech pH, hodnoty  $\lambda_{BA}$  pohybovaly kolem hranice 3 hodin. Od ostatních se odlišovala pouze hodnota 2,2 hodiny, která byla současně dobou ze všech nejkratší a příslušela 0 % NaCl a pH 5. Ze získaných výsledků tak bylo patrné, že zvyšující se obsah soli lag fázi prodlužoval, zatímco účinek kyselosti nebyl jasně patrný.

Nejstrmější nárůst měla křivka vyjadřující tvorbu kadaverinu v podmínkách 1 % NaCl a pH 6. Důkazem toho byla hodnota  $\mu_{BA}$  20,5 mg.l<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>, která tak zaujímala první místo v rychlosti produkce kadaverinu. Značnou rychlostí byl kadaverin produkován také v médiu s obsahem 0 % NaCl a pH 6 (15,1 mg.l<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>) a 3 % NaCl a pH 5 (15,5 mg.l<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>). Jako optimální se tak jevílo prostředí s vyšším pH (5 a 6) a nižším obsahem soli (do 4 %).

Výrazný pokles byl zaznamenán u 4 % NaCl a pH 4, kde byla rychlost produkce snížena na  $0,6 \text{ mg.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$  což dokazuje Obr. 16. Ostatní křivky znázorňující produkci kadaverinu při  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  jsou součástí přílohy PVI.



Obr. 16. Produkce kadaverinu v podmínkách 4 % NaCl, pH 4, 5, 6 a teploty  $37 \text{ }^\circ\text{C}$

V podobném tempu byl kadaverin produkován také u koncentrace 5 a 6 % NaCl, přičemž nejnižší hodnoty  $\mu_{BA}$  náležely pH 4 a u obou koncentrací představovaly  $0,3 \text{ mg.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$ . Maximální rychlost produkce byla tedy ovlivňována jak kyselostí, tak obsahem soli v prostředí, s tím, že ve většině případů bylo nejvíce inhibiční pH 4 společně se zvyšující se koncentrací soli.

Nejvyšší koncentrace kadaverinu serácie vyprodukovala v prostředí s 0 % NaCl a pH 6 ( $150,3 \text{ mg.l}^{-1}$ ), dále 1 % NaCl pH 6 ( $139,0 \text{ mg.l}^{-1}$ ) a 3 % NaCl pH 6 ( $124,8 \text{ mg.l}^{-1}$ ). Hodnota  $100 \text{ mg.l}^{-1}$  přitom nebyla překročena u žádné další kombinace pH a NaCl. Oproti tomu bylo opravdu minimální množství ( $1,1 \text{ mg.l}^{-1}$ ) vytvořeno v médiu s přidavkem 6 % NaCl a pH 4 a o mnoho vyšší koncentrace nebyly vyprodukovány ani v podmínkách 5 a 6 % NaCl pH zbývajících, kde nepřesáhly hranici  $5 \text{ mg.l}^{-1}$ . Stejně jako u maximální rychlosti produkce se tak dalo vyvodit, že rostoucí pH a nízké koncentrace soli působily na tvorbu kadaverinu příznivě, následkem čehož se mohl kumulovat v tak vysokých

množstvích. Na druhou stranu v prostředí s vysokým obsahem soli a nízkým pH byla jeho kumulace znatelně potlačena.

*Tab. 9. Parametry Gompertzova modelu –  
produkce kadaverinu (37 °C)*

NaCl (%)	pH	$A_{BA}$ (mg.l <sup>-1</sup> )	$\mu_{BA}$ (mg.l <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )	$\lambda_{BA}$ (h)
0	4	16,6	2,6	2,6
	5	49,7	11,4	2,2
	6	150,3	15,1	2,7
1	4	32,8	11,2	3,4
	5	59,5	9,1	3,1
	6	139,0	20,5	2,8
3	4	59,4	5,4	3,3
	5	89,7	15,5	2,8
	6	124,8	14,5	2,9
4	4	10,8	0,6	5,5
	5	33,7	8,8	5,3
	6	20,2	13,3	5,9
5	4	3,1	0,3	5,2
	5	4,0	0,6	6,1
	6	4,3	0,6	5,3
6	4	1,1	0,3	5,4
	5	3,9	0,8	6,2
	6	1,6	0,6	5,6

#### 7.2.4 Dílčí diskuze

Vyšší teplota zpravidla umocňuje dekarboxylační reakce, následkem čehož jsou biogenní aminy produkovány ve větších množstvích. Naopak nízké teploty potlačují mikrobiální růst a enzymovou aktivitu, a tak je i kumulace biogenních aminů nižší. Dle dostupné literatury se optimální teplota pro tvorbu biogenních aminů pohybuje v rozmezí 20 – 37 °C [51, 52]. V našem experimentu tento údaj potvrzují délky lag fáze i maximální rychlosti produkce, avšak v případě maximálních produkováných koncentrací se výsledky poněkud rozcházejí.

Při teplotě 10 °C probíhaly lag fáze celkově nejdéle a v některých podmínkách dosahovaly až téměř 100 hodin. Jakmile se jednalo o kultivační teplotu 20 °C, fáze lagu se výrazně zkrátily a nejvyšší hodnoty dosahovaly přibližně 30 hodin. Za teploty 37 °C trvaly lag fáze nejkratší dobu a hodnoty  $\lambda_{BA}$  nepřesáhly hranici 6 hodin.

Stejný trend provázal i maximální rychlosti produkce. Obecně byl tedy kadaverin produkován nejpomaleji při 10 °C, kdy nejvyšší rychlosti dosahovaly přibližně 11 mg.l<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>. Při 20 °C bylo tempo o něco rychlejší a nejvyšší hodnoty  $\mu_{BA}$  se pohybovaly v rozmezí 11 – 15 mg.l<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> a při 37 °C byl kadaverin produkován nejrychleji, přičemž za optimálních podmínek hodnoty  $\mu_{BA}$  vystoupaly až k 20 mg.l<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>.

Překvapivých výsledků bylo dosaženo u maximálních produkovaných koncentrací, neboť zde příslušely nejvyšší hodnoty teplotě 10 °C a za vhodných podmínek dosahovaly až 350 mg.l<sup>-1</sup>. U teploty 20 °C to byly koncentrace nižší, dosahující přibližně 300 mg.l<sup>-1</sup> a teplotě 37 °C tentokrát náležely hodnoty nejnižší, nepřekračující 160 mg.l<sup>-1</sup>. Diskuze tohoto jevu je součástí kapitoly 7.3.

Vliv pH a NaCl na tvorbu kadaverinu byl v rámci všech teplot podobný. Lag fáze byla prodlužována se zvyšujícím se obsahem soli a jako nejvíce vyhovující se jevíly koncentrace NaCl 0, 1 a 3 %. Kyselost prostředí působila na dobu lag fáze různě a její vliv tak nebyl zejména u vyšších koncentrací NaCl jednoznačný. Co se týče rychlosti produkce kadaverinu, jako optimální se zdálo být prostředí s nižším obsahem soli a vyšším pH. V prostředí s pH 4 byla rychlost produkce většinou potlačena, stejně tak jako za podmínek 5 a 6 % NaCl. U takto vysokých koncentrací soli se účinek pH většinou ani neprojevil. Nejvyšší koncentrace kadaverinu byly vytvořeny za podmínek 0, 1 a 3 % NaCl, přičemž pH 4 působilo inhibičně a pH 6 naopak stimulačně. U vyšších koncentrací byly obsahy kadaverinu minimální a vliv pH nejednoznačný.

Podle toho, co uvádí dostupná literatura, by měla být dekarboxylázová aktivita mikroorganismů intenzivnější spíše v kyselém prostředí s pH optimem v rozmezí 4 – 5,5 [5]. Jelikož však serácie rostou lépe v prostředí s pH 5 – 9 [47], mohl by být v důsledku poklesu pH jejich růst potlačen a jejich dekarboxylázová aktivita utlumena, což v podstatě vysvětluje to, že v našem případě působilo pH 4 téměř vždy inhibičně. Dále literatura uvádí, že vysoká koncentrace soli většinou potlačuje tvorbu biogenních aminů, [17, 45, 50], s čímž se naše výsledky ztotožňují.

### 7.2.5 Stanovení obsahu putrescinu – 10 °C

Stejným způsobem jako byla sledována tvorba kadaverinu a faktory, které ji ovlivňovaly, byla pozorována za daných podmínek i produkce putrescinu.



Tab. 10. Parametry Gompertzova modelu –  
produkce putrescinu (10 °C)

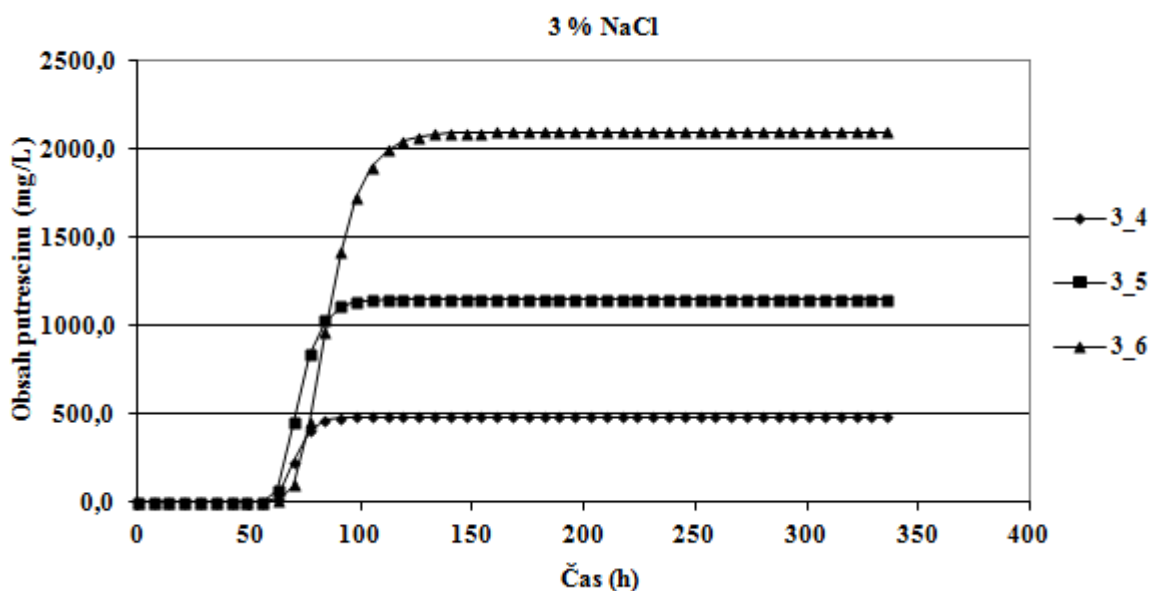
NaCl (%)	pH	$A_{BA}$ (mg.l <sup>-1</sup> )	$\mu_{BA}$ (mg.l <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )	$\lambda_{BA}$ (h)
0	4	209,7	2,6	35,3
	5	789,4	39,3	52,6
	6	1336,0	81,1	65,8
1	4	433,0	40,5	103,9
	5	1647,9	52,6	64,7
	6	1415,3	85,6	51,1
3	4	485,1	36,4	63,7
	5	1148,3	65,4	63,2
	6	2096,8	76,1	71,3
4	4	115,0	3,4	111,0
	5	584,3	25,1	111,0
	6	438,8	41,2	86,7
5	4	9,2	1,8	96,2
	5	44,2	2,9	103,8
	6	55,6	2,8	80,9
6	4	7,6	1,4	104,6
	5	26,1	1,7	100,8
	6	1,8	1,4	104,8

Z průběhu křivek sestavených pro kultivační teplotu 10 °C vyplynulo, že lag fázi prodlužovala rostoucí koncentrace soli, zatímco účinek kyselosti nebyl úplně zřetelný. V některých případech byla totiž lag fáze nejkratší při pH 4, v jiných naopak při pH 5 či 6. Nejdéle trvala fáze lagu v podmínkách 4 % NaCl pH 4 a 5, kdy byla naměřena u obou těchto kombinací hodnota stejná, odpovídající 111,0 hodinám. V podobném tempu probíhala lag fáze také u koncentrací 5 a 6 % NaCl, přičemž se hodnoty  $\lambda_{BA}$ , bez ohledu na kyselost prostředí, pohybovaly v intervalu zhruba 90 – 105 hodin. U koncentrací nižších (tj. 0, 1 a 3 % NaCl) doba lagu trvala průměrně kolem 60 hodin, čemuž se vymykala hodnota 103,9 hodin náležící kombinaci 1 % NaCl a pH 4 a také hodnota 35,3 hodin, která byla současně dobou nejkratší a příslušela 0 % NaCl a pH 4.

Nejrychleji byl putrescin produkován v prostředí s 0 % NaCl pH 6 (81,1 mg.l<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>) a 1 % NaCl pH 6 (85,6 mg.l<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>). Koncentrace soli 3 % a vyšší produkci postupně zpomalovaly až na hodnoty  $\mu_{BA}$  nepřesahující 3 mg.l<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>, které náležely zpravidla 5 a 6 % NaCl. Jako nejméně vhodné se zdálo být prostředí s 6 % NaCl pH 4 a 6, neboť zde produkce probíhala nejpomaleji, rychlostí 1,4 mg.l<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>. Produkci putrescinu však netlumil

jenom vysoký obsah soli, ale také kyselost prostředí, což dokazuje skutečnost, že až do koncentrace 4 % NaCl se hodnoty nejnižší vyskytovaly u pH 4 a naopak nejvyšší u pH 6. Účinek kyselosti se projevil hlavně v médiu s 0 a 4 % NaCl a pH 4, kde byly v porovnání s ostatními zaznamenány velmi nízké rychlosti ( $2,6$  a  $3,4$   $\text{mg.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$ ).

Při  $10$  °C byly maximální produkované koncentrace putrescinu velmi vysoké, a to především v prostředí s 0, 1 a 3 % NaCl při pH 5 a 6, kde se hodnoty  $A_{BA}$  pohybovaly v rozmezí  $1000 - 2000$   $\text{mg.l}^{-1}$ . Vůbec největší množství putrescinu ( $2096,8$   $\text{mg.l}^{-1}$ ) vyprodukovala serácie za podmínek 3 % NaCl a pH 6 (viz Obr. 17; ostatní křivky znázorňující produkci putrescinu při  $10$  °C jsou součástí přílohy PVII). Extrémním protikladem byly poté hodnoty  $A_{BA}$  příslušící 5 a 6 % NaCl, neboť ty se pohybovaly v řádech jednotek, maximálně desítek. Nejmenší koncentrace přitom náležela 6 % NaCl a pH 6 a činila  $1,8$   $\text{mg.l}^{-1}$ . Ze získaných poznatků tak bylo možné usoudit, že koncentrace soli do 3 % ovlivňovaly tvorbu putrescinu příznivě, kdežto vyšší koncentrace už ji potlačovaly. Inhibičně působilo také pH 4, neboť v takto kyselém prostředí byly u všech koncentrací NaCl s výjimkou 6 % hodnoty nejnižší.



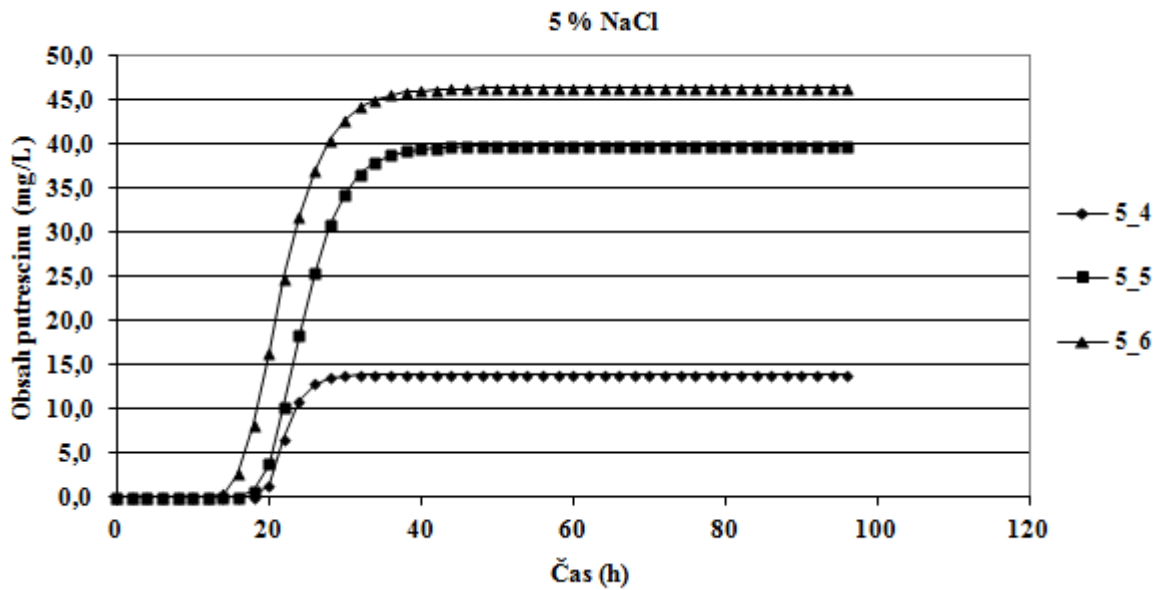
Obr. 17. Produkce putrescinu v podmínkách 3 % NaCl, pH 4, 5, 6 a teploty  $10$  °C

### 7.2.6 Stanovení obsahu putrescinu – 20 °C

Stejně jako u předchozí teploty, i zde trvala fáze lagu nejdéle v prostředí s 4 % přidavkem soli a pH 5, a to 24,4 hodin. Obecně hodnoty  $\lambda_{BA}$ , které příslušely koncentracím 4, 5 a 6 % NaCl, se ve všech pH pohybovaly kolem 20 hodin, s výjimkou 5 % NaCl a pH 6, kde byla lag fáze kratší (16,2 hodin). Také v nižších koncentracích se od sebe doby lag fáze nijak výrazně nelišily a probíhaly v rozmezí 9 – 14 hodin. Nejkratší doba přitom náležela 0 % NaCl a pH 4 a trvala 9,3 hodin. Od těchto výsledků se odchylovala pouze hodnota 18,6 hodin, které bylo dosaženo za podmínek 1 % NaCl a pH 4. Bylo tak zřejmé, že až na výjimky, probíhala fáze lagu u všech kombinací pH a NaCl přibližně na stejné úrovni, s tím rozdílem, že do 3 % NaCl byly doby trvání kratší, zatímco od 4 % NaCl naopak delší. Vliv kyselosti prostředí nebyl v tomto případě jednoznačný.

Maximální rychlost produkce se vyvíjela prakticky stejným způsobem jako při 10 °C. Jako nejvhodnější se opět projevilo prostředí s 0 a 1 % NaCl a pH 6, kdy byl putrescin produkován rychlostí přibližně  $151,0 \text{ mg.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$ . Velmi rychlá tvorba byla vyzorována také v médiu s obsahem soli 3 %, avšak od této koncentrace dále se začaly hodnoty postupně snižovat. Nejpomaleji byl putrescin produkován za podmínek 6 % NaCl a pH 4, kdy rychlost činila pouze  $2,2 \text{ mg.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$ . Z výsledků tak bylo patrné, že nižší koncentrace soli působily na tvorbu putrescinu příznivě, zatímco koncentrace 4 % a vyšší ji postupně potlačovaly. Zřetelný byl také účinek kyselosti, neboť nejnižší hodnoty byly ve všech případech zjištěny v prostředí s pH 4. V důsledku vysoké kyselosti byla produkce potlačena zejména v podmínkách 0 a 4 % NaCl a pH 4, o čemž vypovídaly velmi nízké hodnoty  $\mu_{BA}$  nepřekračující  $7 \text{ mg.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$ .

Největší množství putrescinu byla vyprodukována za podmínek 1 a 3 % NaCl pH 5 a 6, přičemž nejvyšší hodnota, příslušící 3 % NaCl a pH 6, sahala až ke  $2000 \text{ mg.l}^{-1}$ . Na druhou stranu minimální koncentrace byly vytvořeny v prostředí s vysokým obsahem soli, kdy hodnoty  $A_{BA}$  nepřesáhly hranici  $50 \text{ mg.l}^{-1}$  (viz Obr. 18; ostatní křivky znázorňující produkci putrescinu při 20 °C jsou součástí přílohy PVIII). Obzvláště nízká hodnota  $A_{BA}$  ( $2,7 \text{ mg.l}^{-1}$ ) byla zaznamenána u koncentrace soli 6 % a pH 4, což v podstatě poukazovalo na to, že vysoký obsah soli a nízké pH tvorbě putrescinu bránily.



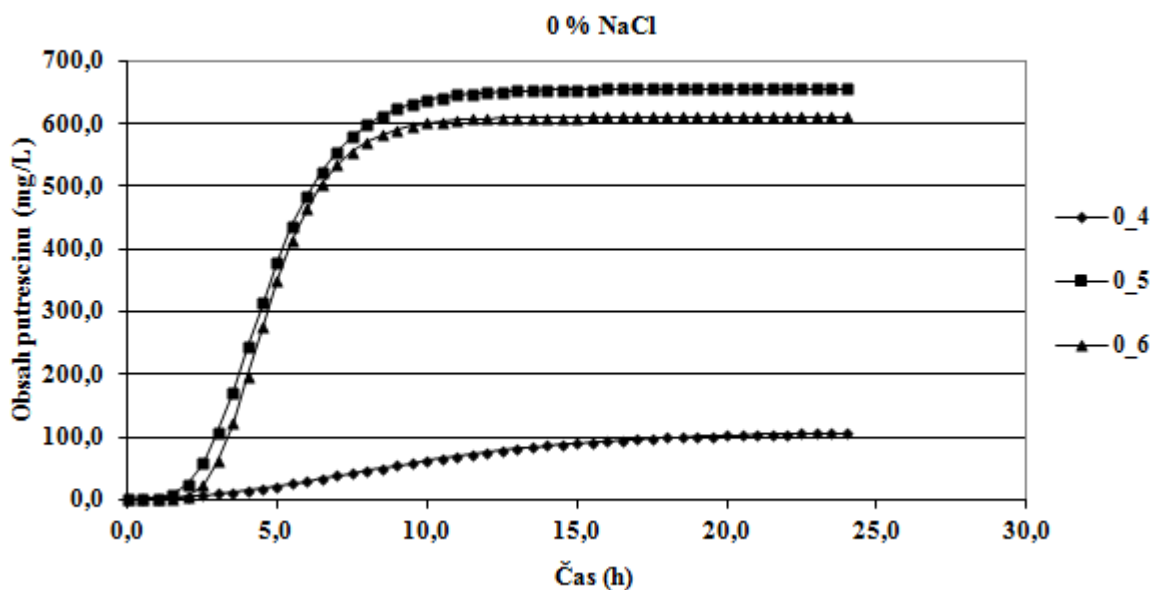
Obr. 18. Produkce putrescinu v podmínkách 5 % NaCl, pH 4, 5, 6 a teploty 20 °C

Tab. 11. Parametry Gompertzova modelu –  
produkce putrescinu (20 °C)

NaCl (%)	pH	$A_{BA}$ (mg.l <sup>-1</sup> )	$\mu_{BA}$ (mg.l <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )	$\lambda_{BA}$ (h)
0	4	191,7	4,8	9,3
	5	605,1	79,5	10,0
	6	922,6	150,9	11,7
1	4	344,0	80,7	18,6
	5	1042,9	107,5	13,0
	6	1075,9	151,0	9,7
3	4	362,4	54,7	14,0
	5	1008,7	137,9	11,8
	6	1968,9	127,1	13,6
4	4	106,0	6,1	21,4
	5	522,8	65,8	24,4
	6	404,4	78,3	19,3
5	4	13,9	2,9	19,7
	5	39,8	4,1	19,5
	6	46,4	4,4	16,2
6	4	2,7	2,2	19,7
	5	17,2	3,0	20,0
	6	15,5	2,8	19,8

### 7.2.7 Stanovení obsahu putrescinu – 37 °C

Během kultivace při 37 °C trvala fáze lagu nejdéle v prostředí s 4, 5 a 6 % NaCl, přičemž se hodnoty pohybovaly zhruba v intervalu 4 – 6 hodin. Horní hranice intervalu (6,1 hodin) byla dobou ze všech nejdelší a příslušela 6 % NaCl a pH 5. Z průběhu křivek tak vyplývalo, že s rostoucím obsahem soli se doba lag fáze pomalu prodlužovala, ačkoliv bylo zajímavé, že v podmínkách s 4 % přidavkem soli byly zjištěny hodnoty  $\lambda_{BA}$  vyšší než v podmínkách s 5 % NaCl. V rámci nižších koncentrací, tj. do 3 % NaCl, fáze lagu neprobíhala déle než 4 hodiny a nejkratší doba (2,3 hodiny) tentokrát náležela 0 % NaCl a pH 5. Od těchto údajů se odlišovala pouze hodnota příslušící koncentraci 1 % NaCl a pH 4, která činila 5,4 hodin. Dále bylo možné konstatovat, že u většiny koncentrací trvala fáze lagu nejdéle při pH 4, s výjimkou koncentrace nejnižší a nejvyšší.



