

Dekarboxylázová aktivita bakterie  
*Serratia marcescens*

Bc. Adéla Andresová

---

Diplomová práce  
2010



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická

---

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická  
Ústav biochemie a analýzy potravin  
akademický rok: 2009/2010

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Adéla ANDRESOVÁ**  
Osobní číslo: **T080329**  
Studijní program: **N 2901 Chemie a technologie potravin**  
Studijní obor: **Technologie, hygiena a ekonomika výroby potravin**

Téma práce: **Dekarboxylázová aktivita bakterie *Serratia marcescens***

Zásady pro vypracování:

- Popsat biogenní aminy se zaměřením na jejich fyziologické účinky.
- Charakterizovat enzymy, zejména enzymy ze skupiny dekarboxyláz.
- Popsat inhibice enzymů.
- Sledovat vybrané faktory ovlivňující růst bakterie *Serratia marcescens* a její produkci biogenních aminů.

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

[1] VELÍŠEK, J. *Chemie potravin 3, OSSIS, Tábor 2002.*

[2] LEDVINA, M., STOKLASOVÁ, A., CERMAN, J. *Biochemie pro studující medicíny I.díl, Nakladatelství Karolinum, UK v Praze 2005.*

[3] ADAMS, M., NOUT, M.J.R. *Fermentation and food safety, Aspen Publishers, Gaithersburg 2001.*

[4] ZEHNÁLEK, J. *Biochemie. Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, Brno 2005.*

Vedoucí diplomové práce:

**Ing. Zuzana Lazárková, Ph.D.**

Ústav biochemie a analýzy potravin

Datum zadání diplomové práce:

**4. ledna 2010**

Termín odevzdání diplomové práce:

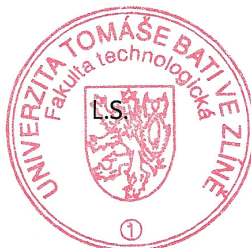
**19. května 2010**

Ve Zlíně dne 8. dubna 2010



doc. Ing. Petr Hlaváček, CSc.

*děkan*



prof. Ing. Ignác Hoza, CSc.

*ředitel ústavu*

Příjmení a jméno: .....

Obor: .....

## 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 užít své dílo – diplomovou/bakalářskou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- beru na vědomí, že pokud bylo k vypracování diplomové/bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tedy pouze k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové/bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- beru na vědomí, že pokud je výstupem diplomové/bakalářské práce jakýkoliv softwarový produkt, považují se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Ve Zlíně .....

.....

---

<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 nevýdělečně zveřejňuje disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce, u kterých proběhla obhajoba, včetně posudků oponentů a výsledku obhajoby prostřednictvím databáze kvalifikačních prací, kterou spravuje. Způsob zveřejnění stanoví vnitřní předpis vysoké školy.

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

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

<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 vzdělávacímu 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 přihledne k výši výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

## ABSTRAKT

Diplomová práce se zabývá sledováním dekarboxylázové aktivity bakterie *Serratia marcescens* a její produkce biogenních aminů. V první části jsou charakterizovány biogenní aminy se zaměřením na jejich fyziologické účinky, tvorbu a výskyt v potravinách. Další část je zaměřena na popis enzymů a to hlavně na skupinu *dekarboxyláz* a faktory ovlivňující jejich činnost. Poslední pasáž je věnována enzymové aktivaci a inhibici. V praktické části byly aplikovány vybrané faktory ovlivňující růst bakterie a její dekarboxylázovou činnost. Produkce biogenních aminů byla stanovena pomocí iontově výměnné chromatografie s postkolonovou derivatizací a spektrofotometrickou detekcí. Optimální pH pro růst *Serratie marcescens* bylo pH 7 – 8, zatímco *dekarboxylázy* projevily největší aktivitu při pH 6. Monosacharidy stimulovaly růst bakterie a zvyšovaly tvorbu putrescinu při pH 6. Naopak, při pH 7 a 8 došlo vlivem přídavku monosacharidů k inhibici produkce putrescinu.

Klíčová slova: biogenní aminy, *dekarboxylázy*, *Serratia marcescens*, inhibice, pH, monosacharidy

## ABSTRACT

Diploma thesis deals with monitoring decarboxylase activity of the bacteria *Serratia marcescens* and its production of biogenic amines. In the first part, there is described characteristic of biogenic amines focused on his physiological effects, formation and occurrence in foods. The next part is aimed on the description of enzymes, especially group of *decarboxylases* and the factors that influence their activity. The last passage is applied to enzymic activation and inhibition. In the practical part, there were applied the chosen factors affecting growth of the bacteria and its decarboxylase activity. The production of biogenic amines was assessed with use of ion-exchange chromatography with post-column ninhydrine derivatization and spectrophotometric detection. The optimal pH for *S. marcescens* growth was 7 – 8, while *decarboxylases* exhibited their maximum activity at pH 6. The monosaccharides stimulated growth of bacteria and increased the production of putrescine at pH 6. On the contrary addition of monosaccharides at pH 7 and 8 led to inhibition in production of putrescine.

Keywords: biogenic amines, *decarboxylases*, *Serratia marcescens*, inhibition, pH, monosaccharides

Chtěla bych poděkovat vedoucí mé diplomové práce Ing. Zuzaně Lazárkové, Ph.D. za odborné vedení, spolupráci, cenné rady a připomínky během zpracování mé diplomové práce.

Dále bych chtěla poděkovat doc. Ing. Františku Buňkovi, Ph.D. a doc. RNDr. Leoně Buňkové, Ph.D. za pomoc a cenné rady při práci na praktické části diplomové práce.

Také bych ráda poděkovala laborantce Bc. Ludmile Zálešákové, DiS. a Bc. Haně Miklíkové za ochotu a pomoc při práci 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 STRUKTURA A TVORBA.....	13
1.2 VÝSKYT.....	15
1.2.1 Materiály rostlinného původu .....	16
1.2.2 Materiály živočišného původu .....	16
1.2.3 Nápoje .....	17
1.3 BIOLOGICKÉ ÚČINKY .....	18
1.4 BAKTERIE TVOŘÍCÍ BIOGENNÍ AMINY .....	19
1.5 STANOVENÍ .....	21
<b>2 ENZYMY</b> .....	<b>23</b>
2.1 DEFINICE A STRUKTURA .....	24
2.2 SLOŽENÍ A MOLEKULOVÁ HMOTNOST .....	26
2.3 FORMY ENZYMŮ .....	27
2.4 NÁZVOSLOVÍ A KLASIFIKACE.....	27
2.5 AKTIVITA ENZYMŮ, SPECIFITA A ÚČINNOST KATALÝZY .....	30
2.6 KINETIKA ENZYMŮVÝCH REAKCÍ.....	31
2.6.1 Jednosubstrátové reakce.....	32
2.6.2 Dvousubstrátové reakce .....	34
2.7 PODMÍNKY PRO ENZYMŮVOU KATALÝZU.....	34
2.8 <i>DEKARBOXYLÁZY</i> .....	35
2.9 FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ ČINNOST <i>DEKARBOXYLÁZ</i> .....	37
<b>3 AKTIVACE A INHIBICE ENZYMŮ</b> .....	<b>39</b>
3.1 AKTIVACE ENZYMŮ .....	39
3.2 INHIBICE ENZYMŮ.....	39
3.2.1 Kompetitivní inhibice.....	40
3.2.2 Nekompetitivní inhibice.....	41
3.2.3 Akompetitivní inhibice.....	41
3.2.4 Smíšené inhibice .....	42
<b>II PRAKTICKÁ ČÁST</b> .....	<b>43</b>
<b>4 CÍL PRÁCE</b> .....	<b>44</b>
<b>5 MATERIÁL A METODIKA</b> .....	<b>45</b>
5.1 CHARAKTERISTIKA BAKTERIE <i>SERRATIA MARCESCENS</i> .....	45
5.2 POUŽITÉ CHEMIKÁLIE A PŘÍSTROJE .....	45
5.2.1 Chemikálie .....	45