Obr. 19. Produkce putrescinu v podmínkách 0 % NaCl, pH 4, 5, 6 a teploty 37 °C

Rychlost produkce putrescinu byla ovlivňována jak vysokým obsahem soli v prostředí, tak i kyselostí prostředí. Výrazný skok byl zaznamenán u 5 a 6 % NaCl, neboť zde hodnoty nepřesáhly hranici  $10 \text{ mg.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$  a nejnižší rychlost připadla na 6 % NaCl a pH 4, kdy činila pouze  $4,0 \text{ mg.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$ . Mimoto byly velmi nízké rychlosti, stejně jako u dvou předchozích teplot, pozorovány také v podmínkách 0 a 4 % NaCl a pH 4, kde se pohybovaly kolem  $7 - 8 \text{ mg.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$  a exponenciální fáze zde nebyla téměř znatelná (viz Obr. 19; ostatní křivky

znázorňující produkci putrescinu při 37 °C jsou součástí přílohy PIX). V případě ostatních kombinací byl putrescin produkován převážně rychlostí vyšší jak 100 mg.l<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>, přičemž nejvyšších hodnot  $\mu_{BA}$  bylo dosaženo u 1 % NaCl pH 6 (251,4 mg.l<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>) a 3 % NaCl pH 6 (201,2 mg.l<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>). Z těchto poznatků lze vyvodit, že vysoký obsah soli a nízké pH produkci tlumily.

Maximální produkované koncentrace putrescinu měly rostoucí tendenci až do 3 % NaCl, přičemž největší množství (814,2 mg.l<sup>-1</sup>) bylo vytvořeno v podmínkách 3 % NaCl a pH 6. Koncentrace soli vyšší než 3 % produkci postupně inhibovaly a hodnoty  $A_{BA}$  tak začaly mít klesající charakter. Jako nejvíce inhibiční se opět projeví koncentrace soli 5 a 6 %, neboť v těchto podmínkách nepřesáhly hodnoty  $A_{BA}$  hranici 30 mg.l<sup>-1</sup> a nejmenší množství (7,7 mg.l<sup>-1</sup>) seracie vyprodukovala v médiu s 6 % NaCl a pH 4. Z výsledků tak bylo patrné, že nižší koncentrace soli (0, 1 a 3 %) působily na tvorbu putrescinu příznivě, naproti tomu vysoké koncentrace ji potlačovaly. Účinek kyselosti byl zřejmý pouze u pH 4, neboť v takto kyselém prostředí byly hodnoty zpravidla nejnižší.

Tab. 12. Parametry Gompertzova modelu –  
produkce putrescinu (37 °C)

NaCl (%)	pH	$A_{BA}$ (mg.l <sup>-1</sup> )	$\mu_{BA}$ (mg.l <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )	$\lambda_{BA}$ (h)
0	4	109,6	8,5	2,5
	5	655,0	143,2	2,3
	6	609,9	159,1	2,8
1	4	268,0	136,0	5,4
	5	608,4	129,0	2,8
	6	709,0	251,4	2,9
3	4	399,4	72,7	3,7
	5	745,5	189,5	3,0
	6	814,2	201,2	3,0
4	4	66,5	7,1	5,8
	5	301,5	113,0	5,7
	6	285,3	151,0	5,7
5	4	14,3	4,5	5,1
	5	23,2	7,2	4,0
	6	41,2	5,4	4,3
6	4	7,7	4,0	6,0
	5	25,9	10,0	6,1
	6	8,8	6,2	5,8

### 7.2.8 Dílčí diskuze

Vliv teploty na tvorbu putrescinu byl prakticky stejný jako u kadaverinu. Lag fáze trvaly podle očekávání nejdéle při 10 °C, přičemž se nejvyšší hodnoty  $\lambda_{BA}$  pohybovaly kolem 100 hodin. Při teplotě 20 °C byly doby lagu o poznání kratší a dosahovaly v některých případech až 20 hodin a teplota 37 °C zahrnovala fáze lagu nejkratší, nepřesahující 7 hodin.

Podobně se vyvíjela i maximální rychlost produkce putrescinu, neboť obecně nejpomaleji byl putrescin produkován při 10 °C, kdy rychlosti nebyly vyšší jak 90 mg.l<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>. Při teplotě 20 °C nejvyšší hodnoty  $\mu_{BA}$  vystoupaly až k 150 mg.l<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> a při teplotě 37 °C byla překročena hranice 250 mg.l<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>. Tyto výsledky tedy odpovídají faktu, že dekarboxylázová aktivita se s narůstající teplotou zvyšuje a teplotní optimum se nachází v rozmezí 20 – 37 °C [51, 52].

Jiná situace nastala u maximálních produkovaných koncentrací, kdy naopak největší množství příslušela teplotě 10 °C a za vhodných podmínek dosahovala až 2000 mg.l<sup>-1</sup>. U teploty 20 °C to byly hodnoty  $A_{BA}$  o něco málo nižší a v podmínkách 37 °C byl putrescin produkován v nejmenších koncentracích, nepřekračujících 900 mg.l<sup>-1</sup>. Diskuze tohoto jevu je opět součástí kapitoly 7.3.

V rámci všech teplot byla lag fáze ovlivňována především obsahem soli v prostředí, neboť se zvyšující se koncentrací soli se doba lag fáze prodlužovala. Účinek kyselosti nebyl při teplotách 10 a 20 °C jednoznačný, zatímco při 37 °C u většiny koncentrací trvala fáze lagu nejdéle v prostředí s pH 4. Vysoký obsah soli a nízké pH tlumily také rychlost produkce putrescinu. Naopak jako optimální se pro všechny tři teploty jevílo prostředí s 0, 1 a 3 % NaCl a pH 6, kde byl putrescin produkován nejvyšší rychlostí. Všechny teploty spojovala také skutečnost, že v podmínkách 0 a 4 % NaCl a pH 4 byly v porovnání s ostatními zjištěny velmi nízké hodnoty  $\mu_{BA}$ . Tento jev mohla zapříčinit právě vysoká kyselost prostředí, která tak produkci inhibovala. Celkově nejvyšší koncentrace putrescinu byly vytvořeny v podmínkách s nižším obsahem soli (do 3 %) a pH 5 a 6. Vyšší koncentrace soli stejně jako pH 4 produkci putrescinu postupně potlačovaly a hodnoty  $A_{BA}$  tak klesaly.

Stejně jako u kadaverinu lze poznamenat, že ačkoliv literatura uvádí optimální pH pro dekarboxylaci v rozmezí 4 – 5,5 [5], tak v případě serácie jsou tyto hodnoty posunuty

a pH 4 působí většinou inhibičně. S tvrzením, že vysoké koncentrace soli zpravidla potlačují tvorbu biogenních aminů [17, 45, 50], se výše uvedené výsledky shodují.

### 7.3 Yield faktor

Yield faktor udává množství biogenních aminů, které vyprodukovala 1 buňka (resp. 1 kolonie). Zohledňuje produkci biogenních aminů vzhledem k růstu mikroorganismů (vyjadřuje produkci biogenních aminů na počet buněk). Platí tedy, že čím vyšší je hodnota  $Y_{BA/CFU}$ , tím více biogenních aminů jedna buňka vyprodukovala. Vysoká hodnota  $Y_{BA/CFU}$  však nemusí vždy znamenat, že je bakteriální růst či produkce biogenních aminů ideální [80].

Yield faktor, tedy absolutní množství produkovaného biogenního aminu (kadaverinu a putrescinu) vztahované na CFU, byl vypočítán podle následujících vztahů:

$$KAD_t = KAD_0 + Y_{KAD/CFU} \cdot (N_t - N_0) \cdot 1000$$

$$PUT_t = PUT_0 + Y_{PUT/CFU} \cdot (N_t - N_0) \cdot 1000$$

kde

$KAD_t$ ,  $KAD_0$ ,  $PUT_t$  a  $PUT_0$  ( $\text{mg.l}^{-1}$ ) jsou koncentrace kadaverinu a putrescinu v čase  $t$  a 0

$N_t$  a  $N_0$  vyjadřují  $\text{CFU.ml}^{-1}$  v čase  $t$  a 0

$Y_{KAD/CFU}$  a  $Y_{PUT/CFU}$  ( $\text{mg.10}^9.\text{CFU}^{-1}$ ) jsou Yield faktory pro kadaverin a putrescin.

V tabulkách 13 a 14 jsou uvedeny hodnoty yield faktoru vypočtené pro kadaverin a putrescin ve všech teplotách, pH a NaCl.

Dle tabulky pro kadaverin můžeme říci, že hodnoty  $Y_{KAD/CFU}$  byly zpravidla nejvyšší při pH 4 a ve většině případů nejnižší při pH 6. Ve srovnání s tím, jak bakterie rostla a produkovala kadaverin, je to přesně naopak. To znamená, že za podmínek pH 4 byly růst bakterie i produkce kadaverinu potlačeny, zatímco prostředí s pH 6 jim vyhovovalo. Příkladem takové situace mohou být hodnoty náležící 0 % NaCl stanovené pro 10 °C. V případě yield faktoru příslušela docela vysoká hodnota pH 4, která činila  $7,68 \text{ mg.10}^9.\text{CFU}^{-1}$ . Pro růst seracie či produkci kadaverinu se však takto kyselé prostředí neprojevovalo jako příliš vhodné, o čemž také vypovídaly relativně nízké hodnoty asymptot ( $A = 3,15$ ;  $A_{BA} = 34,7 \text{ mg.l}^{-1}$ ). Naproti tomu nejvyšší hodnota nárůstu buněk ( $A = 7,61$ ),



stejně jako vysoká koncentrace kadaverinu ( $A_{BA} = 260,0 \text{ mg.l}^{-1}$ ) byly zjištěny v podmínkách 0 % NaCl a pH 6. V takovém prostředí byl yield faktor o poznání nižší a představoval  $0,21 \text{ mg.10}^9 \cdot \text{CFU}^{-1}$ . Je tedy zajímavé, že ačkoliv v médiu s 0 % NaCl a pH 6 byly hodnoty nárůstu buněk i koncentrace biogenních aminů vysoké, hodnota yield faktoru byla nízká. Možným odůvodněním je to, že bakterie produkuje biogenní aminy hlavně ve stresu, za nepříznivých podmínek [48, 80]. Pokud se však nachází v podmínkách optimálních, dobře roste, a tudíž primárně nepotřebuje tvořit biogenní aminy. Vzhledem k velkému počtu buněk je ale celková produkce biogenních aminů vysoká, ovšem po přepočtu na jednu buňku se vyprodukované množství zredukuje, což se projeví nízkým  $Y_{KAD/CFU}$ . Podobný stav nastal například u teploty  $20 \text{ }^\circ\text{C}$  v podmínkách 1 % NaCl a pH 6, kdy byl yield faktor velmi nízký ( $0,67 \text{ mg.10}^9 \cdot \text{CFU}^{-1}$ ), zatímco nárůst buněk i maximální koncentrace kadaverinu dosahovaly hodnot nejvyšších.

Tab. 13. Hodnoty yield faktoru pro kadaverin

		$Y_{KAD/CFU} [\text{mg.10}^9 \cdot \text{CFU}^{-1}]$		
NaCl (%)	pH	10 °C	20 °C	37 °C
0	4	$7,68 \pm 0,59$	$2,14 \pm 0,11$	$1,06 \pm 0,08$
	5	$0,43 \pm 0,03$	$0,34 \pm 0,02$	$0,09 \pm 0,00$
	6	$0,21 \pm 0,01$	$0,26 \pm 0,02$	$0,07 \pm 0,00$
1	4	$3,42 \pm 0,32$	$3,07 \pm 0,34$	$1,65 \pm 0,09$
	5	$0,60 \pm 0,02$	$0,70 \pm 0,04$	$0,17 \pm 0,01$
	6	$0,67 \pm 0,03$	$0,67 \pm 0,00$	$0,13 \pm 0,01$
3	4	$29,01 \pm 1,65$	$12,04 \pm 0,82$	$4,03 \pm 0,30$
	5	$16,80 \pm 0,46$	$6,39 \pm 0,37$	$3,11 \pm 0,09$
	6	$10,83 \pm 0,72$	$5,21 \pm 0,20$	$2,98 \pm 0,19$
4	4	$26,32 \pm 1,38$	$12,33 \pm 0,86$	$3,61 \pm 0,22$
	5	$9,97 \pm 0,49$	$5,02 \pm 0,35$	$2,68 \pm 0,14$
	6	$5,54 \pm 0,16$	$2,96 \pm 0,09$	$1,62 \pm 0,06$
5	4	$25,51 \pm 1,40$	$5,68 \pm 0,39$	$2,33 \pm 0,24$
	5	$5,32 \pm 0,54$	$4,81 \pm 0,33$	$2,38 \pm 0,17$
	6	$3,27 \pm 0,13$	$1,14 \pm 0,07$	$0,46 \pm 0,03$
6	4	$15,42 \pm 1,16$	$5,17 \pm 0,26$	$1,84 \pm 0,16$
	5	$3,42 \pm 0,11$	$1,52 \pm 0,13$	$1,11 \pm 0,05$
	6	$2,97 \pm 0,11$	$2,00 \pm 0,11$	$1,05 \pm 0,07$

Jiný případ byl zaznamenán u teploty  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  v prostředí s 5 % NaCl a pH 6. Za takových podmínek byl nízký jednak yield faktor, jehož hodnota činila  $0,46 \text{ mg.10}^9 \cdot \text{CFU}^{-1}$ , dále koncentrace kadaverinu, neboť těmto podmínkám příslušela hodnota  $A_{BA} 4,3 \text{ mg.l}^{-1}$ ,

přičemž nejvyšší koncentrace obecně dosahovaly až  $150 \text{ mg.l}^{-1}$  a v porovnání s ostatními hodnotami nebyl ani nárůst buněk vysoký. Tento jev lze přisoudit tomu, že koncentrace soli 5 % je dost vysoká a bakterie v takovém prostředí špatně roste. Využívá aminokyseliny raději jako zdroj energie a neprodukuje tak biogenní aminy [81]. Yield faktor je tím pádem také nízký.

Stejně situace, které se projevily u kadaverinu, provázely také růst serácie a její produkci putrescinu. Vysoké asymptoty a nízký yield faktor ( $2,92 \text{ mg.10}^9 \cdot \text{CFU}^{-1}$ ) byly zaznamenány například při  $20 \text{ }^\circ\text{C}$  v podmínkách 1 % NaCl a pH 6. Relativně nízké hodnoty všech tří porovnávaných parametrů příslušely teplotě  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ , koncentraci soli 6 % a pH 6. V případě 3 % NaCl a pH 5 nastal při teplotě  $20 \text{ }^\circ\text{C}$  dokonce jev opačný, a to takový, že jak hodnota  $Y_{\text{PUT/CFU}}$ , tak hodnota nárůstu buněk i koncentrace putrescinu byly vysoké.

Tab. 14. Hodnoty yield faktoru pro putrescin

		$Y_{\text{PUT/CFU}} [\text{mg.10}^9 \cdot \text{CFU}^{-1}]$		
NaCl (%)	pH	$10 \text{ }^\circ\text{C}$	$20 \text{ }^\circ\text{C}$	$37 \text{ }^\circ\text{C}$
0	4	$45,67 \pm 2,94$	$14,77 \pm 0,71$	$5,76 \pm 0,21$
	5	$4,29 \pm 0,27$	$2,67 \pm 0,16$	$1,16 \pm 0,07$
	6	$1,09 \pm 0,09$	$1,49 \pm 0,15$	$0,88 \pm 0,05$
1	4	$44,84 \pm 1,50$	$38,29 \pm 3,98$	$13,51 \pm 1,06$
	5	$7,17 \pm 0,37$	$5,91 \pm 0,22$	$1,72 \pm 0,17$
	6	$3,19 \pm 0,19$	$2,92 \pm 0,21$	$0,71 \pm 0,06$
3	4	$81,05 \pm 7,68$	$47,74 \pm 3,59$	$31,26 \pm 1,59$
	5	$66,28 \pm 2,88$	$39,02 \pm 2,05$	$26,00 \pm 2,18$
	6	$65,75 \pm 4,52$	$33,05 \pm 1,75$	$21,07 \pm 1,27$
4	4	$131,45 \pm 6,46$	$59,38 \pm 1,83$	$31,09 \pm 2,09$
	5	$90,05 \pm 4,79$	$44,40 \pm 4,99$	$24,33 \pm 1,95$
	6	$75,69 \pm 5,88$	$45,79 \pm 2,84$	$22,84 \pm 0,42$
5	4	$70,08 \pm 5,28$	$29,69 \pm 1,04$	$18,52 \pm 1,10$
	5	$63,61 \pm 3,62$	$31,23 \pm 1,75$	$17,03 \pm 0,95$
	6	$22,81 \pm 1,63$	$7,55 \pm 0,66$	$13,50 \pm 0,74$
6	4	$44,49 \pm 2,94$	$14,12 \pm 0,60$	$13,22 \pm 0,54$
	5	$36,60 \pm 3,17$	$14,22 \pm 1,01$	$7,99 \pm 0,77$
	6	$19,71 \pm 0,67$	$16,22 \pm 1,11$	$5,85 \pm 0,30$

I z tabulky pro putrescin vyplývá, že nejvyšší hodnoty  $Y_{\text{PUT/CFU}}$  patřily pH 4. Vysvětlení může spočívat v tom, že kyselé prostředí je pro růst bakterie méně vhodné a ta proto na obranu proti překyselení produkuje biogenní aminy [48, 51]. Zvláštní situace nastala při  $10 \text{ }^\circ\text{C}$  v prostředí s 5 % NaCl a pH 4, kde byl vypočítán vysoký yield faktor

(70,08 mg.10<sup>9</sup>.CFU<sup>-1</sup>), i když vyprodukované množství putrescinu, stejně jako nárůst buněk byly nízké. V tomto případě bakterie špatně rostla a celkově bylo vytvořeno malé množství putrescinu. Pokud však toto zdánlivě malé množství vztáhneme k malému počtu buněk, může vzniknout docela vysoký  $Y_{PUT/CFU}$ , především pokud se buňky snaží bránit kyselému prostředí.

Na základě zjištěných poznatků lze říci, že mikroorganismy se za stresových podmínek chovají odlišně, někdy až nepředvídatelně, než za podmínek normálních. Můžou produkovat biogenní aminy jako ochranu před nepříznivými vlivy, anebo naopak může být jejich produkce potlačena v důsledku spotřeby aminokyselin jako zdroje energie. Takových důvodů může být několik, a jelikož se jedná o živý systém, tak ne vždy se dají jednotlivé situace logicky vysvětlit [48, 80, 81, 82].

## ZÁVĚR

Biogenní aminy jsou organické sloučeniny, které se běžně vyskytují v organismu člověka, kde vykonávají významné biologické funkce. V nízkých koncentracích jsou přirozenou součástí mnoha potravin. Pokud jsou však přijímány potravou v nadbytečném množství, mohou vyvolat spoustu nepříznivých reakcí a způsobit tak vážné zdravotní potíže. To je jeden z hlavních důvodů, proč je v současnosti sledování biogenních aminů v potravinách velmi aktuální.

Obsah biogenních aminů v potravinách může být ovlivňován řadou faktorů. Důležitá je především kvalita výchozích surovin, hygiena při výrobě, teplota a doba skladování či zrání a v neposlední řadě také přítomnost dekarboxyláza pozitivních mikroorganismů. Dekarboxylázovou aktivitou se vyznačuje i bakterie *Serratia marcescens*, která byla hlavním předmětem tohoto experimentu.

Práce se zabývala sledováním účinků teploty, pH a obsahu NaCl na růst a dekarboxylázovou činnost serácie. Růst bakterie byl sledován pomocí růstových křivek a dekarboxylázová aktivita, tedy produkce biogenních aminů, byla stanovena prostřednictvím vysoce účinné kapalinové chromatografie. Práce byla zaměřena na produkci dvou biogenních aminů, a to kadaverinu a putrescinu.

Ze všech zjištěných informací bylo možné vyvodit následující závěry:

- jako optimální se pro růst serácie projevila teplota 37 °C, naopak teplota 10 °C nebyla pro růst vhodná,
- vyšší pH prostředí a nízké koncentrace soli působily na bakteriální růst příznivě, zatímco vysoké koncentrace soli a nízké pH jej inhibovaly,
- mezi vhodné kombinace se tak řadily koncentrace soli 0 a 1 % a pH 5 a 6, naopak mezi nepříznivé 6 % NaCl a pH 4,
- produkce kadaverinu i putrescinu byla všemi faktory ovlivňována téměř stejně,
- vysoký obsah soli a nízké pH tlumily produkci biogenních aminů,
- prostředí s obsahem soli do 3 % a pH 5 a 6 se u obou aminů ukázalo jako nejvhodnější,

- ačkoliv byly při 37 °C biogenních aminy produkovány nejrychleji, maximální produkované koncentrace byly nejnižší (pravděpodobně z důvodu, že bakterie v podmínkách vhodných pro růst biogenní aminy nepotřebovala),
- nejvyšší produkované koncentrace obou biogenních aminů byly zaznamenány překvapivě při 10 °C (což pravděpodobně souvisí se stresovým chováním bakterie),
- celkově vyprodukovala serácie větší množství putrescinu než kadaverinu,
- množství biogenních aminů, které vyprodukovala jedna buňka, vždy neodpovídalo celkovému vytvořenému množství anebo růstu bakterie, což lze vysvětlit např. využíváním aminokyselin jako zdroje energie místo prekursoru biogenních aminů, či nepředvídatelným chováním bakterie ve stresových situacích (nízká kultivační teplota, vysoký obsah NaCl a nízké pH).

Jelikož může výskyt biogenních aminů představovat riziko téměř ve všech fázích potravinářské výroby, je nutné sledovat nejen jejich obsah v potravinách, ale také faktory ovlivňující jejich tvorbu, což bylo náplní této diplomové práce.

**SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY**

- [1] BUŇKOVÁ, L., F. BUŇKA, P. LUKEŠOVÁ, V. MRKVIČKA, M. DOLEŽALOVÁ a S. KRÁČMAR. Produkce biogenních aminů bakteriemi izolovanými z povrchu drůbeže. *Potravinářstvo*. 2009, roč. 3, č. 2, s. 7-11. ISSN 1338-0230.
- [2] DOSEDĚL, L., L. KALHOTKA, M. VYLETĚLOVÁ a M. NĚMCOVÁ. Vliv teploty a času na dekarboxylázovou aktivitu *Bacillus licheniformis* z drůbežích brojlerů. In: *Sborník příspěvků z II. Konference studentské vědecké a odborné činnosti*. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita, 2009, s. 9.
- [3] BUŇKOVÁ, L., F. BUŇKA, E. POLLAKOVÁ, T. PODEŠVOVÁ, V. DRÁB a S. KRÁČMAR. Vliv aerobního/anaerobního prostředí na dekarboxylázovou aktivitu vybraných bakterií mléčného kvašení. *Potravinářstvo*. 2010, roč. 4, č. 2, s. 5-7. ISSN 1338-0230.
- [4] GREIF, G., M. GREIFOVÁ, J. DVORAN, J. KAROVIČOVÁ a V. BUCHTOVÁ. Štúdium rastu a produkcie biogenných aminov niektorými mikroorganizmami za modelových podmienok. *Czech Journal of Food Science*. 1999, roč. 17, č. 1, s. 15-21. ISSN 1212-1800.
- [5] SILLA SANTOS, María Hortensia. Biogenic amines: their importance in foods. *International Journal of Food Microbiology*. 1996, roč. 29, č. 2-3, s. 213-231. ISSN 0168-1605.
- [6] SMĚLÁ, D., P. PECHOVÁ, T. KOMPRDA, B. KLEJDUS a V. KUBÁŇ. Chromatografické stanovení biogenních aminů v trvanlivých salámech během fermentace a skladování. *Chemické listy*. 2004, roč. 98, č. 7, s. 432-437. ISSN 0009-2770.
- [7] DIČÁKOVÁ, Zuzana a Eva DUDRIKOVÁ. Biogénne amíny ako chemické nebezpečenstvo. In: *Rizikové faktory potravinového reťazca: Zborník z medzinárodnej konferencie*. Nitra: Slovenská poľnohospodárska univerzita, 2006, s. 66-67. ISBN 80-8069-760-4.

- [8] KOHAJDOVÁ, Zlatica a Jolana KAROVIČOVÁ. Biogénne amíny – vznik, metódy stanovenia a výskyt v potravinách. *Bulletin potravinárskeho výskumu*. 2001, roč. 40, č. 2, s. 75-89. ISSN 0231-9950.
- [9] VELÍŠEK, Jan a Jana HAJŠLOVÁ. *Chemie potravín II*. 3. rozš. a přeprac. vyd. Tábor: OSSIS, 2009. ISBN 978-80-86659-16-9.
- [10] HALÁSZ, A., Á. BARÁTH, L. SIMON-SARKADI a W. HOLZAPFEL. Biogenic amines and their production by microorganisms in food. *Trends in Food Science & Technology*. 1994, roč. 5, č. 2, s. 42-49. ISSN 0924-2244.
- [11] YIGIT, Meryem a Lale ERSOY. Determination of tyramine in cheese by LC–UV. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2003, roč. 31, č. 6, s. 1223-1228. ISSN 0731-7085.
- [12] KOHAJDOVÁ, Z., J. KAROVIČOVÁ a G. GREIF. Biogénne amíny v potravinách. *Potravinárstvo*. 2008, roč. 2, č. 1, s. 30-49. ISSN 1338-0230.
- [13] VALSAMAKI, K., A. MICHAELIDOU a A. POLYCHRONIADIOU. Biogenic amine production in Feta cheese. *Food Chemistry*. 2000, roč. 71, č. 2, s. 259-266. ISSN 0308-8146.
- [14] HERNÁNDEZ-JOVER, T., M. IZQUIERDO-PULIDO, M. T. VECIANA-NOGUÉS, A. MARINÉ-FONT a M. C. VIDAL-CAROU. Biogenic amine and polyamine contents in meat and meat products. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 1997, roč. 45, č. 6, s. 2098-2102. ISSN 0021-8561.
- [15] STANDAROVÁ, E., I. BORKOVCOVÁ a L. VORLOVÁ. Obsah biogenních aminů v sýrech z české obchodní sítě. *Veterinářství*. 2008, roč. 58, č. 11, s. 735-739. ISSN 0506-8231.
- [16] KAROVIČOVÁ, Jolana a Zlatica KOHAJDOVÁ. Biogenic amines in food. *Chemical Papers*. 2005, roč. 59, č. 1, s. 70-79. ISSN 0366-6352.
- [17] KOUTSOUMANIS, K., C. TASSOU a G. J. E. NYCHAS. Biogenic amines in foods. In: JUNEJA Vijay K. a John N. SOFOS (ed.). *Pathogens and toxins in foods: challenges and interventions*. Washington: ASM Press, 2010. ISBN 978-1-55581-459-5.

- [18] KALACĚ, Pavel a Martin KRĚŽEK. Biogenní aminy a polyaminy v potravinách a jejich vliv na lidské zdraví. *Potravinářská revue*. 2005, č. 2, s. 40-42 . ISSN 1801-9102.
- [19] SPANO, Giuseppe et al. Biogenic amines in fermented foods. *European Journal of Clinical Nutrition*. 2010, roč. 64, s. 95-100. ISSN 0954-3007.
- [20] SMIT, A. Y., W. J. du TOIT a M. du TOIT. Biogenic amines in wine: understanding the headache. *South African Journal of Enology & Viticulture*. 2008, roč. 29, č. 2, s. 109-127. ISSN 0253-939X.
- [21] KALACĚ, Pavel a Martin KRĚŽEK. Biogenní aminy a polyaminy v potravinách. *Výživa a potraviny*. 2002, roč. 57, č. 1, s. 12-13. ISSN 1211-846X.
- [22] *MetaCyc Pathway: aminopropylcadaverine biosynthesis* [online]. [cit. 2012-04-19]. Dostupné z: <http://biocyc.org/META/NEW-IMAGE?type=PATHWAY&object=PWY0-1303>
- [23] *MetaCyc Pathway: putrescine biosynthesis I* [online]. [cit. 2012-04-19]. Dostupné z: <http://biocyc.org/META/NEW-IMAGE?type=PATHWAY&object=PWY-40>
- [24] *MetaCyc Pathway: putrescine biosynthesis II* [online]. [cit. 2012-04-19]. Dostupné z: <http://biocyc.org/META/NEW-IMAGE?type=PATHWAY&object=PWY-43>
- [25] *MetaCyc Pathway: putrescine biosynthesis III* [online]. [cit. 2012-04-19]. Dostupné z: <http://biocyc.org/META/NEW-IMAGE?type=PATHWAY&object=PWY-46>
- [26] *MetaCyc Pathway: putrescine biosynthesis IV* [online]. [cit. 2012-04-19]. Dostupné z: <http://biocyc.org/META/NEW-IMAGE?type=PATHWAY&object=PWY-6305>
- [27] SILLA SANTOS, María Hortensia. Toxic nitrogen compounds produced during processing: biogenic amines, ethyl carbamides, nitrosamines. In ADAMS, Martin R. a M. J. Robert NOUT (ed.). *Fermentation and food safety*. Gaithersburg: Aspen Publishers, 2001. ISBN 0-8342-1843-7.



- [28] RUSSO, P., G. SPANO, M. P. ARENA, V. GAPOZZI, D. FIOCCO, F. GRIECO a L. BENEDEUCE. Are consumers aware of the risks related to biogenic amines in food? In MÉNDEZ-VILAS, Antonio (ed.). *Current research, technology and education topics in applied microbiology and microbial biotechnology*. Microbiology book series – Number 2. Badajoz: Formatex Research Center, 2010. ISBN 978-84-614-6195-0.
- [29] Vyhláška č. 305/2004 Sb., kterou se stanoví druhy kontaminujících a toxikologicky významných látek a jejich přípustné množství v potravinách. [online]. [cit. 2012-04-20]. Dostupné z: <http://www.szpi.gov.cz/docDetail.aspx?docid=1006047&docType=ART&nid=11307>
- [30] SHALABY, Ali R. Significance of biogenic amines to food safety and human health. *Food Research International*. 1996, roč. 29, č. 7, s. 675-690. ISSN 0963-9969.
- [31] BUŇKOVÁ, L., F. BUŇKA, M. HLOBILOVÁ, V. DRÁB a S. KRÁČMAR. Komparace různých metod detekce dekarboxylázové aktivity u bakterií mléčného kvašení. *Potravinářstvo*. 2010, roč. 4, mimoriadné č., s. 372-380. ISSN 1338-0230.
- [32] KLAENHAMER, T. R., R. BARRANGOU, B. L. BUCK, M. A. AZCARATE-PERIL a E. ALTERMANN. Genomic features of lactic acid bacteria effecting bioprocessing and health. *FEMS Microbiology Reviews*. 2005, roč. 29, č. 3, s. 393-409. ISSN 0168-6445.
- [33] KLEIN, G., A. PACK, CH. BONAPARTE a G. REUTER. Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*. 1998, roč. 41, č. 2, s. 103-125. ISSN 0168-1605.
- [34] LIU, Shao Quan. Practical implications of lactate and pyruvate metabolism by lactic acid bacteria in food and beverage fermentations. *International Journal of Food Microbiology*. 2003, roč. 83, č. 2, s. 115-131. ISSN 0168-1605.
- [35] CAPLICE, Elizabeth a Gerald F. FITZGERALD. Food fermentations: role of microorganism in food production and preservation. *International Journal of Food Microbiology*. 1999, roč. 50, č. 1-2, s. 131-149. ISSN 0168-1605.

- [36] SLÁDKOVÁ, P., T. KOMPRDA a R. BURDYCHOVÁ. Screening of starter and probiotic cultures intended for processing of fermented meat products for their ability to produce biogenic amines. In *Konference MendelNet07 Agro* [online]. Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, 2007 [cit. 2012-04-20]. Dostupné z: <http://mnet.mendelu.cz/mendelnet07agro/articles/tp/sladvkova.pdf>
- [37] HOFERKOVÁ, P., R. BURDYCHOVÁ, A. BUBENÍČKOVÁ a V. DOHNAL. Probiotic cultures in dry fermented sausages and their influence on the content of biogenic amines. In *Konference MendelNet08 Agro* [online]. Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, 2008 [cit. 2012-04-20]. Dostupné z: [http://mnet.mendelu.cz/mendelnet08agro/files/articles/techpot\\_hoferkova.pdf](http://mnet.mendelu.cz/mendelnet08agro/files/articles/techpot_hoferkova.pdf)
- [38] PANDEY, A., V. K. JOSHI, P. NIGAM a C. R. SOCCOL. Enterobacteriaceae, Coliforms and E. coli. In ROBINSON, R. K., C. A. BATT a P. D. PATEL (ed.). *Encyclopedia of food microbiology*. London: Academic Press, 1999. ISBN 0-12-227070-3.
- [39] BAYLIS, C. L. Enterobacteriaceae. In BLACKBURN, Clive de W. (ed.). *Food spoilage microorganisms*. Cambridge: Woodhead Publishing, 2006. ISBN 978-1-85573-966-6.
- [40] STILES, Michael E. Less recognized and suspected foodborne bacterial pathogens. In LUND, B. M., T. C. BAIRD-PARKER a G. W. GOULD (ed.). *The microbiological safety and quality of food*. Gaithersburg: Aspen Publishers, 2000. ISBN 0-8342-1323-0.
- [41] SEDLÁČEK, Ivo. *Taxonomie prokaryot*. Brno: Masarykova univerzita, 2007. ISBN 80-210-4207-9.
- [42] CORDIER, Jean-Louis. Enterobacteriaceae. In MOTARJEMI, Jasmine a Martin ADAMS (ed.). *Emerging foodborne pathogens*. Cambridge: Woodhead Publishing, 2006. ISBN 978-1-85573-963-5.
- [43] SINKOWITZ-COCHRAN, Ronda L. a William R. JARVIS. Epidemiology and prevention of nosocomial infections. In BLOCK, Seymour Stanton (ed.). *Disinfection, sterilization, and preservation*. 5<sup>th</sup> ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001. ISBN 0-683-30740-1.

- [44] GREIF, G., M. GREIFOVÁ a J. KAROVIČOVÁ. Effects of NaCl concentration and initial pH value on biogenic amine formation dynamics by *Enterobacter* spp. bacteria in model conditions. *Journal of Food and Nutrition Research*. 2006, roč. 45, č. 1, s. 21-29. ISSN 1336-8672.
- [45] SUZZI, Giovanna a Fausto GARDINI. Biogenic amines in dry fermented sausages: a review. *International Journal of Food Microbiology*. 2003, roč. 88, č. 1, s. 41-54. ISSN 0168-1605.
- [46] *Food Microbiology Glossary: Serratia* [online]. [cit. 2012-02-13]. Dostupné z: <http://www.emlab.com/s/sampling/FoodMicroGlossary.html#serratia>
- [47] GRIMONT, Francine a Patrick A. D. GRIMONT. Genus XXXIV. *Serratia*. In GARRITY, G. M., D. J. BRENNER, N. R. KRIEG a J. T. STALEY (ed.). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 2<sup>nd</sup> ed. New York: Springer, 2005. ISBN 0-387-24144-2.
- [48] BUŇKOVÁ, L., F. BUŇKA, E. POLLAKOVÁ, T. PODEŠVOVÁ a V. DRÁB. The effect of lactose, NaCl and an aero/anaerobic environment on the tyrosine decarboxylase activity of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* and *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. *International Journal of Food Microbiology*. 2011, roč. 147, č. 2, s. 112-119. ISSN 0168-1605.
- [49] *Food poisoning by biogenic amines* [online]. [cit. 2012-03-20]. Dostupné z: <http://www.azaquar.com/en/doc/food-poisoning-by-biogenic-amines>
- [50] ZAMAN, M. Z., A. S. ABDULAMIR, F. A. BAKAR, J. SELAMAT a J. BAKAR. A review: Microbiological, physicochemical and health impact of high level of biogenic amines in fish sauce. *American Journal of Applied Sciences*. 2009, roč. 6, č. 6, s. 1199-1211. ISSN 1546-9239.
- [51] COLLINS DANIEL, John et al. Scientific opinion on risk based control of biogenic amine formation in fermented foods. *EFSA Journal* [online]. 2011, roč. 9, č. 10 [cit. 2012-03-26]. Dostupné z: <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/2393.pdf>

- [52] SHUKLA, S., J. K. KIM a M. KIM. Occurrence of biogenic amines in soybean food products. In EL-SHEMY, Hany (ed.). *Soybean and health*. Rijeka: InTech, 2011. ISBN 978-953-307-535-8.
- [53] MENDES, Rogério. Biogenic amines. In REHBEIN, Hartmut a Jörg OEHLENSCHLÄGER (ed.). *Fischery products: quality, safety and authenticity*. Oxford: Wiley-Blackwell, 2009. ISBN 978-1-4051-4162-8.
- [54] RUIZ-CAPILLAS Claudia a Francisco JIMÉNEZ-COLMENERO. Biogenic amines in meat and meat products. *Critical Reviews in Food Science and nutrition*. 2004, roč. 44, č. 7-8, s. 489-499. ISSN 1040-8398.
- [55] *Sůl a jídlo* [online]. [cit. 2012-02-19]. Dostupné z: <http://www.alpskasul.cz/zdravi/dokumenty/paper3-cz.pdf>
- [56] LAVIZZARI, T., M. T. VECIANA-NOGUÉS, S. BOVER-CID, A. MARINÉ-FONT a C. VIDAL-CAROU. Improved method for the determination of biogenic amines and polyamines in vegetable products by ion-pair high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*. 2006, roč. 1129, č. 1, s. 67-72. ISSN 0021-9673.
- [57] INNOCENTE, N., M. BIASUTTI, M. PADOVESE, S. MORET. Determination of biogenic amines in cheese using HPLC technique and direct derivatization of acid extract. *Food Chemistry*. 2007, roč. 101, č. 3, s. 1285-1289. ISSN 0308-8146.
- [58] OGURI, Shigeyuki. Electromigration methods for amino acids, biogenic amines and aromatic amines. *Journal of Chromatography B*. 2000, roč. 747, č. 1-2, s. 1-19. ISSN 1387-2273.
- [59] PUNAKIVI, A., M. SMOLANDER, M. L. NIKU-PAAVOLA, J. MATTINEN a J. BUCHERT. Enzymatic determination of biogenic amines with transglutaminase. *Talanta*. 2006, roč. 68, č. 3, s. 1040-1045. ISSN 0039-9140.
- [60] ARLORIO, M., J. D. COÏSSON a A. MARTELLI. Ion-pair HPLC determination of biogenic amines and precursors aminoacids. Application of a method based on simultaneous use of heptanesulphonate and octylamine to some foods. *Chromatographia*. 1998, roč. 48, č. 11-12, s. 763-769. ISSN 0009-5893.

- [61] *Chromatografické metody* [online]. [cit. 2012-02-4]. Dostupné z: [http://www.vscht.cz/ktk/www\\_324/lab/ana/chm.html](http://www.vscht.cz/ktk/www_324/lab/ana/chm.html)
- [62] PATNAIK, Pradyot. *Dean's analytical chemistry handbook*. 2<sup>nd</sup> ed. New York: McGraw-Hill Professional, 2004. ISBN 0-07-141060-0.
- [63] KAROVIČOVÁ, J., Z. KOHAJDOVÁ, P. ŠIMKO a D. LUKÁČOVÁ. Using capillary isotachopheresis for the determination of biogenic amines and D-isocitric acid in food products. *Nahrung*. 2003, roč. 47, č. 3, s. 188-190. ISSN 0027-769X.
- [64] *Chromatografie značených sloučenin* [online]. [cit. 2012-04-2]. Dostupné z: <http://www.fjfi.cvut.cz/kjch/materialy/RCHP/Chroorg.PDF>
- [65] MATĚJKA, Pavel. *Přednášky z analytické chemie – separační metody* [online]. [cit. 2012-04-22]. Dostupné z: <http://www.vscht.cz/anl/matejka/ACH2-03-sepa2.pdf>
- [66] *Stanovení biogenních aminů ve fermentovaných nápojích* [online]. [cit. 2012-02-4]. Dostupné z: [http://web.ft.utb.cz/cs/docs/Stanoven\\_\\_\\_biogenn\\_\\_ch\\_amin\\_\\_\\_ve\\_fermentovan\\_\\_ch\\_n\\_\\_poj\\_\\_ch.pdf](http://web.ft.utb.cz/cs/docs/Stanoven___biogenn__ch_amin___ve_fermentovan__ch_n__poj__ch.pdf)
- [67] BELE, C., C. MATEA, A. BUNEA, C. JECAN a F. DULF. Determination of amino acid content in Romanian salami by ion-exchange chromatography. *Research Journal of Agricultural Science*. 2010, roč. 42, č. 2, s. 211-215. ISSN 2066-1843.
- [68] STANDARA, S., M. VESELÁ a M. DRDÁK. Determination of biogenic amines in cheese by ion exchange chromatography. *Nahrung*. 2000, roč. 44, č. 1, s. 28-31. ISSN 0027-769X.
- [69] HLABANGANA L., S. HERNÁNDEZ-CASSOU a J. SAURINA. Determination of biogenic amines in wines by ion-pair liquid chromatography and post-column derivatization with 1,2-naphthoquinone-4-sulphonate. *Journal of Chromatography A*. 2006, roč. 1130, č. 1, s. 130-136. ISSN 0021-9673.
- [70] KOVÁCS, Á., L. SIMON-SARKADI a K. GANZLER. Determination of biogenic amines by capillary electrophoresis. *Journal of chromatography A*. 1999, roč. 836, č. 2, s. 305-313. ISSN 0021-9673.

- [71] BARTŮŇKOVÁ, Jiřina et al. *Vyšetřovací metody v imunologii*. 2. přeprac. a dopl. vydání. Praha: Grada Publishing, 2011. ISBN 978-802-4735-337.
- [72] *Využití metody ELISA při detekci Listeria monocytogenes a stafylokokových enterotoxinů v potravinách* [online]. [cit. 2012-03-15]. Dostupné z: [http://cit.vfu.cz/ivbp/wpcontent/uploads/2011/07/VY\\_01\\_28.pdf](http://cit.vfu.cz/ivbp/wpcontent/uploads/2011/07/VY_01_28.pdf)
- [73] LANDETE, J. M., B. DE LAS RIVAS, A. MARCOBAL a R. MUÑOZ. Molecular methods for the detection of biogenic amine-producing bacteria on foods. *International Journal of Food Microbiology*. 2007, roč. 117, č. 3 s. 258-269. ISSN 0168-1605.
- [74] SCHINDLER, Jiří. *Mikrobiologie pro studenty zdravotnických oborů*. Praha: Grada Publishing, 2010. ISBN 978-80-247-3170-4.
- [75] ZWIETERING, M. H., I. JOGENBURGER, F. M. ROMBOUITS a K. van't RIET. Modeling of bacterial growth curve. *Applied and Environmental Microbiology*. 1990, roč. 56, č. 6, s. 1875-1881. ISSN 0099-2240.
- [76] KHANAFARI, A., M. M. ASSADI a F. A. FAKHR. Review of prodigiosin, pigmentation in *Serratia marcescens*. *Online Journal of Biological Sciences* [online]. 2006, roč. 6, č. 1 [cit. 2012-03-12]. ISSN 1608-4217. Dostupné z: <http://docsdrive.com/pdfs/sciencepublications/ojbsci/2006/1-13.pdf>
- [77] AMBROŽOVÁ, Jana. *Mikrobiologie v technologii vod*. 2<sup>nd</sup> ed. Praha: VŠCHT, 2008. ISBN 978-80-7080-676-0.
- [78] *Nový způsob prodloužení trvanlivosti potravin* [online]. [cit. 2012-02-5]. Dostupné z: <http://www.agris.cz/clanek/106391>
- [79] ERCOLINI, D., F. RUSSO, I. FERROCINO a F. VILLANI. Molecular identification of mesophilic and psychrotrophic bacteria from raw cow's milk. *Food microbiology*. 2009, roč. 26, č. 2, s. 228-231. ISSN 0740-0020.
- [80] EMBORG, Jette a Paw DALGAARD. Modelling the effect of temperature, carbon dioxide, water activity and pH on growth and histamine formation by *Morganella psychrotolerans*. *International Journal of Food Microbiology*. 2008, roč. 128, č. 2, s. 226-233. ISSN 0168-1605.

- [81] MOLENAAR, D., J. S. BOSSHCER, B. BRINK, A. J. M. DRIESSEN a W. N. KONIGS. Generation of proton motive force by histidine decarboxylation and electrogenic histidine/histamine antiport in *Lactobacillus buchneri*. *Journal of Bacteriology*. 1993, roč. 175, č. 10, s. 2864-2870. ISSN 0021-9193.
- [82] KAPRÁLEK, František. *Fyziologie bakterií*. Praha: Státní pedagogické nakladatelství, 1986.

**SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK**

CE	Kapilární elektroforéza (Capillary electrophoresis)
CFU	Kolonie tvořící jednotka (Colony forming unit)
DAO	Diaminooxidáza
DM	Dekarboxylázové médium
ELISA	Imunoanalýza s enzymem vázaným na imunosorbent (Enzyme linked immunosorbent assay)
GC	Plynová chromatografie (Gas chromatography)
GC-MS	Plynová chromatografie s hmotnostně spektrometrickou detekcí (Gas chromatography-mass spectrometry)
HPLC	Vysoce účinná kapalinová chromatografie (High performance liquid chromatography)
IEC	Iontově výměnná chromatografie (Ion exchange chromatography)
MAO	Monoaminooxidáza
MPA	Masopeptonový agar
MPB	Masopeptonový bujón
MZd	Ministerstvo zdravotnictví
OD	Optická hustota (Optical density)
OPA	<i>o</i> -ftalaldehyd
PCR	Polymerázová řetězová reakce (Polymerase chain reaction)
RP-HPLC	Reverzní HPLC (Reversed-phase HPLC)
TLC	Tenkovrstvá chromatografie (Thin layer chromatography)
UV	Ultrafialové záření (Ultra-violet)



**SEZNAM OBRÁZKŮ**

<i>Obr. 1. Chemická struktura vybraných biogenních aminů [20]</i> .....	15
<i>Obr. 2. Schéma vzniku biogenního aminu z aminokyseliny [21]</i> .....	16
<i>Obr. 3. Dekarboxylace aminokyselin [12]</i> .....	17
<i>Obr. 4. Tvorba histaminu, tyraminu a tryptaminu [12]</i> .....	18
<i>Obr. 5. Tvorba kadaverinu [22]</i> .....	18
<i>Obr. 6. Tvorba putrescinu [23, 24, 25, 26]</i> .....	19
<i>Obr. 7. Tvorba spermidinu a sperminu [12]</i> .....	19
<i>Obr. 8. Schéma kapalinového chromatografu [61]</i> .....	37
<i>Obr. 9. Základní fáze růstové křivky [74]</i> .....	47
<i>Obr. 10. Růstová křivka dle Gompertzova modelu [75]</i> .....	48
<i>Obr. 11. Růstová křivka bakterie Serratia marcescens v podmínkách 1 % NaCl, pH 4, 5, 6 a teploty 10 °C</i> .....	50
<i>Obr. 12. Růstová křivka bakterie Serratia marcescens v podmínkách 4 % NaCl, pH 4, 5, 6 a teploty 20 °C</i> .....	51
<i>Obr. 13. Růstová křivka bakterie Serratia marcescens v podmínkách 6 % NaCl, pH 4, 5, 6 a teploty 37 °C</i> .....	54
<i>Obr. 14. Produkce kadaverinu v podmínkách 3% NaCl, pH 4, 5, 6 a teploty 10 °C</i> .....	58
<i>Obr. 15. Produkce kadaverinu v podmínkách 1 % NaCl, pH 4, 5, 6 a teploty 20 °C</i> .....	60
<i>Obr. 16. Produkce kadaverinu v podmínkách 4 % NaCl, pH 4, 5, 6 a teploty 37 °C</i> .....	62
<i>Obr. 17. Produkce putrescinu v podmínkách 3 % NaCl, pH 4, 5, 6 a teploty 10 °C</i> .....	66
<i>Obr. 18. Produkce putrescinu v podmínkách 5 % NaCl, pH 4, 5, 6 a teploty 20 °C</i> .....	68
<i>Obr. 19. Produkce putrescinu v podmínkách 0 % NaCl, pH 4, 5, 6 a teploty 37 °C</i> .....	69

**SEZNAM TABULEK**

<i>Tab. 1. Produkce biogenních aminů některými bakteriemi [12] .....</i>	<i>25</i>
<i>Tab. 2 Faktory ovlivňující dekarboxylázovou aktivitu [12] .....</i>	<i>30</i>
<i>Tab. 3. Eluční program .....</i>	<i>45</i>
<i>Tab. 4. Parametry Gompertzova modelu – růstová křivka (10 °C) .....</i>	<i>49</i>
<i>Tab. 5. Parametry Gompertzova modelu – růstová křivka (20 °C) .....</i>	<i>52</i>
<i>Tab. 6. Parametry Gompertzova modelu – růstová křivka (37 °C) .....</i>	<i>53</i>
<i>Tab. 7. Parametry Gompertzova modelu – produkce kadaverinu (10 °C) .....</i>	<i>57</i>
<i>Tab. 8. Parametry Gompertzova modelu – produkce kadaverinu (20 °C) .....</i>	<i>61</i>
<i>Tab. 9. Parametry Gompertzova modelu – produkce kadaverinu (37 °C) .....</i>	<i>63</i>
<i>Tab. 10. Parametry Gompertzova modelu – produkce putrescinu (10 °C) .....</i>	<i>65</i>
<i>Tab. 11. Parametry Gompertzova modelu – produkce putrescinu (20 °C) .....</i>	<i>68</i>
<i>Tab. 12. Parametry Gompertzova modelu – produkce putrescinu (37 °C) .....</i>	<i>70</i>
<i>Tab. 13. Hodnoty yield faktoru pro kadaverin .....</i>	<i>73</i>
<i>Tab. 14. Hodnoty yield faktoru pro putrescin .....</i>	<i>74</i>

**SEZNAM PŘÍLOH**

Příloha P I: RŮSTOVÉ KŘIVKY – 10 °C

Příloha P II: RŮSTOVÉ KŘIVKY – 20 °C

Příloha P III: RŮSTOVÉ KŘIVKY – 37 °C

Příloha P IV: PRODUKCE KADAVERINU – 10 °C

Příloha P V: PRODUKCE KADAVERINU – 20 °C

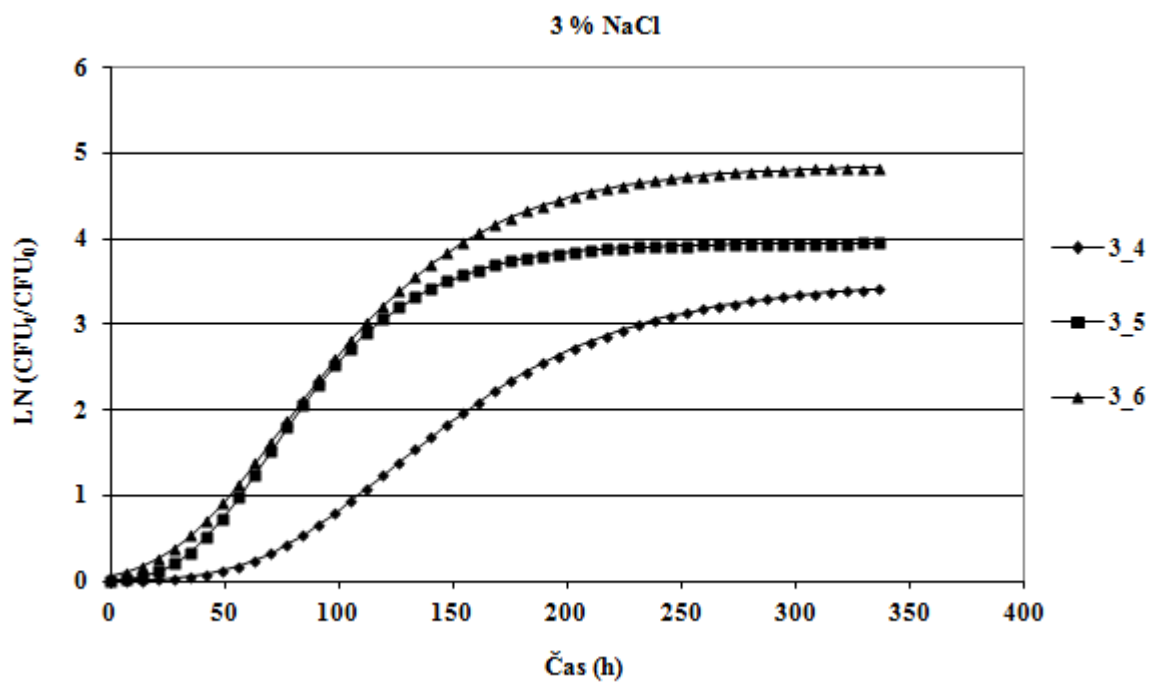
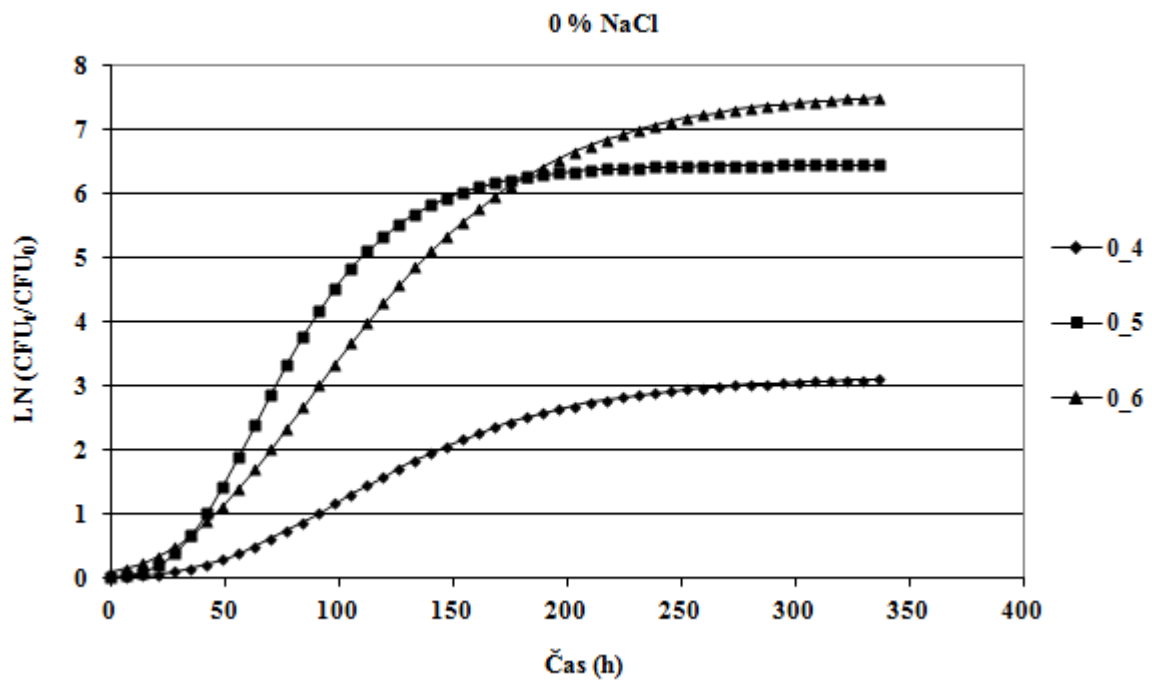
Příloha P VI: PRODUKCE KADAVERINU – 37 °C

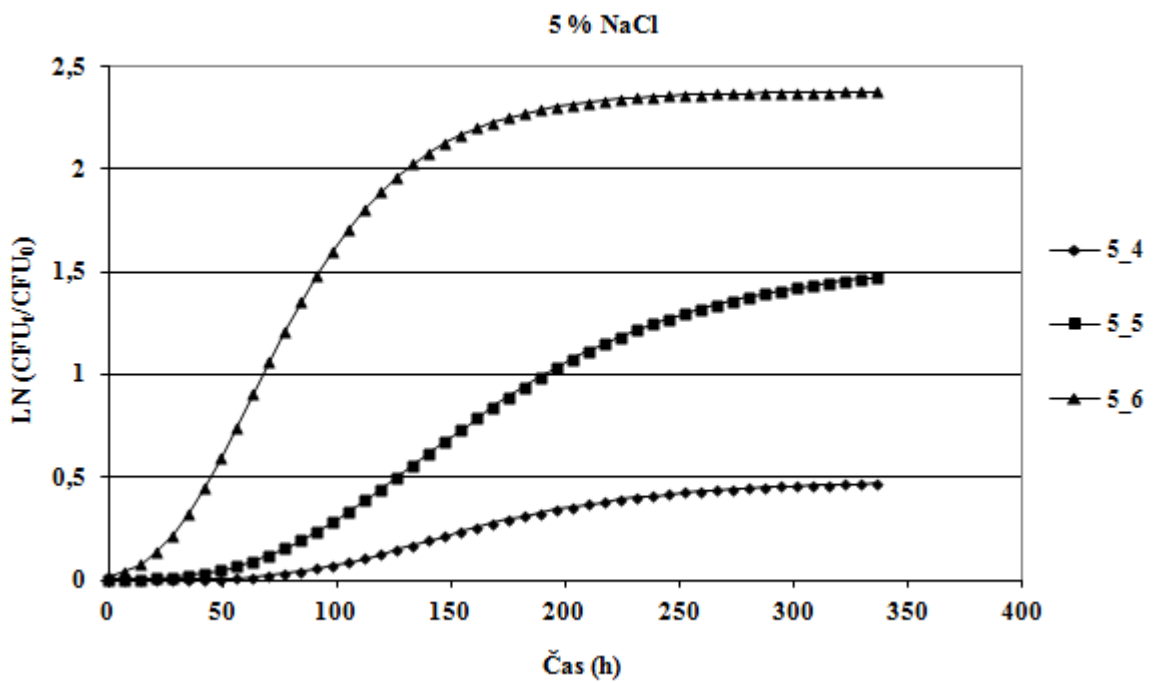
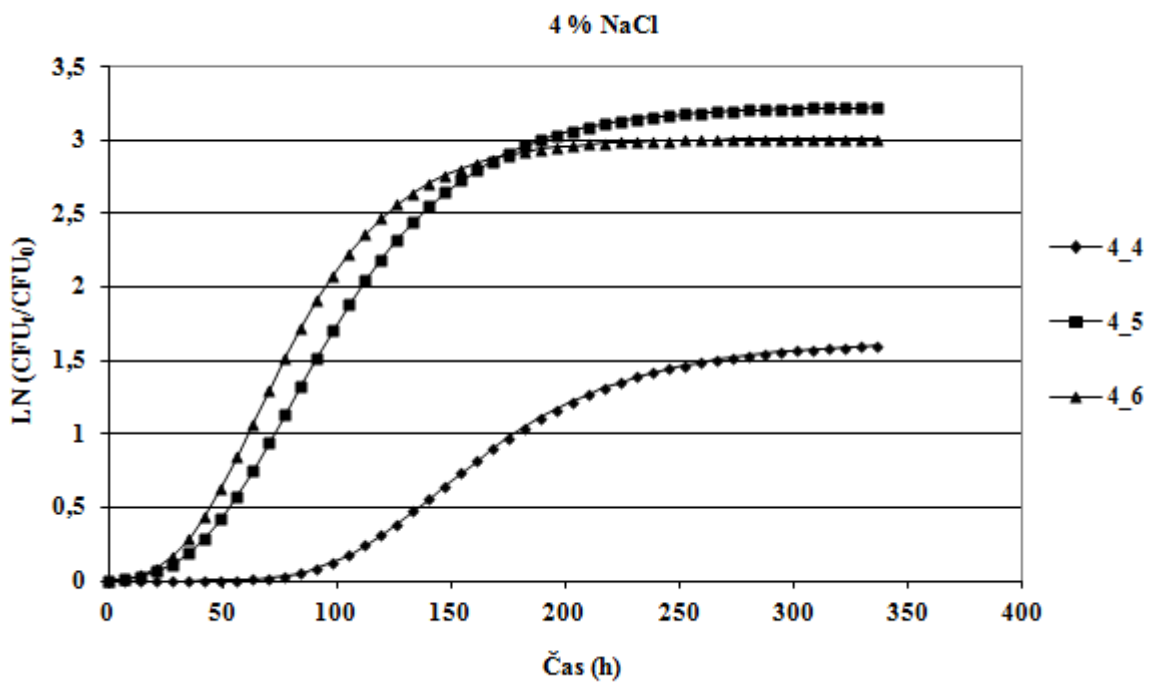
Příloha P VII: PRODUKCE PUTRESCINU – 10 °C

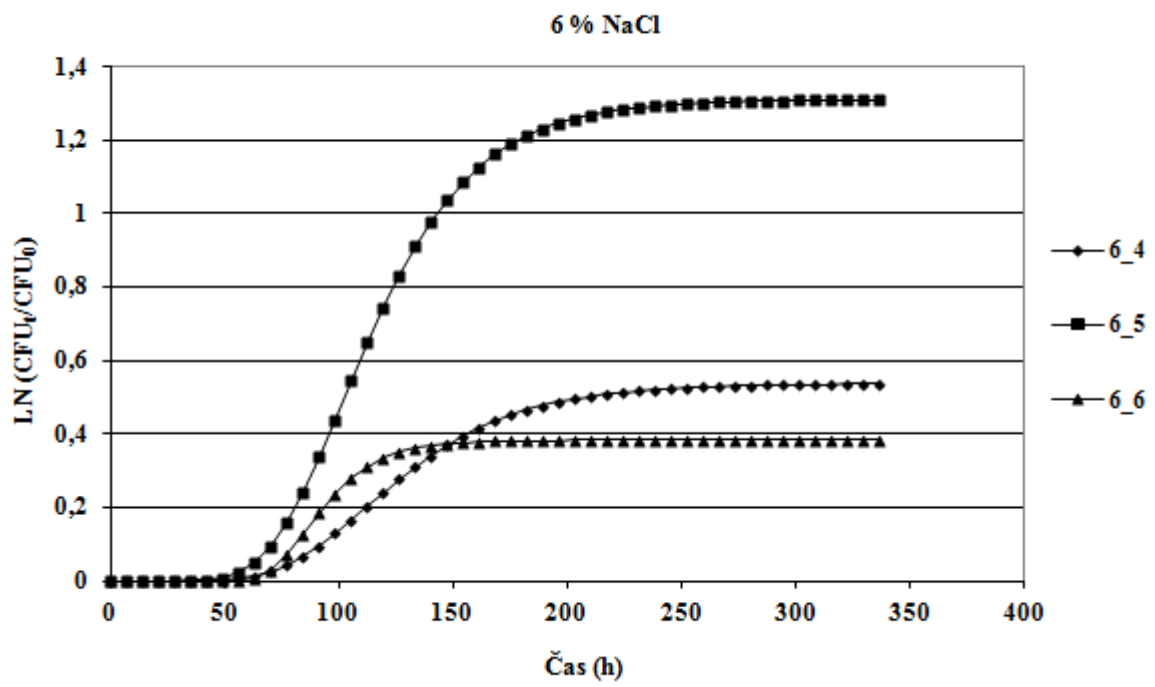
Příloha P VIII: PRODUKCE PUTRESCINU – 20 °C

Příloha P IX: PRODUKCE PUTRESCINU – 37 °C

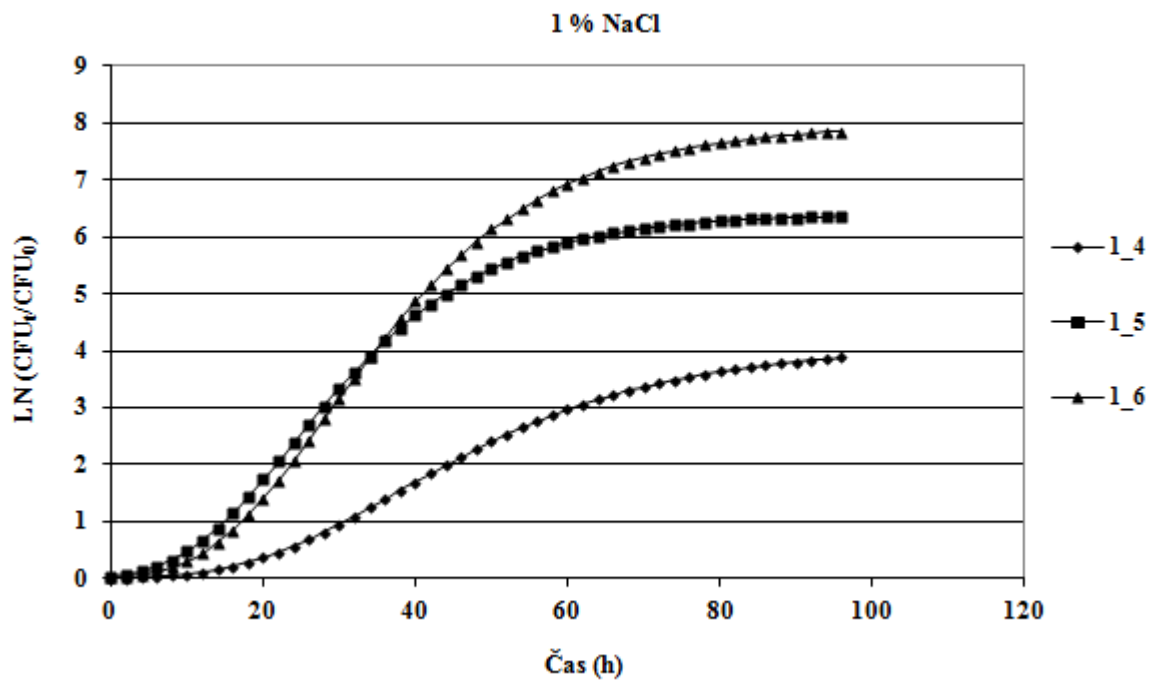
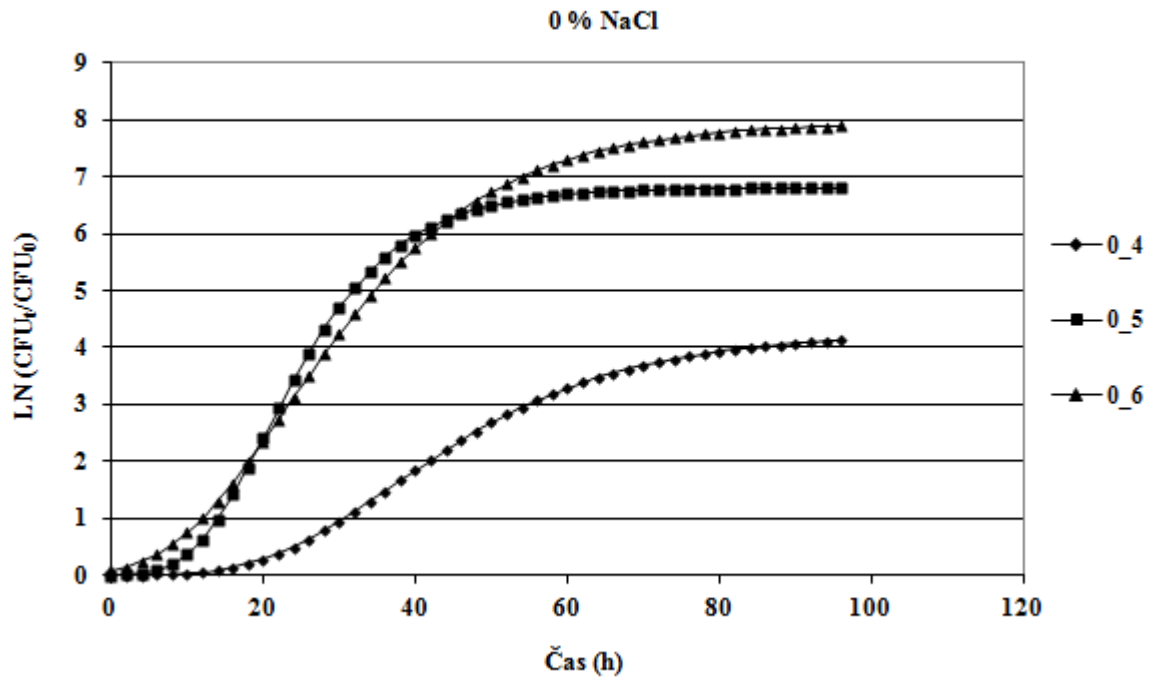
# PŘÍLOHA P I: RŮSTOVÉ KŘIVKY – 10 °C