5.2.2	Přístroje .....	46
5.3	MIKROBIOLOGICKÉ ANALÝZY.....	46
5.3.1	Kultivační média .....	46
5.3.2	Kultivace bakterie .....	47
5.3.3	Optimalizace složení kultivačního média .....	48
5.3.4	Stanovení počtu bakteriálních buněk .....	48
5.3.5	Stanovení vlivu pH a přídavku monosacharidů na růst a dekarboxylázovou aktivitu <i>Serratia marcescens</i> .....	49
5.4	STANOVENÍ OBSAHU BIOGENNÍCH AMINŮ.....	49
5.4.1	Příprava vzorků .....	49
5.4.2	Iontově výměnná kapalinová chromatografie .....	50
5.5	STATISTICKÉ VYHODNOCENÍ VÝSLEDKŮ.....	50
<b>6</b>	<b>VÝSLEDKY A DISKUZE.....</b>	<b>51</b>
6.1	OPTIMALIZACE SLOŽENÍ KULTIVAČNÍHO MÉDIA.....	51
6.2	STANOVENÍ POČTU BAKTERIÁLNÍCH BUNĚK .....	52
6.3	STANOVENÍ VLIVU pH A PŘÍDAVKU MONOSACHARIDŮ NA RŮST A DEKARBOXYLÁZOVOU AKTIVITU <i>SERRATIA MARCESCENS</i> .....	54
6.4	DISKUZE.....	60
	<b>ZÁVĚR .....</b>	<b>64</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....</b>	<b>66</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK .....</b>	<b>73</b>
	<b>SEZNAM OBRÁZKŮ .....</b>	<b>75</b>
	<b>SEZNAM TABULEK.....</b>	<b>76</b>
	<b>SEZNAM PŘÍLOH.....</b>	<b>77</b>

## ÚVOD

S výrobou potravin jsou spojovány různé druhy mikroorganismů, jimiž jsou kvasinky, bakterie a plísně. Kvasinky se uplatňují při výrobě pečiva nebo alkoholu, bakterie působí při vzniku fermentovaných mléčných výrobků a tzv. ušlechtilé plísně se tvoří při výrobě některých sýrů a uzenin. K výrobě těchto a celé řady podobných výrobků se využívá metabolické činnosti mikroorganismů. Jejich metabolická činnost může ale rovněž ovlivnit kvalitu potravin i jejich zdravotní nezávadnost. V potravinách dochází k působení mikrobiálních enzymů jako jsou *proteázy*, *lipázy*, *amylázy*, které štěpí základní živiny. Jiné enzymy mohou svou činností vyvolat vznik toxických látek. Mezi tyto enzymy patří *dekarboxylázy*. Jak čisté bakteriální kultury, tak i kontaminující mikroflóra tvoří specifické *dekarboxylázy*, které katalyzují dekarboxylaci volných aminokyselin za vzniku biogenních aminů [1].

Biogenní aminy jsou nízkomolekulární organické látky s biologickou aktivitou. Nízké koncentrace biogenních aminů jsou pro člověka významné, protože plní v těle důležité funkce (stavební, metabolické, regulační, sekreční, stimulační apod). Naopak jejich vysoké koncentrace vedou k alimentárním intoxikacím [2].

Aminokyselinové *dekarboxylázy* jsou rozšířeny u některých druhů mikroorganismů a vykazují výraznou aktivitu. Mezi tyto mikroorganismy patří i gramnegativní bakterie *Serratia marcescens* z čeledi *Enterobacteriaceae*. *Dekarboxylázy* bakterie *S. marcescens* mohou navenek měnit oblast účinku a intenzitu své aktivity, která je ovlivňována řadou faktorů. Záleží na složení média (přítomnost volných aminokyselin) a vhodných podmínkách pro růst bakterie a její produkci *dekarboxyláz* (teplota, pH prostředí, přítomnost kyslíku, přítomnost sacharidů, koncentrace NaCl, redoxní potenciál a přítomnost již vytvořeného biogenního aminu v médiu) [3, 4].

Tato práce se zabývá sledováním vybraných faktorů působících na růst a *dekarboxylázovou* aktivitu bakterie *Serratia marcescens*.

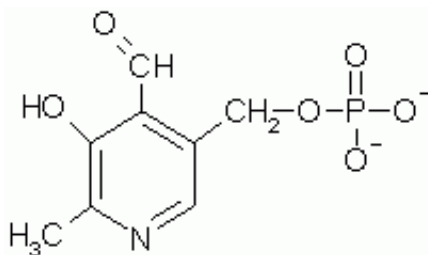
## **I. TEORETICKÁ ČÁST**

## 1 BIOGENNÍ AMINY

Biogenní aminy jsou skupinou dusíkatých sloučenin, které vznikají dekarboxylací aminokyselin nebo aminací a transaminací karbonylových sloučenin – aldehydů a ketonů. Jsou to nízkomolekulární organické báze, jenž jsou produkty metabolické aktivity zvířat, rostlin a mikroorganismů [3, 5]. Některé mají významné biologické vlastnosti, jsou např. tkáňovými hormony (histamin), protoalkaloidy (hordenin, gramin) a stavebními látkami, které se účastní biosyntézy dalších hormonů živočichů (fenyletylamin), fytohormonů neboli auxinů, alkaloidů a dalších sekundárních metabolitů rostlin [2].