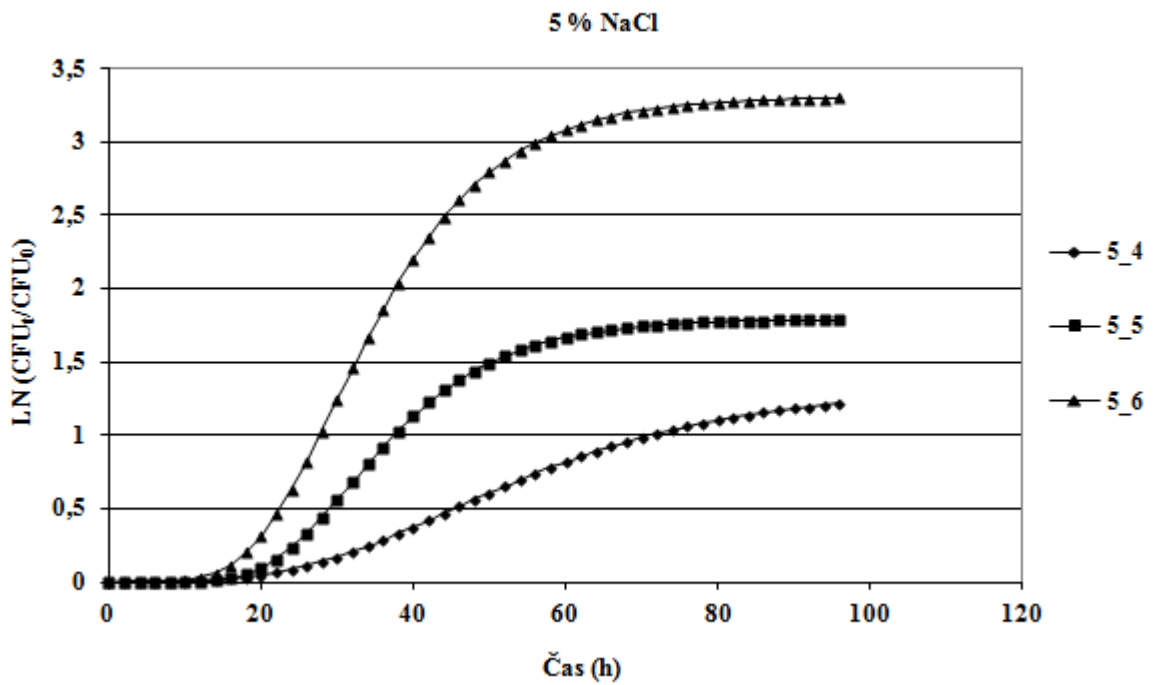
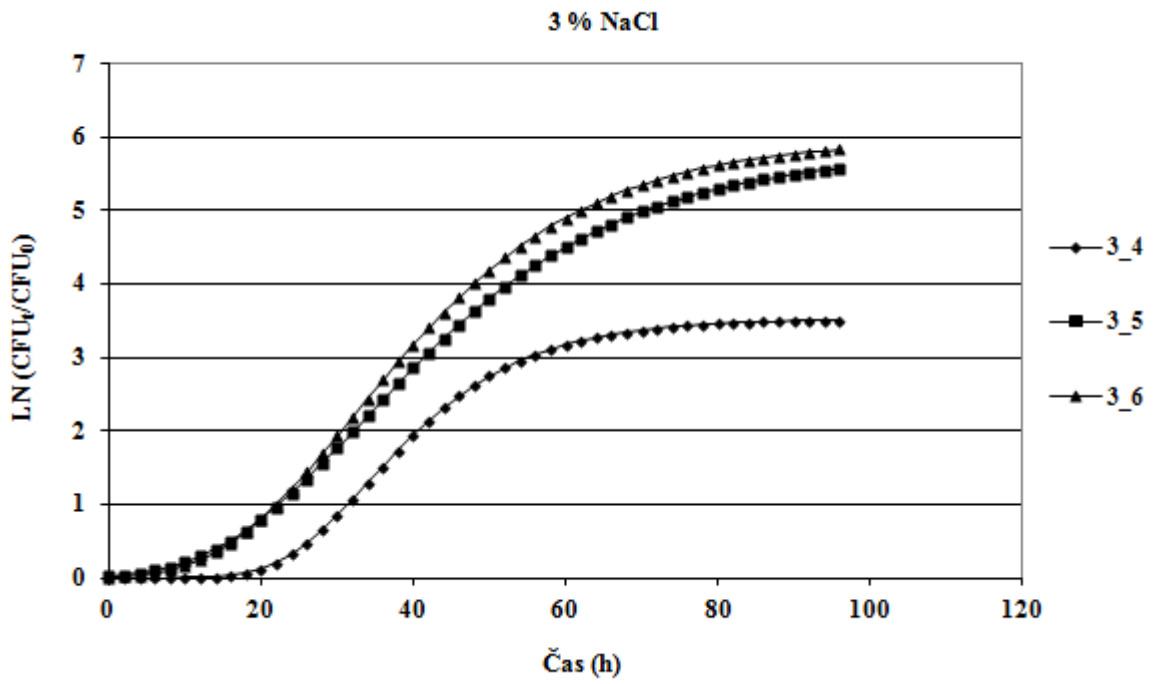




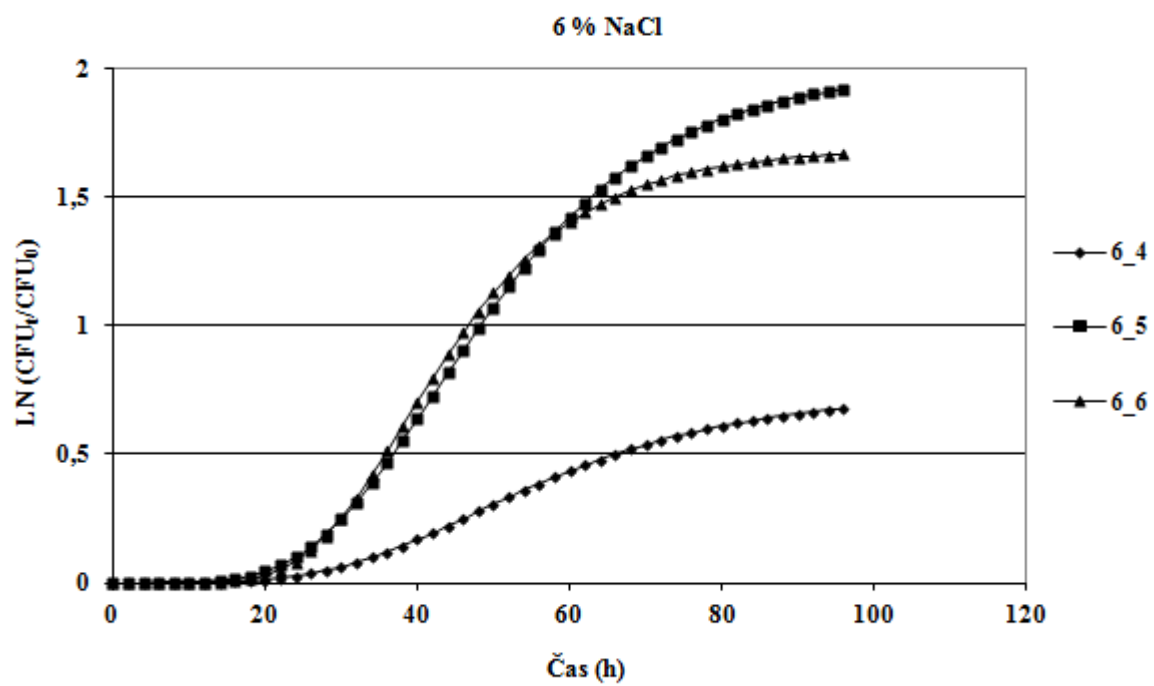


## PŘÍLOHA P II: RŮSTOVÉ KŘIVKY – 20 °C

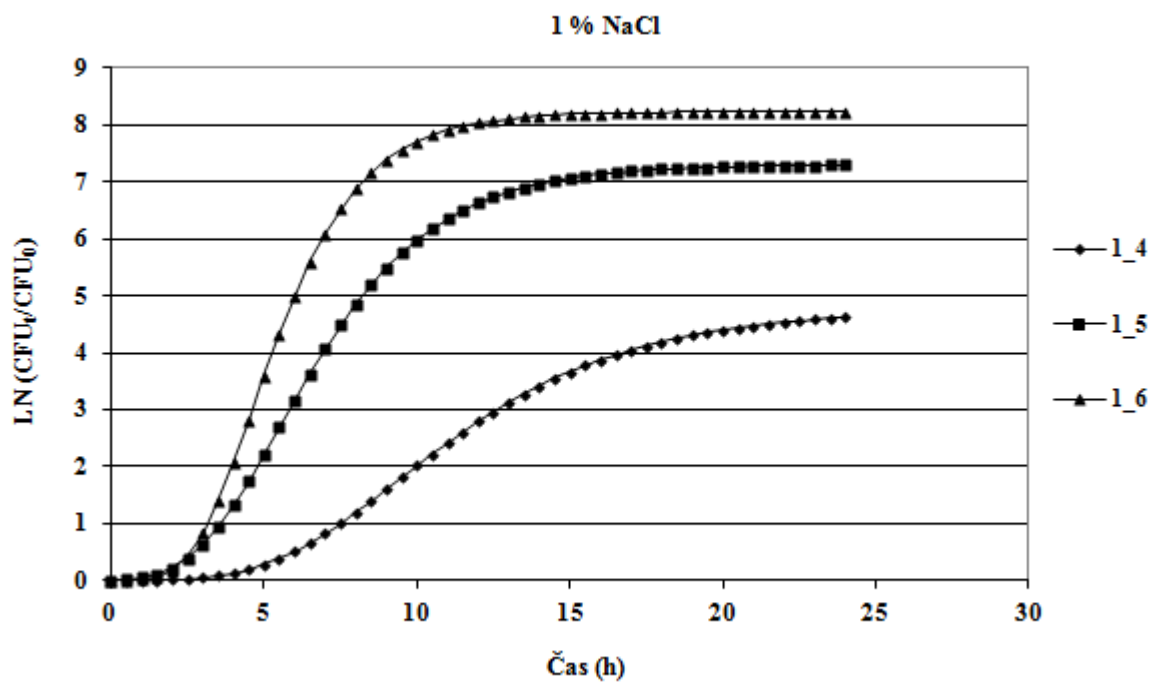
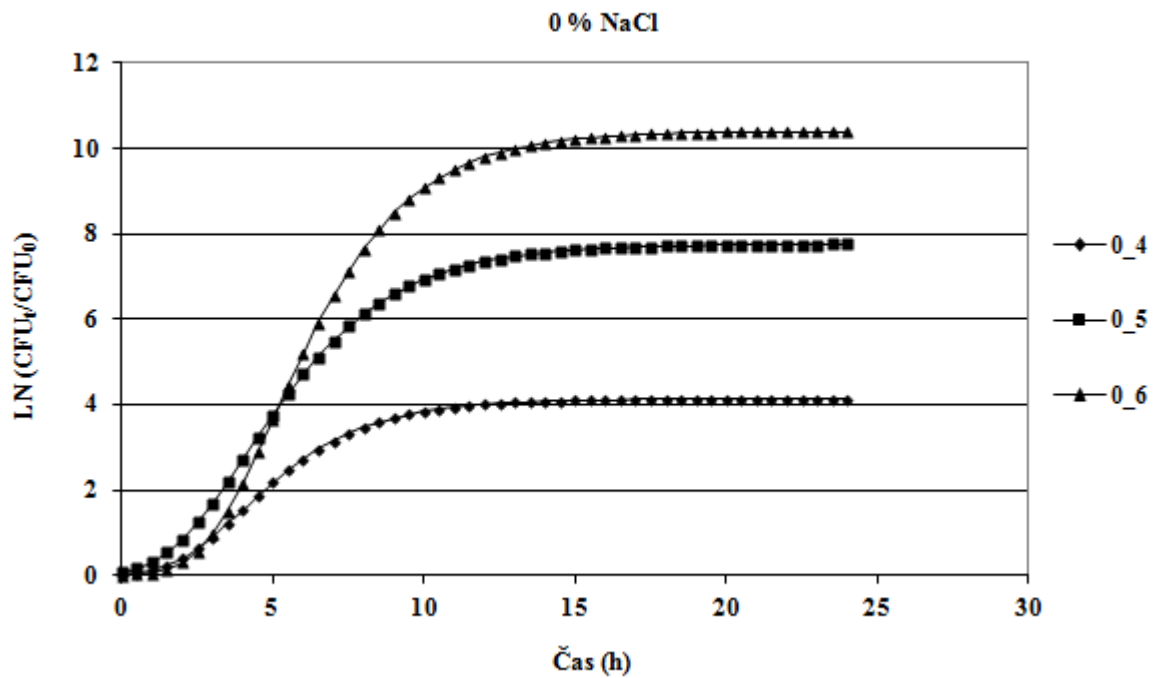


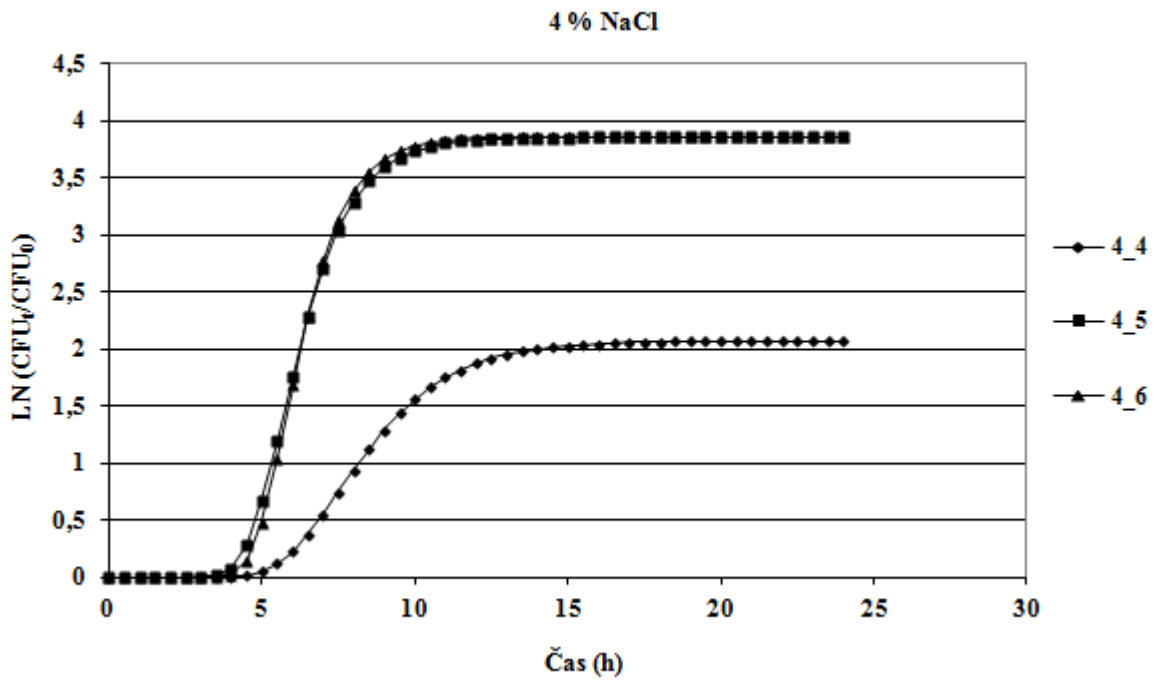
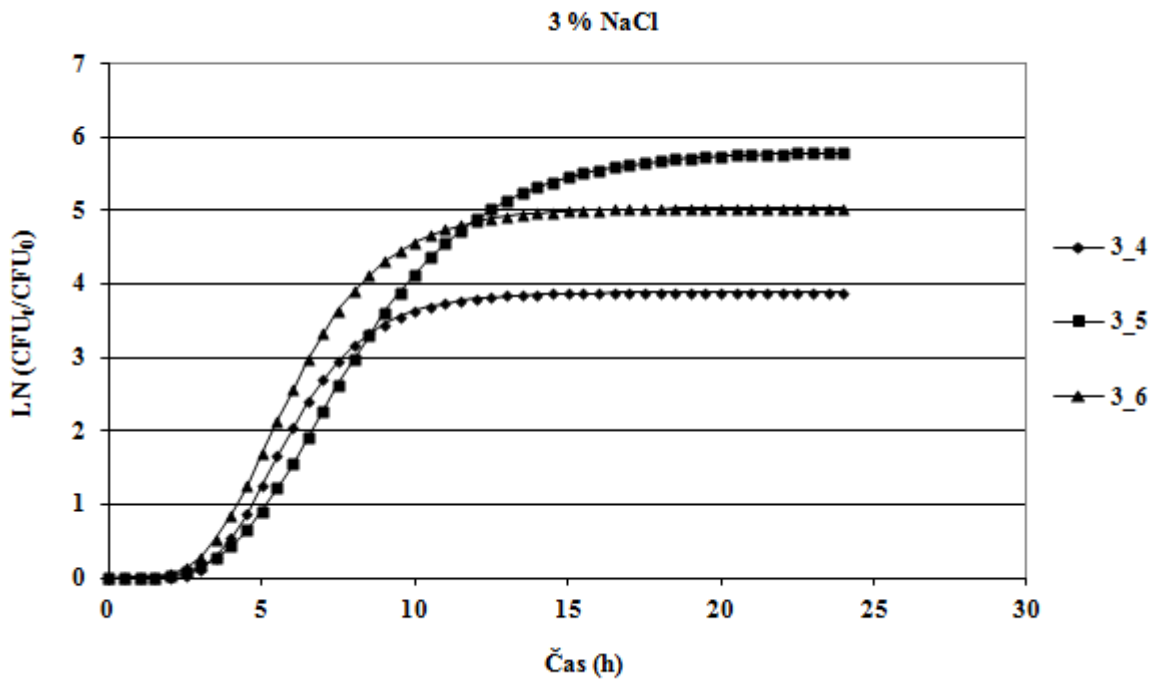




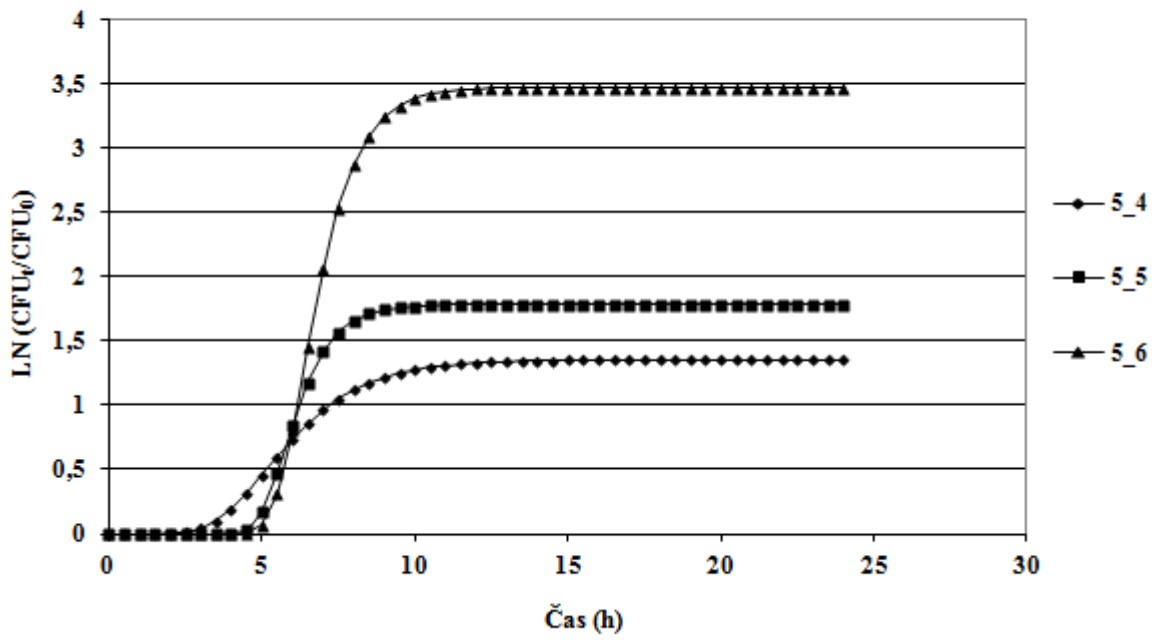


## PŘÍLOHA P III: RŮSTOVÉ KŘIVKY – 37 °C

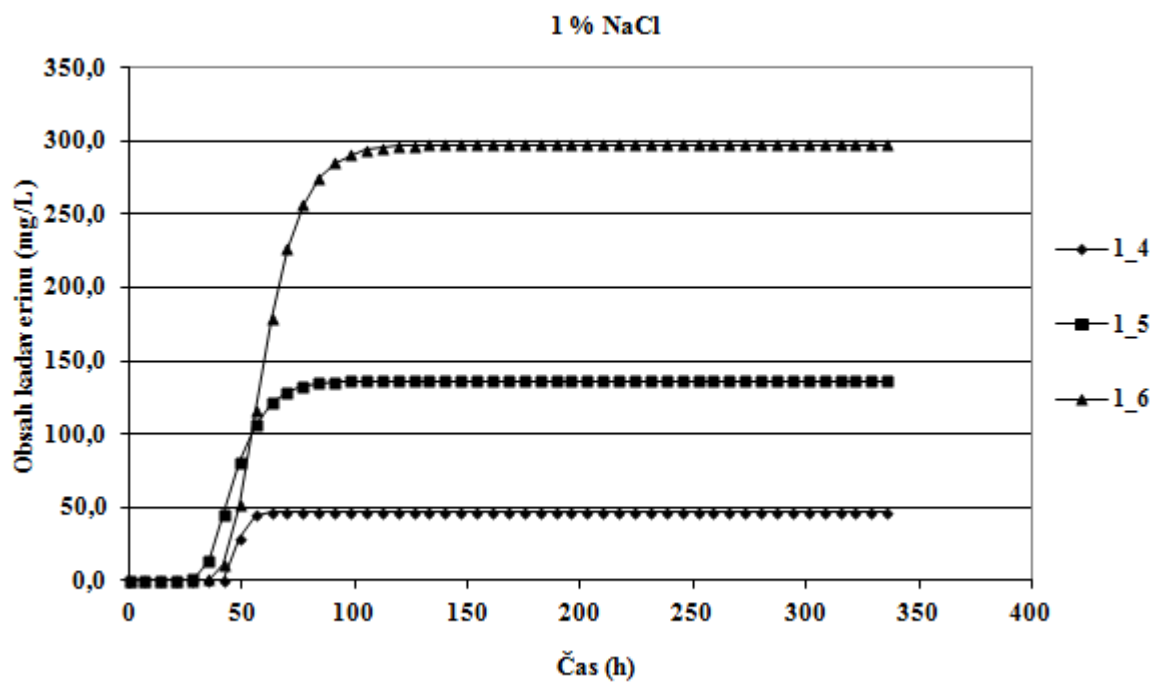
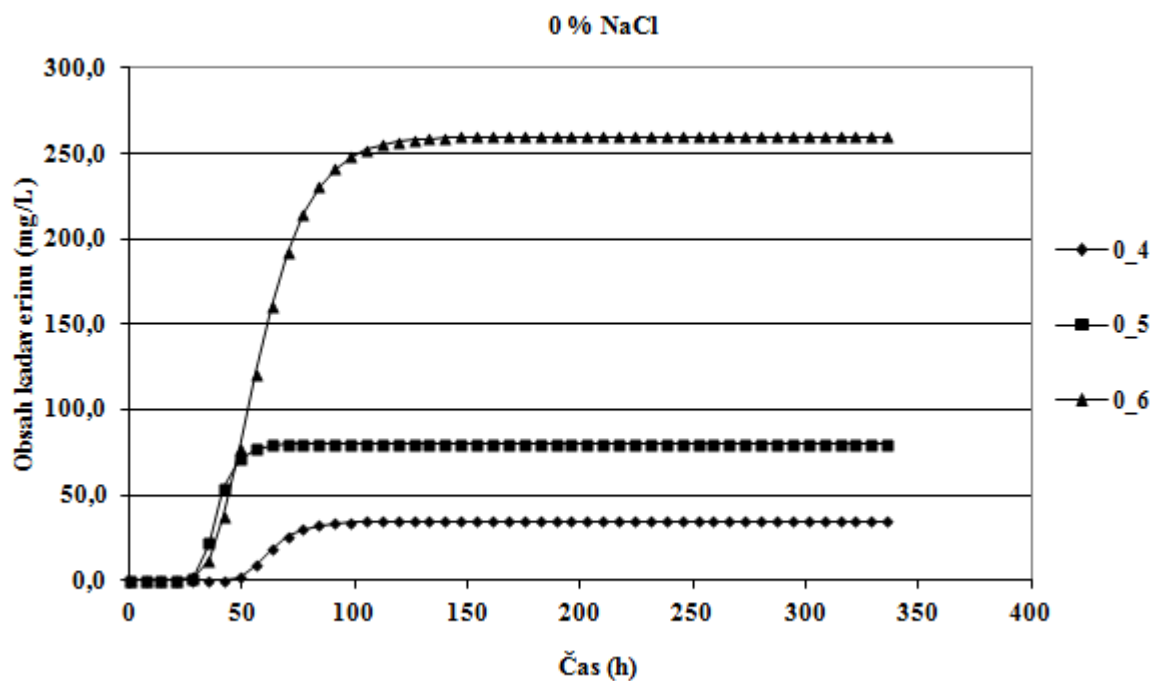


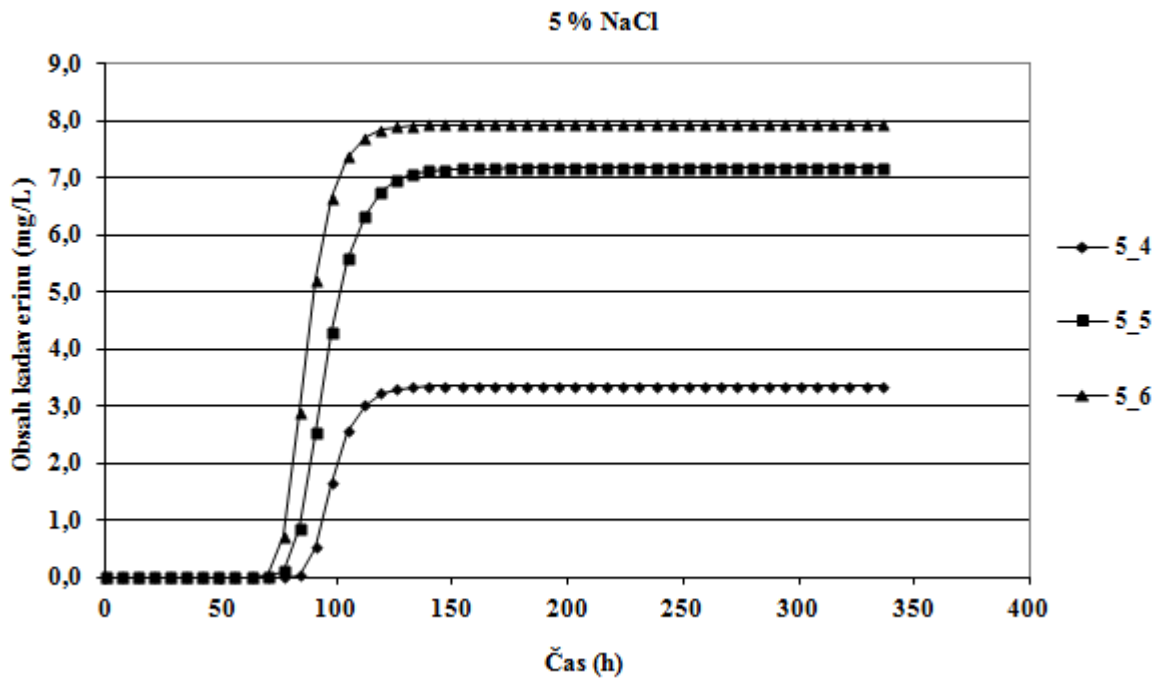
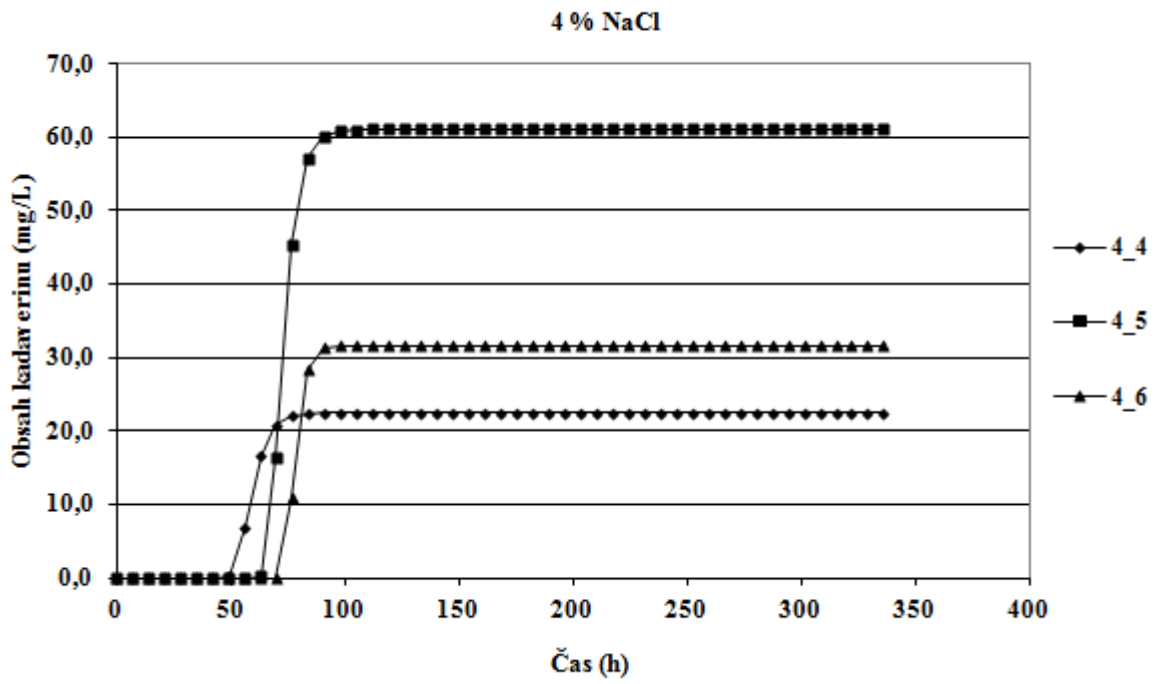


5 % NaCl

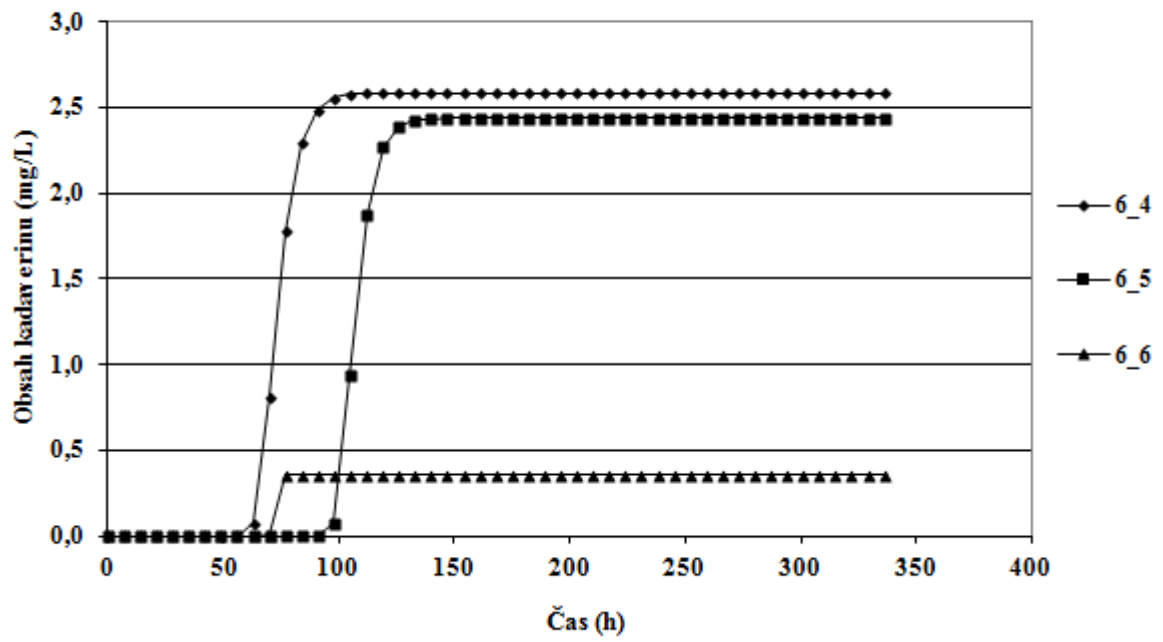


## PŘÍLOHA P IV: PRODUKCE KADAVERINU – 10 °C

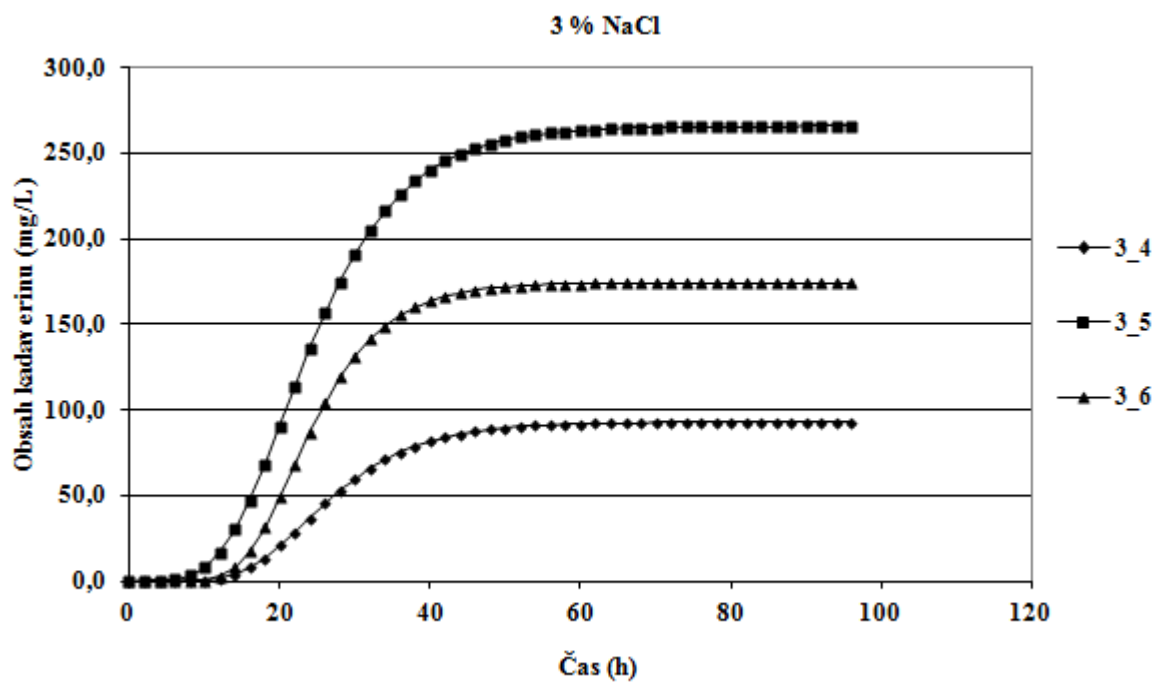
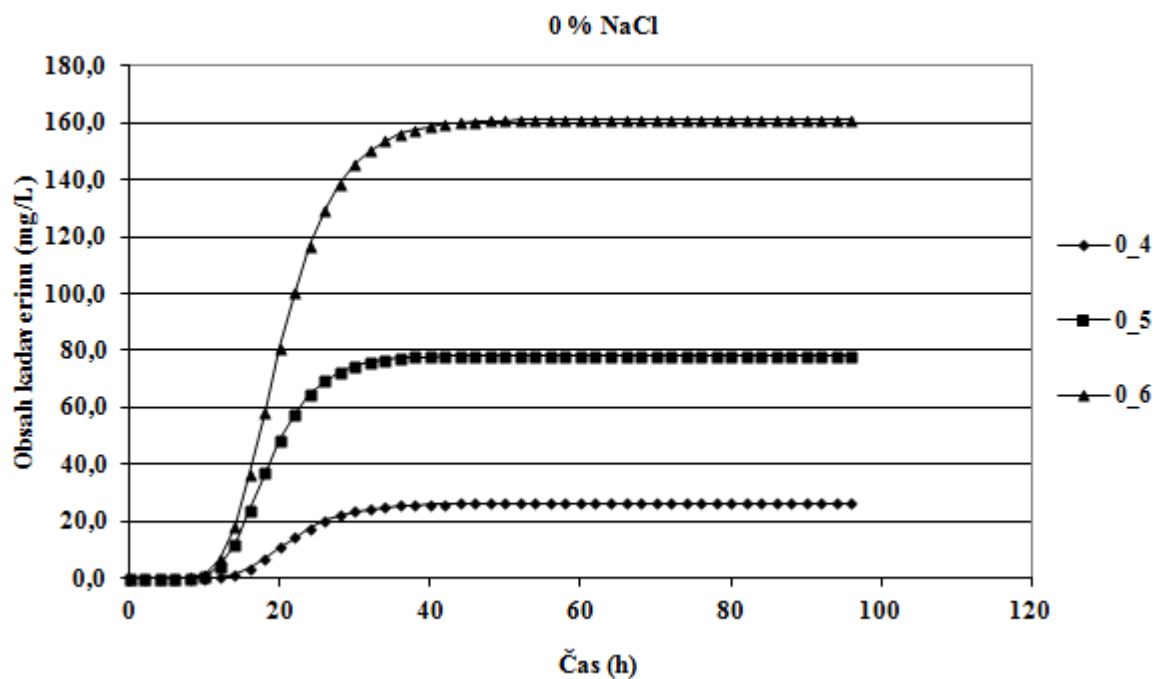




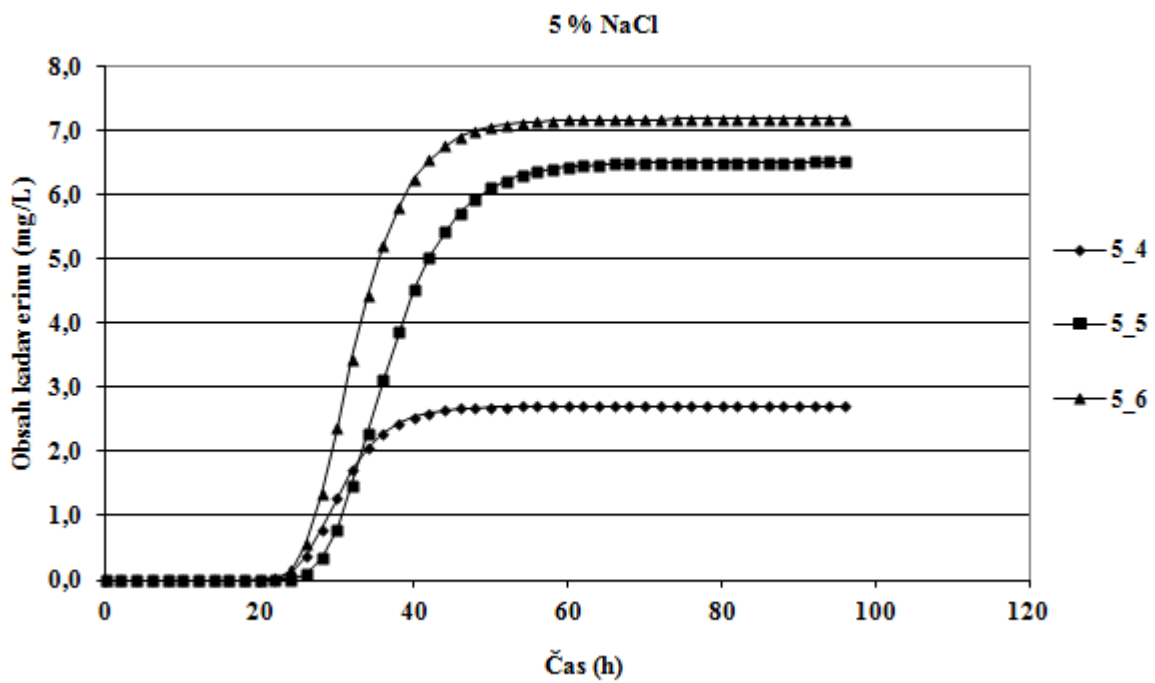
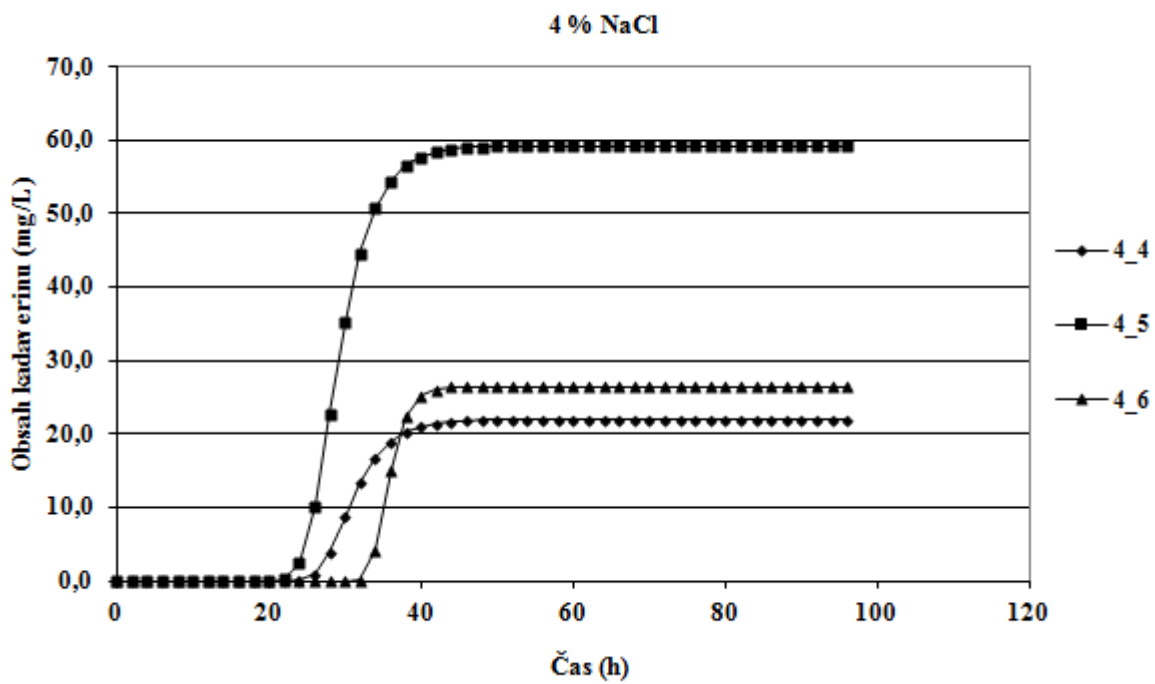
6 % NaCl



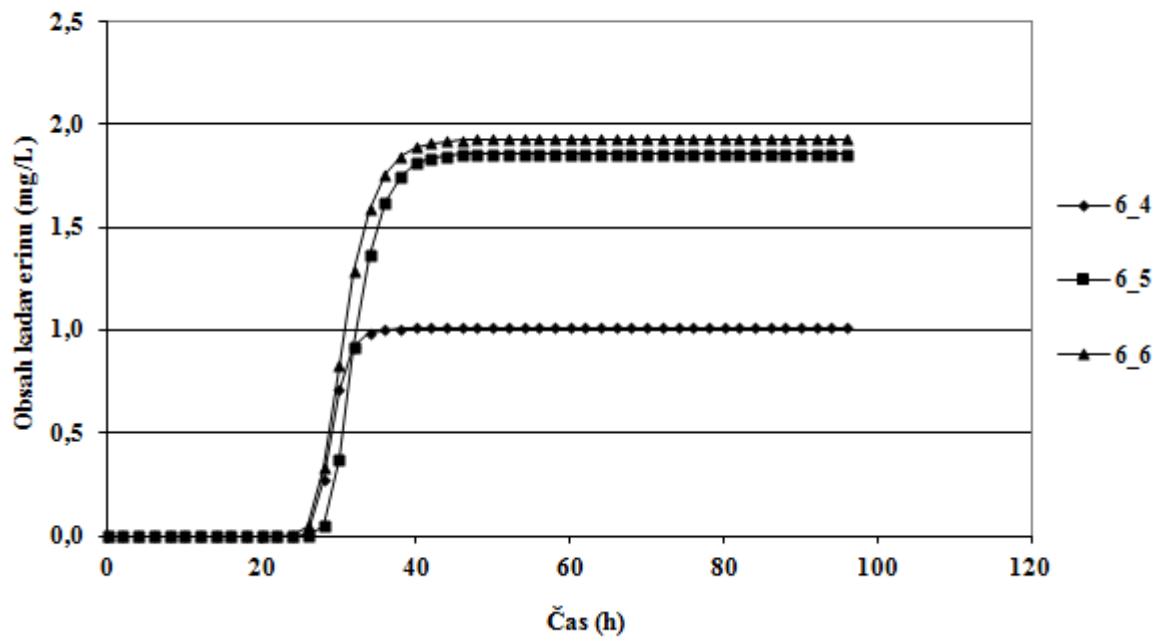
## PŘÍLOHA P V: PRODUKCE KADAVERINU – 20 °C