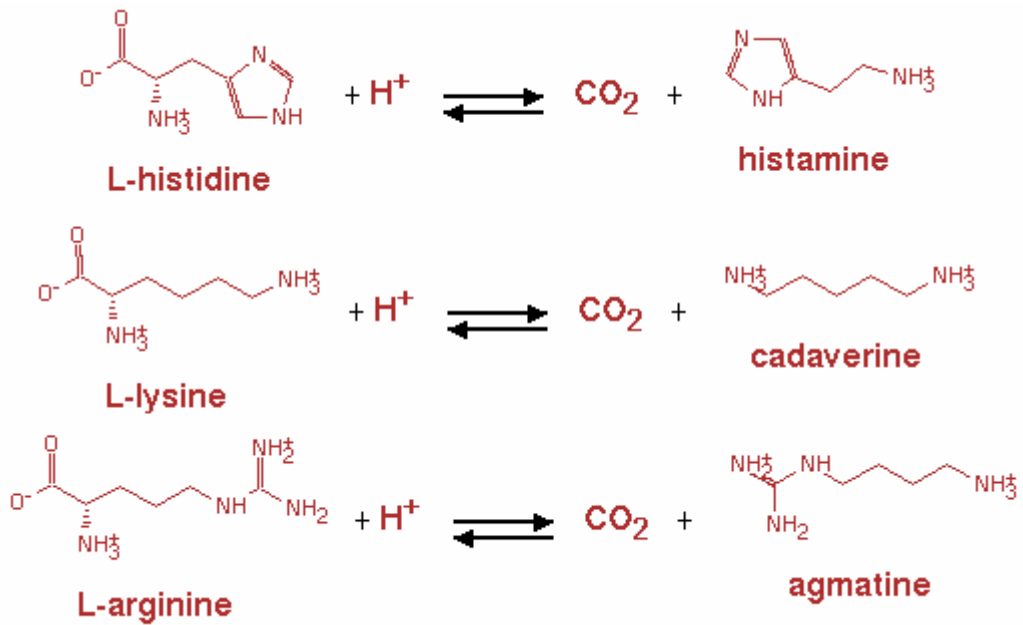
### 1.1 Struktura a tvorba

Z chemického hlediska mají biogenní aminy alifatickou (putrescin, kadaverin, spermin, spermidin, agmatin), aromatickou (tyramin, fenyletylamin) nebo heterocyklickou (histamin, tryptamin) strukturu [6]. Vznikají působením *dekarboxyláz* – enzymů obsahujících jako kofaktor pyridoxalfosfát (obr. 1). Při jejich transformaci na další biologicky aktivní produkty se uplatňují některé *oxygenázy* a *metyltransferázy*. Předpokladem pro tvorbu biogenních aminů pomocí mikroorganismů je dostupnost volných aminokyselin, přítomnost dekarboxylázy-pozitivních mikroorganismů a dále podmínky, které dovolují bakteriální růst a dekarboxylázovou aktivitu [3].



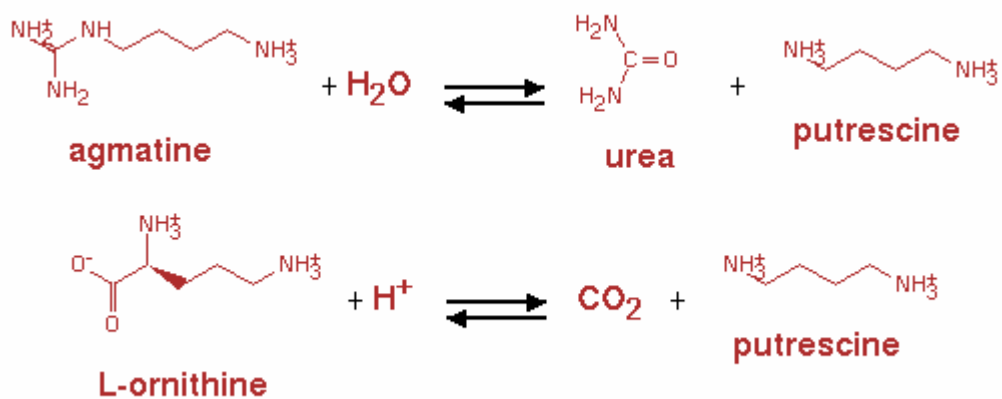
Obr. 1. Kofaktor pyridoxalfosfát [7].

Z histidinu vzniká působením *histidindekarboxylázy* produkt dekarboxylace histamin, z lyzinu vzniká vlivem *lyzindekarboxylázy* kadaverin a z argininu vzniká agmatin (obr. 2).



Obr. 2. Dekarboxylace histidinu, lyzinu a argininu [8].

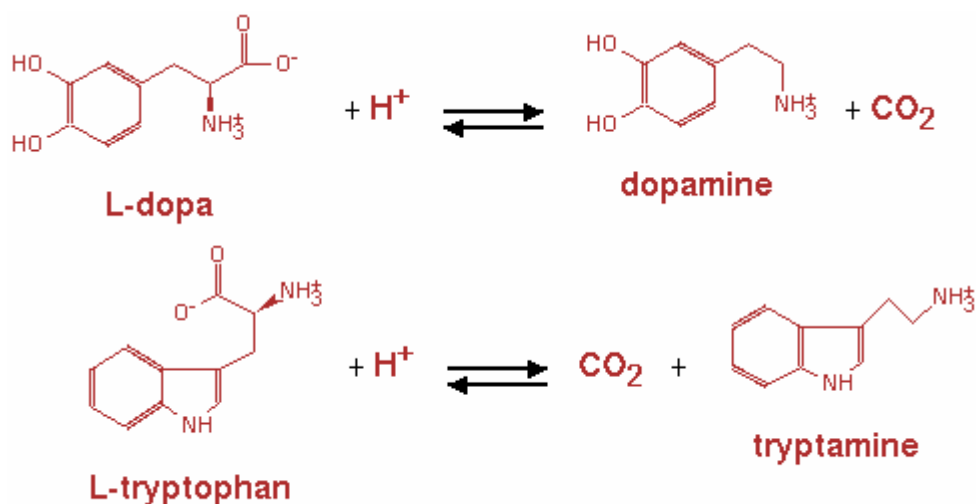
Agmatin se mění na putrescin (obr. 3). Putrescin vzniká také dekarboxylací ornitinu [2]. Z putrescinu vzniká metylací S-adenozylmetioninem spermidin a dále spermin.