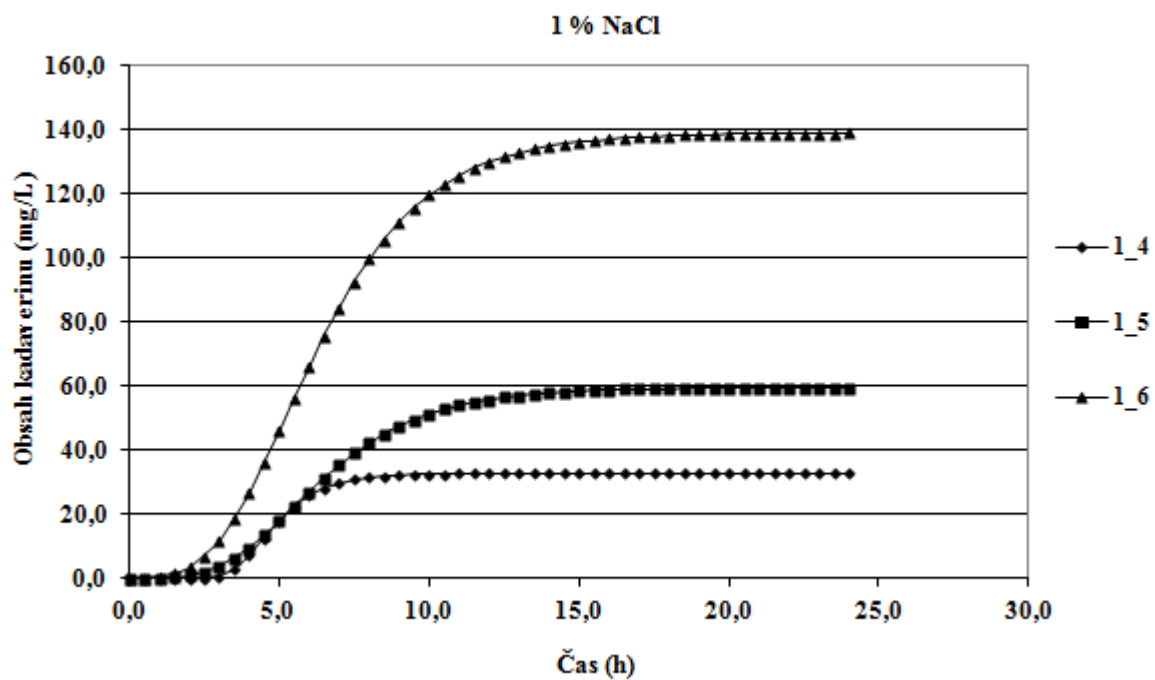
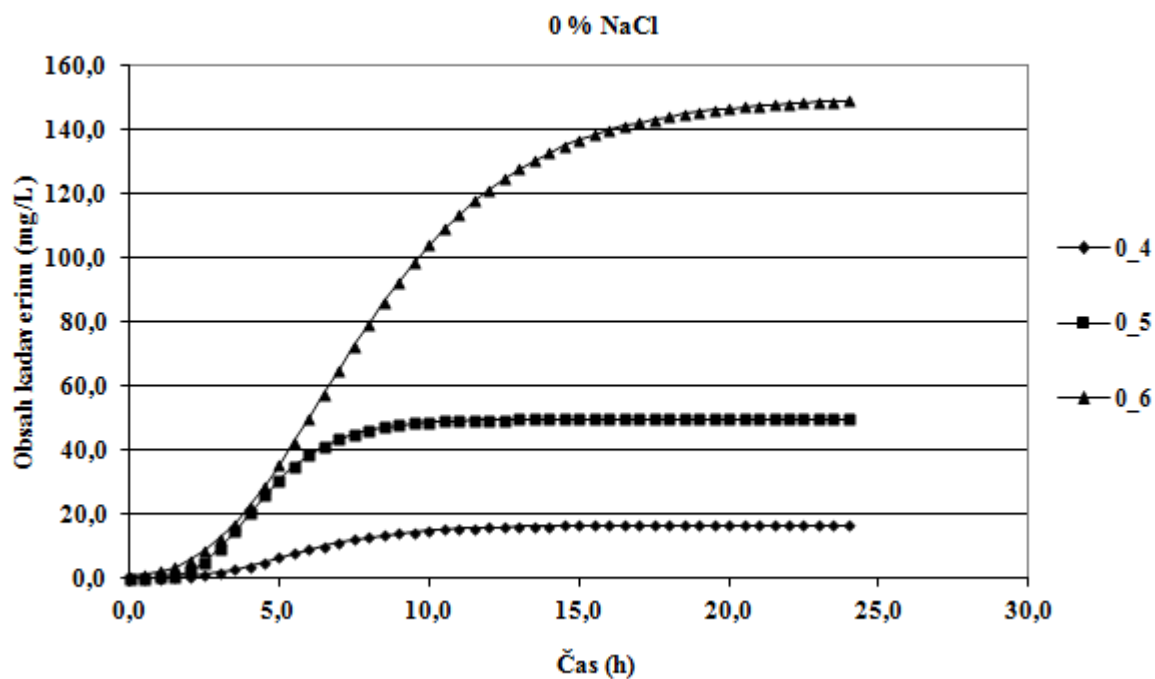


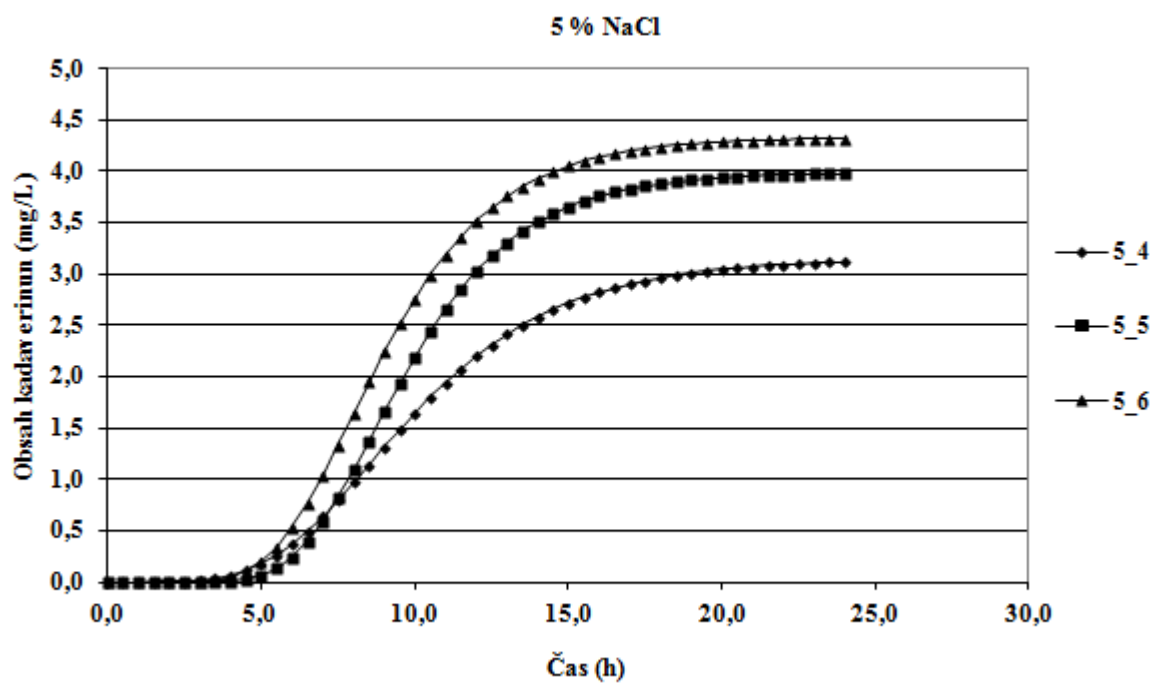
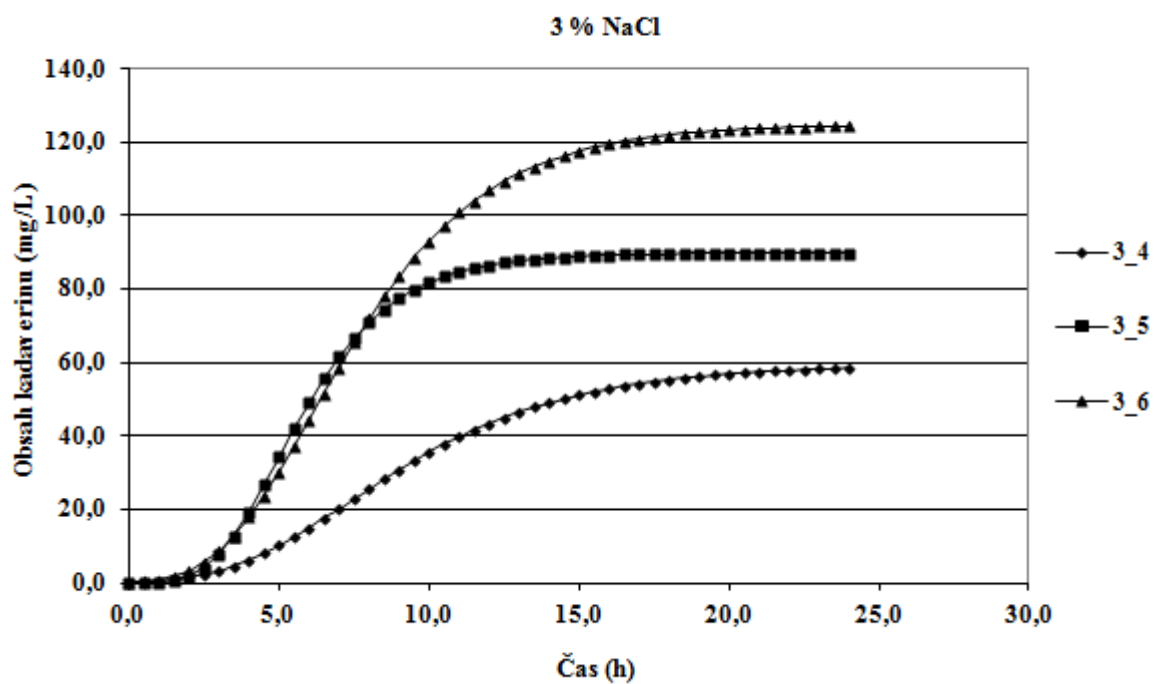


6 % NaCl

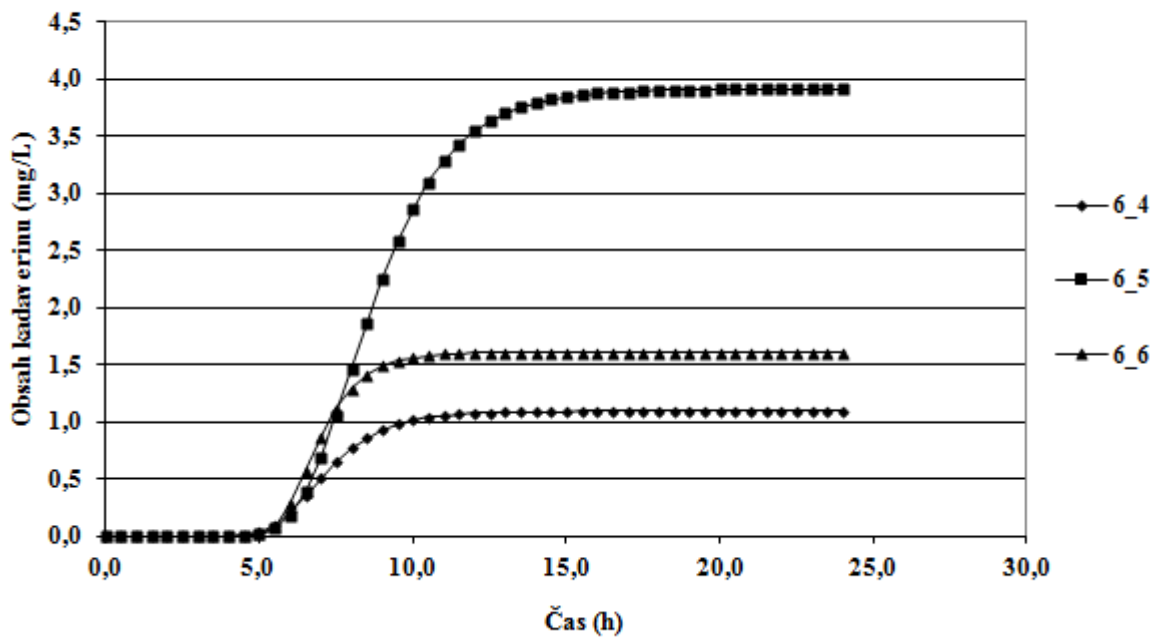


## PŘÍLOHA P VI: PRODUKCE KADAVERINU – 37 °C

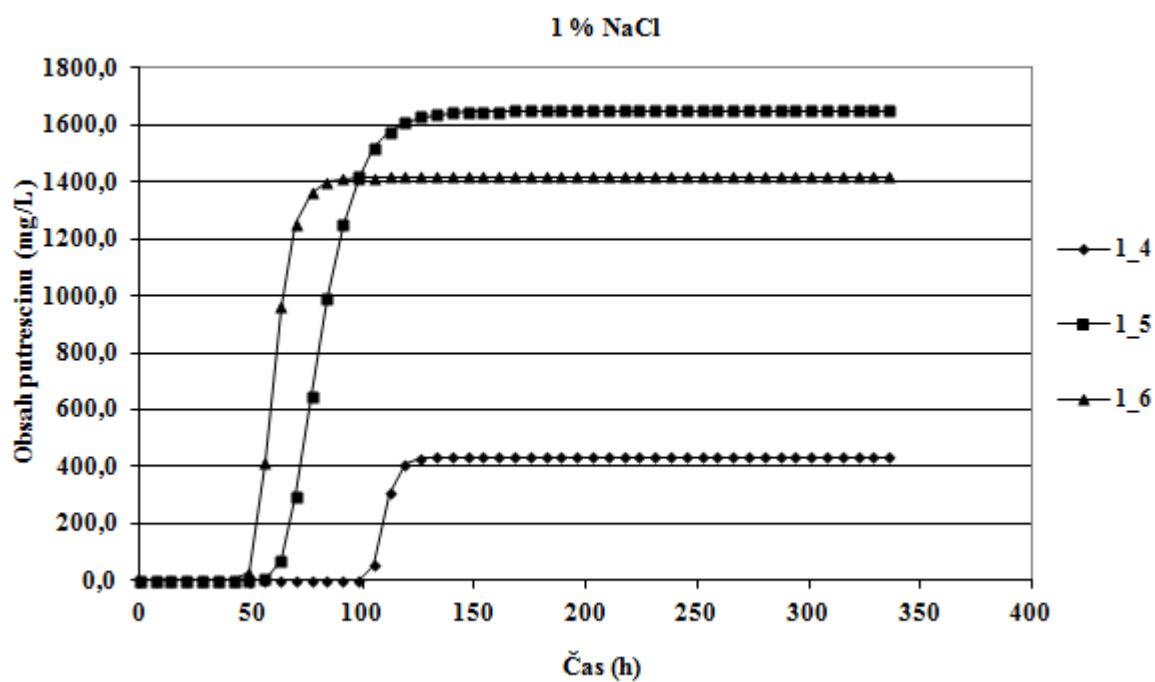
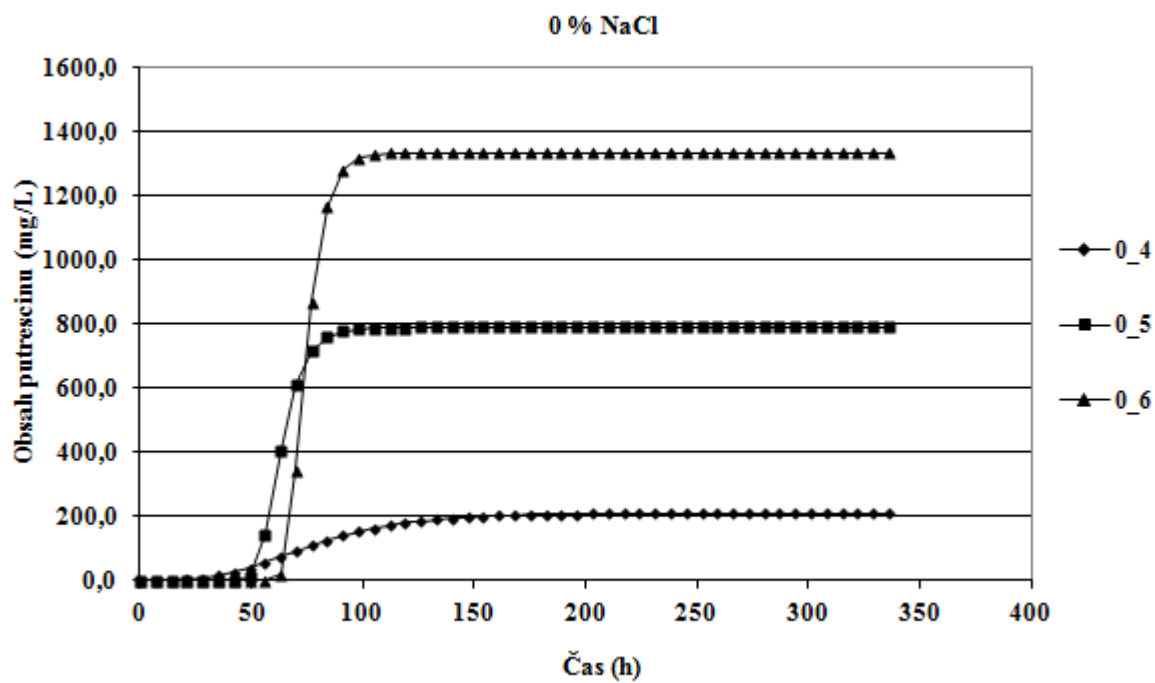


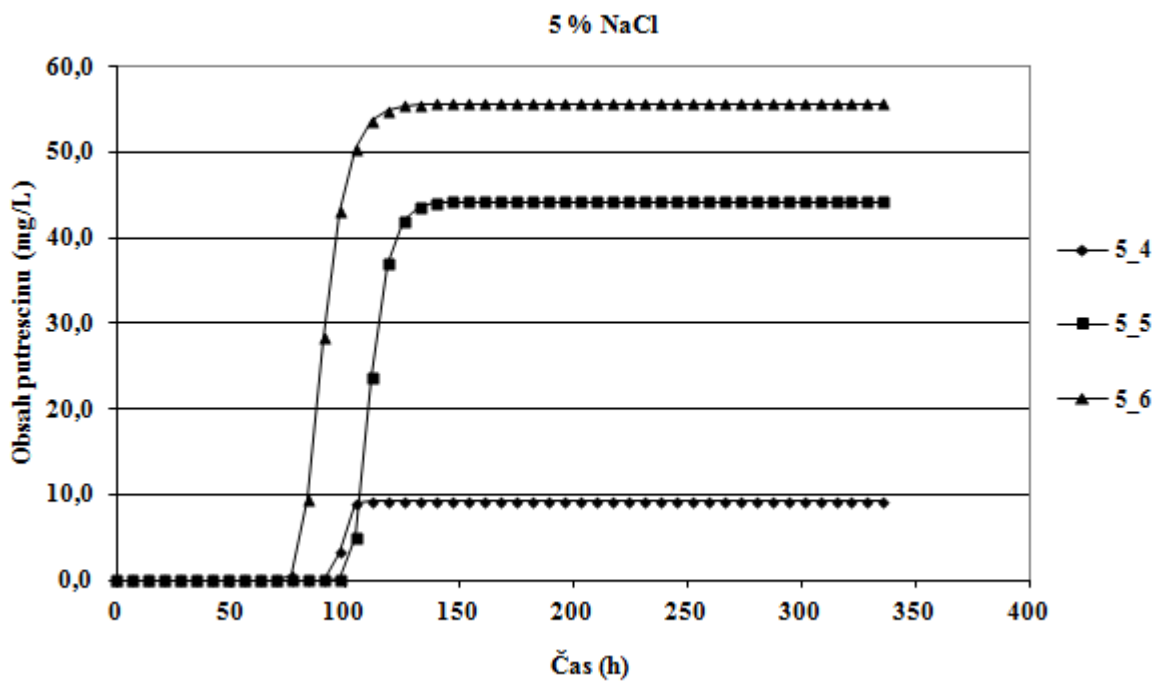
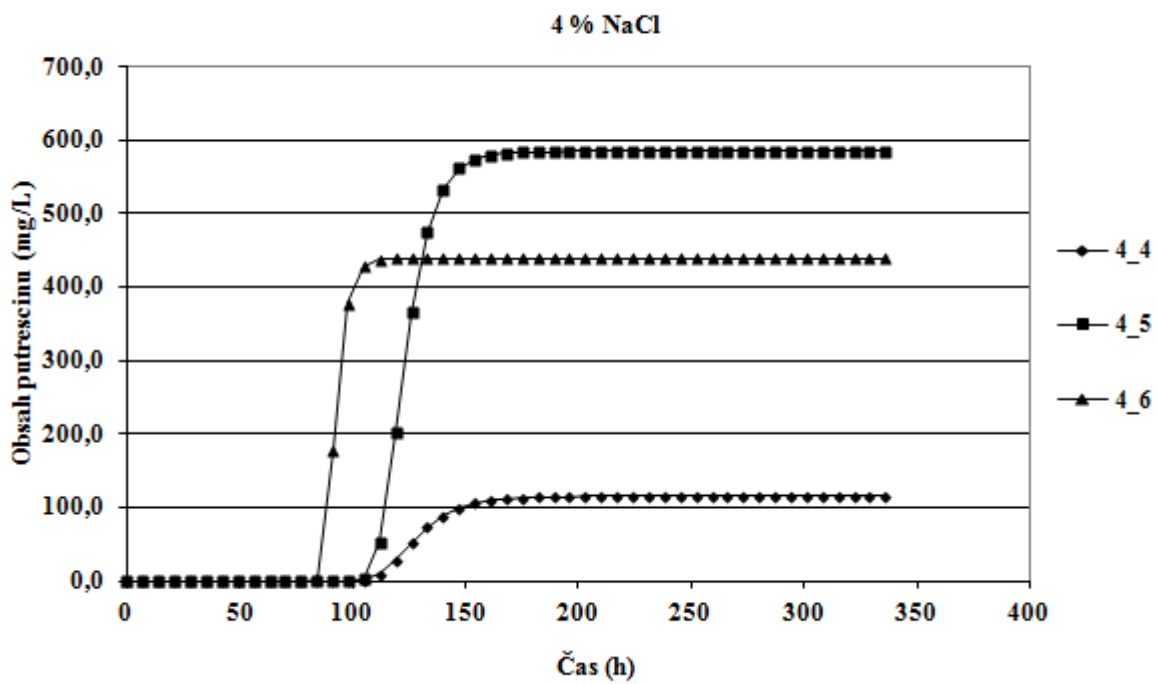


6 % NaCl

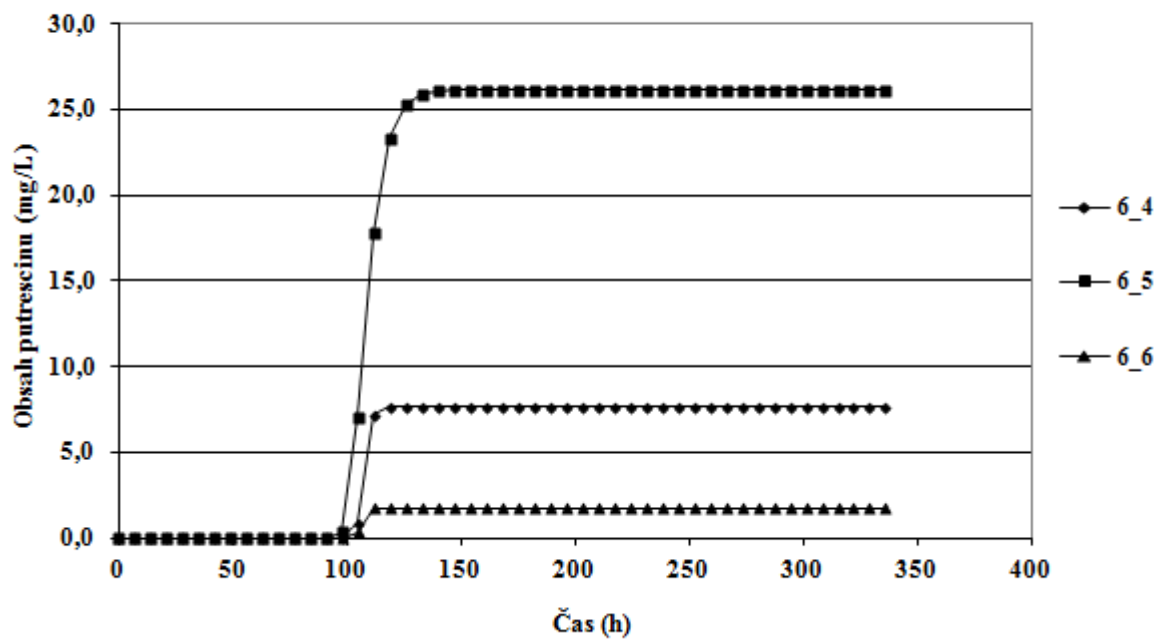


## PŘÍLOHA P VII: PRODUKCE PUTRESCINU – 10 °C



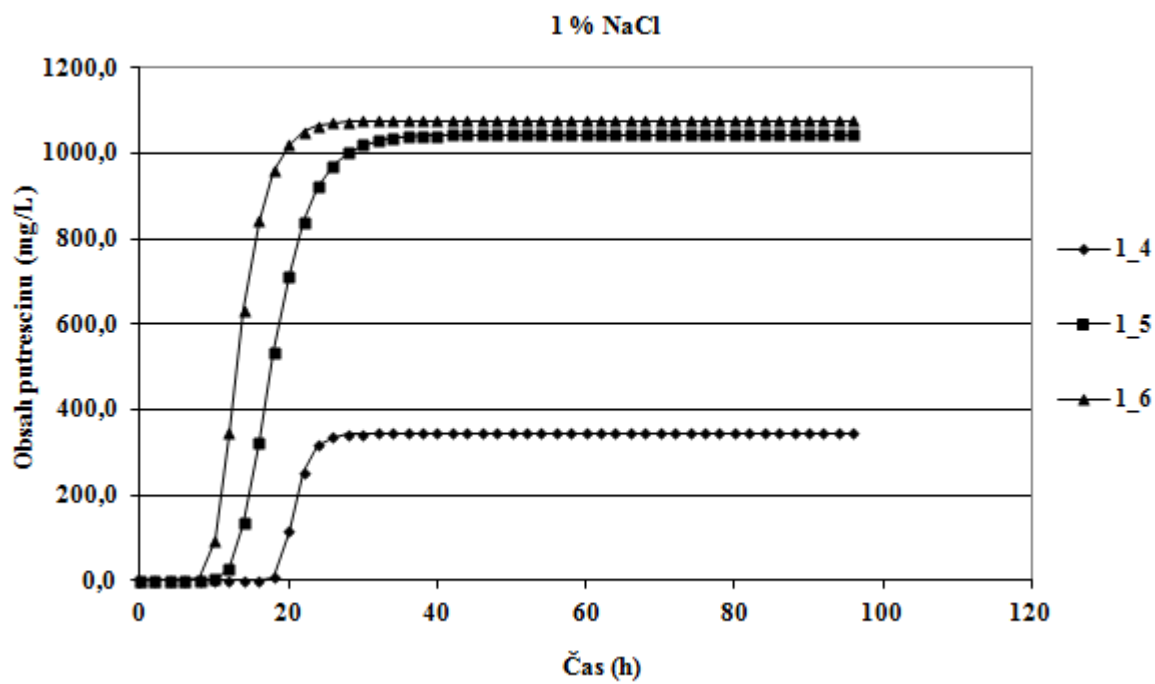
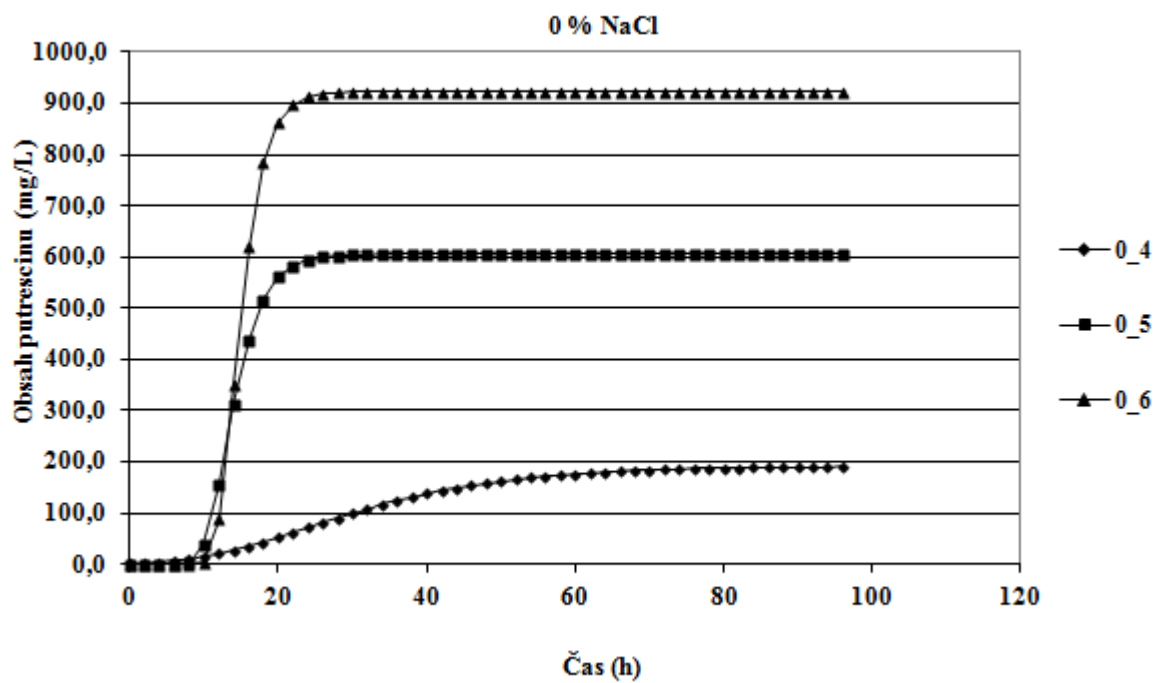


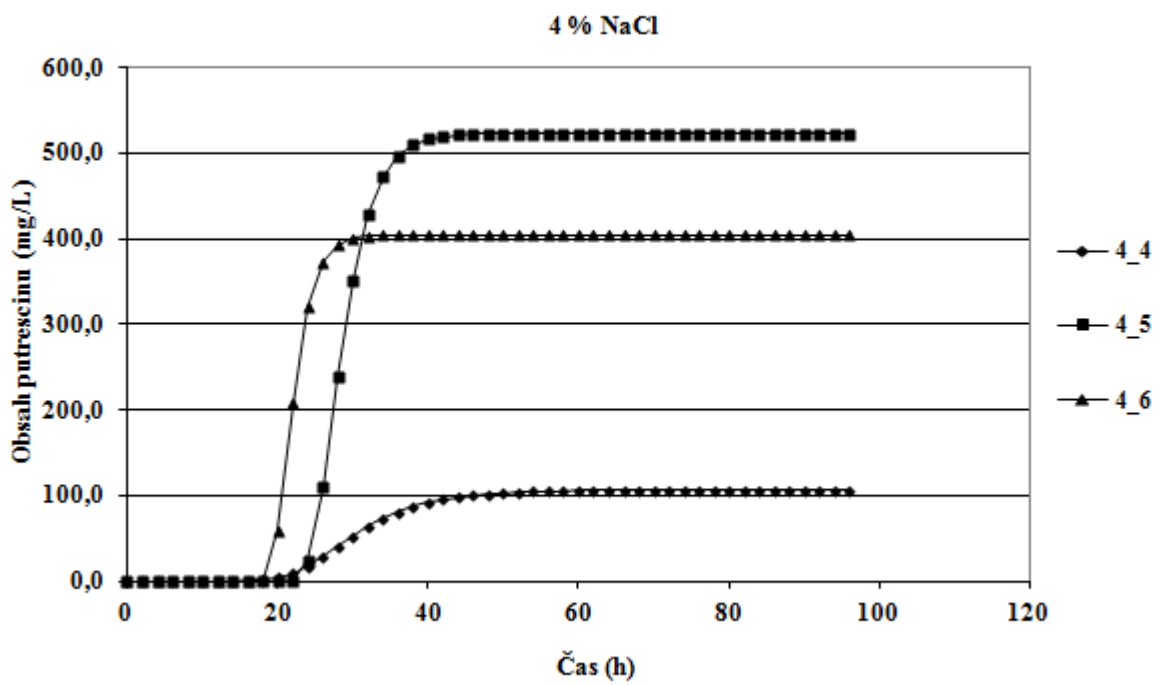
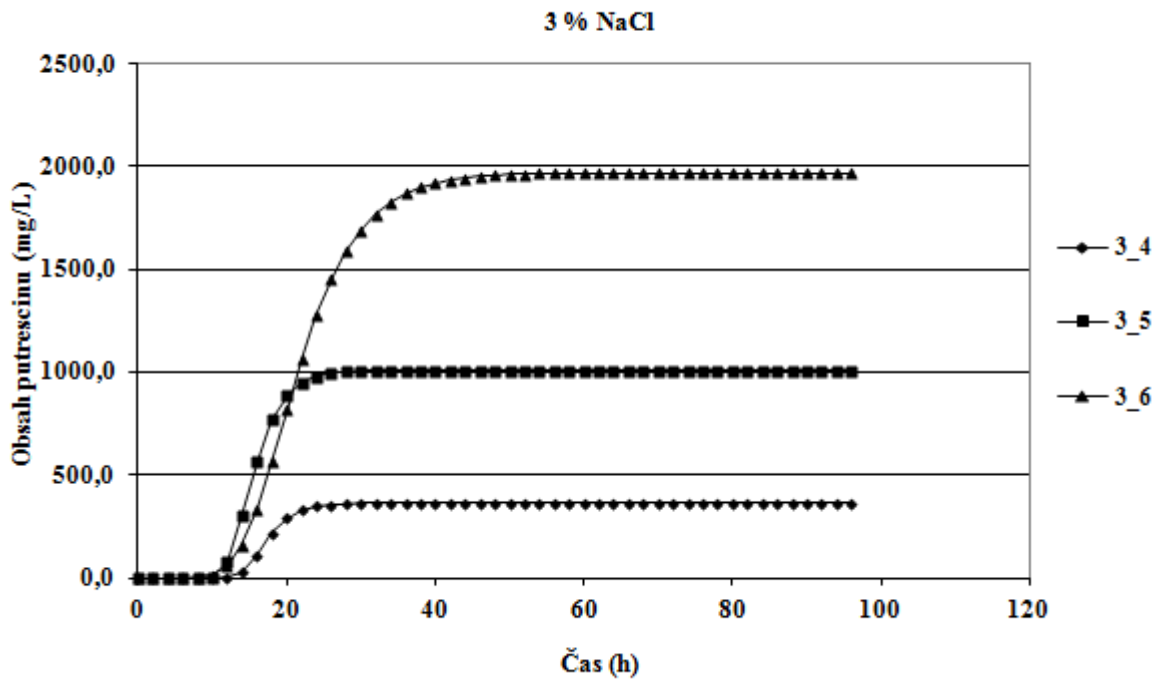
6 % NaCl



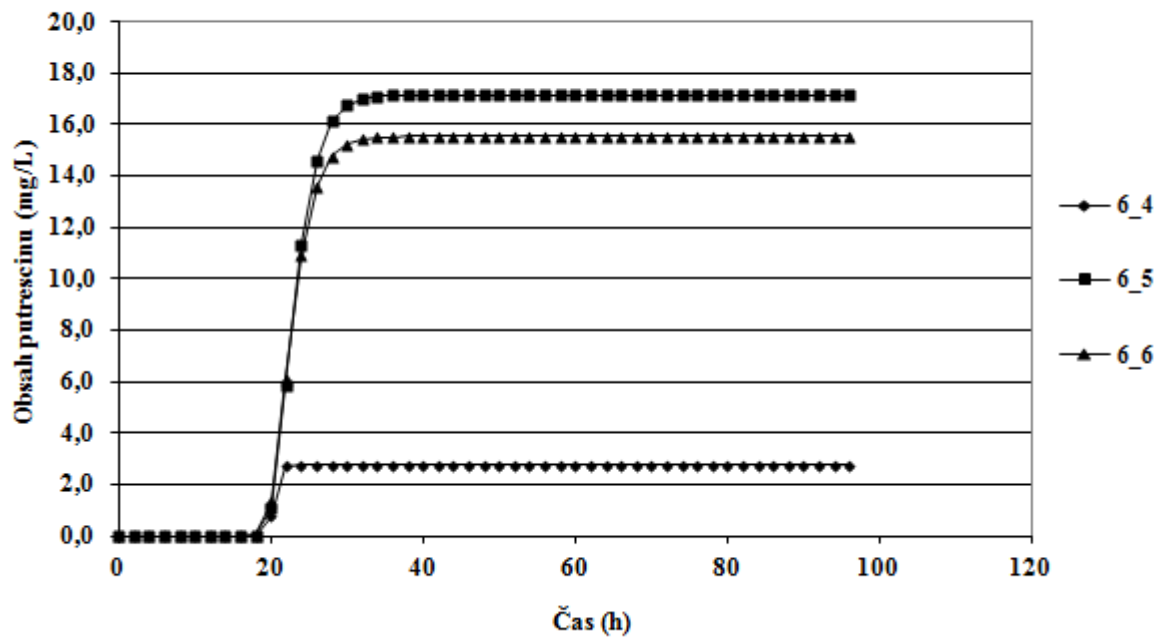


## PŘÍLOHA P VIII: PRODUKCE PUTRESCINU – 20 °C

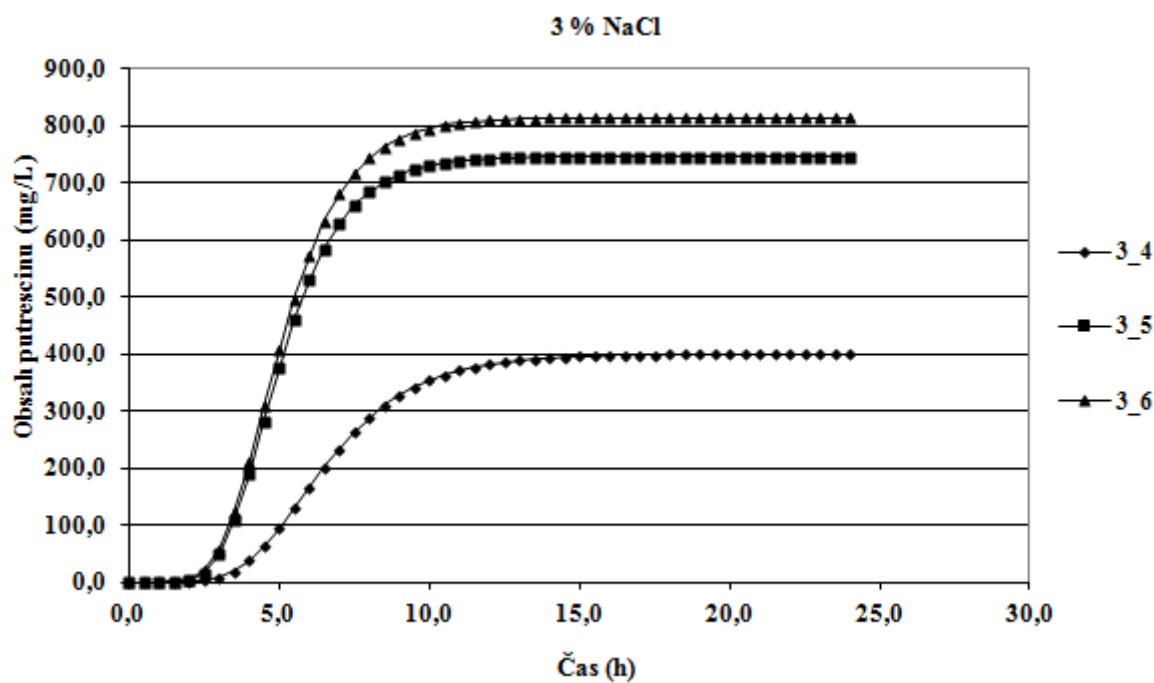
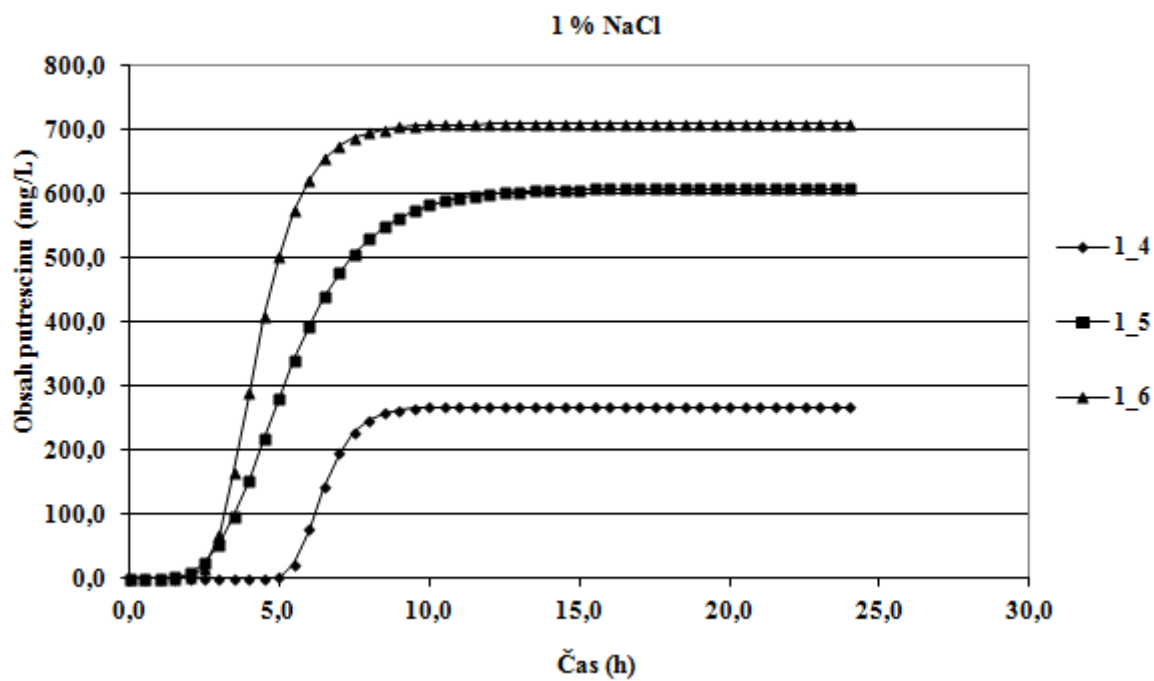


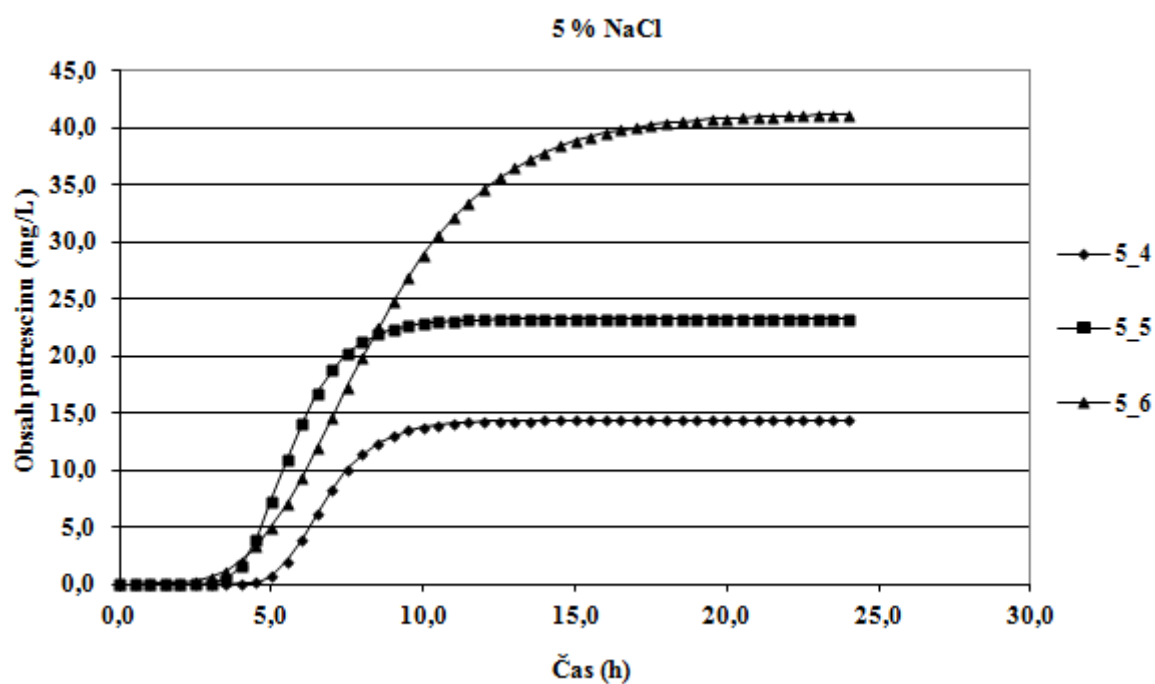
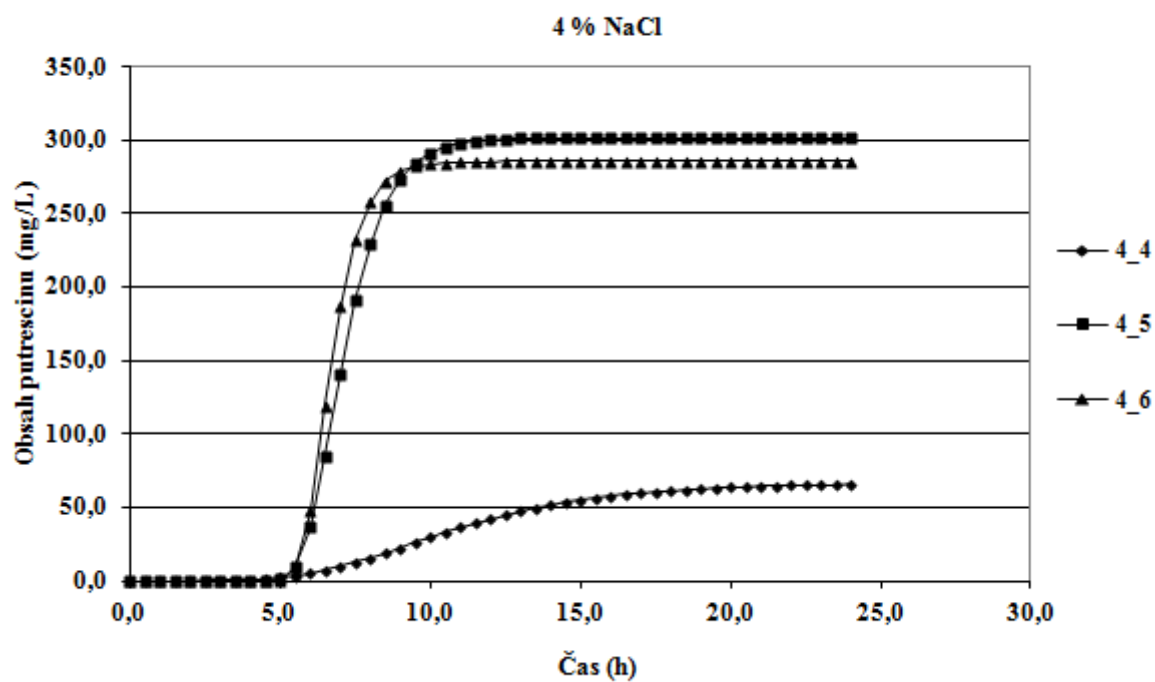


6 % NaCl



## PŘÍLOHA P IX: PRODUKCE PUTRESCINU – 37 °C





6 % NaCl