Obr. 3. Vznik putrescinu dvěma odlišnými dráhami [8].

Dekarboxylací fenylalaninu *fenylalanindekarboxylázou* vzniká 2-fenyletylamin, z tyrozinu činností *tyrozindekarboxylázy* tyramin a jeho oxidací oktopamin. Z dihydroxyfenylalaninu (L-dopa) vzniká dopamin (vlivem *dihydroxyfenylalanindekarboxylázy*) (obr. 4), oxidací

dopaminu hormon dřeně nadledvinek noradrenalin a jeho reakcí s S-adenozylmetioninem další hormon adrenalin. Z dopaminu vzniká reakcí s acetaldehydem salsalinol – hlavní metabolit v banánech. Oxidací dopaminu pak vznikají melaninové pigmenty. Dekarboxylací tryptofanu *tryptofandekarboxylázou* vzniká tryptamin (obr. 4), ze kterého se tvoří biologicky aktivní látka serotonin. Ze serotoninu se tvoří působením *serotonin-N-acetyltransferázy* N-acetylserotonin a z něj vzniká melatonin – hormon produkovaný epifýzou [2]. V přílohách P I a P II jsou znázorněny nejdůležitější biogenní aminy, jejich prekurzory a také jejich biologický význam.



Obr. 4. Vznik dopaminu a tryptaminu [8].

## 1.2 Výskyt

Biogenní aminy se vyskytují téměř ve všech potravinách jako běžné produkty metabolismu. Ve vyšším množství se biogenní aminy nachází ve fermentovaných výrobcích jako jsou například sýry, trvanlivé salámy, víno, pivo atd., kde vznikají působením mikroorganismů. Oproti tomu kontaminující mikroflóra je produkuje hlavně v mase a rybách během jejich skladování. Vysoké koncentrace biogenních aminů jsou přítomny v potravinách v pokročilém stupni kažení. Vlivem nevhodného skladování se mohou také nacházet v ovoci, zelenině a houbách. Přítomnost biogenních aminů v potravinách a nápojích je dů-

ležitá z toxikologického a technologického hlediska. Vysoké množství těchto látek může vést ke zdravotním problémům [2].

### 1.2.1 Materiály rostlinného původu

Polyaminy existují v buňkách jak ve volné formě, tak i v konjugované. Hlavním biogenním aminem přítomným v ovoci a zelenině je tyramin, další se vyskytují v menším množství. Konjugáty se vyskytují se skořicovými kyselinami nebo s mastnými kyselinami. Dále se v rostlinách nachází i deriváty biogenních aminů. Putrescin je obsažen v pomerančích, mandarinkách, grapefruitech a ve zpracovaných potravinách jako je kečup, zmrazený hrášek a fermentované sójové produkty. Zeleninou obsahující spermidin je sója, květák, brokolice, ledový salát, čínské zelí a čekanka [2, 9].

Ve špenátu se nachází volný histamin, a také N-methylhistamin, N-acetylhistamin a amidy histaminu s karboxylovými kyselinami. Tyramin je obsažen hlavně v banánech. Mimoto v banánech může být fenyletylamin, histamin, dopamin, serotonin a norepinefrin. Z konjugátů biogenních aminů s fenolovými kyselinami jde o hordatiny nacházející se v klíčícím ječmeni. V pšenici jsou přítomny amidy 2-hydroxyputrescinu s ferulovou a *p*-kumarovou kyselinou, jenž vznikají během napadení rostliny [2].

Biogenní aminy, zejména putrescin, se také nachází v solném nálevu fermentovaných výrobků, jsou jimi kysané zelí, okurky a zelené olivy [6].

### 1.2.2 Materiály živočišného původu

V rybách, mase, masných výrobcích a sýrech jsou hlavními biogenními aminy histamin, tyramin, putrescin a kadaverin. U tuňáka a podobných ryb (makrelovitých) bylo zaznamenáno zvýšené množství histaminu, které v těchto rybách vzniká přeměnou histidinu. Obsah biogenních aminů roste především při nevhodném skladování v důsledku působení endogenních a exogenních *proteáz*. Se snižující se teplotou skladování obsah biogenních aminů klesá [4].

Maso a masné výrobky jsou významné pro obsah tyraminu, kadaverinu, putrescinu, sperminu a spermidinu. Tyto látky lze využít jako indikátor čerstvosti masa. Čerstvé maso má



maximálně do  $7 \text{ mg.kg}^{-1}$  kadaverinu a putrescinu, kdežto zkažené maso  $60 \text{ mg.kg}^{-1}$  a více [2]. Čerstvé vepřové maso obsahuje spermin a spermidin a stopy ostatních biogenních aminů. Během skladování jejich obsah vzrůstá s vyšší teplotou. Na obsah biogenních aminů má kromě teploty také vliv doba skladování a atmosféra.

Fermentace je proces, který má značný vliv na tvorbu biogenních aminů při výrobě fermentovaných salámů a některých sýrů a závisí na druhu přítomných mikroorganismů. Nárůst je nejvíce patrný v prvních fázích fermentace výrobků, což bývají zpravidla první tři dny. Čerstvé vepřové maso obsahuje spermin a spermidin a stopy ostatních biogenních aminů. Během skladování jejich obsah vzrůstá s vyšší teplotou [10].

Vysoké hladiny biogenních aminů jsou také zjištěny v sýrech silně znečištěných mikroorganismy kažení. Jsou jimi histamin, tyramin, tryptamin, putrescin, kadaverin a fenyletylamin. Vyšší úrovně biogenních aminů se tvoří v sýrech z pasterovaného mléka než v samotném čerstvém sýru. Bakterie odpovědné za tvorbu biogenních aminů jsou spíše přítomny v mléce před zpracováním než jako kontaminanty v průběhu zpracování. Zvýšená teplota skladování zvyšuje obsah histaminu v sýrech, což bylo prokázáno např. v holandském sýru Gouda [11].

### 1.2.3 Nápoje

V pivovarnictví jsou druhy biogenních aminů závislé na použitých surovinách, na způsobu vaření piva a na možné mikrobiální kontaminaci piva během vaření a skladování [12]. U spontánně kvašeného piva se množství vazoaktivních aminů zvyšuje a to u tyraminu nad  $20 \text{ mg.l}^{-1}$  a okolo  $10 \text{ mg.l}^{-1}$  u histaminu. Tyto hodnoty poukazují na nekvalitní hygienu kvasícího procesu, což může způsobit zdravotní potíže především osobám citlivým na tyto látky [13]. Některé studie uvádějí, že odrůdy ječmene mají značný vliv na obsah aminů, což se také odráží na činnosti aminokyselinových *dekarboxyláz*. Při zpracování suroviny dochází ke zvýšení agmatinu a putrescinu spolu s poklesem sperminu a spermidinu [14].

Některé aminy vznikají v hroznech nebo v moštu při výrobě vína (např. putrescin, kadaverin, fenyletylamin) nebo je mohou tvořit kvasinky během alkoholového kvašení (etylamin, fenyletylamin), ale pouze v menším množství (do  $3 \text{ mg.l}^{-1}$ ). Jablečno-mléčné kvašení je také hlavním mechanismem jejich tvorby (histamin, tyramin a putrescin). Zvýšení aminů je

ale rovněž doprovázeno významným poklesem jejich aminokyselinových prekurzorů. Zásířením vína a během jeho zrání již nedochází ke zvýšení koncentrace aminů. Oxid siřičitý zabraňuje jejich tvorbě. Zabránit tvorbě biogenních aminů lze pouze pečlivým sledováním celého průběhu výroby a to zejména v kritických bodech [15]. Také některé enologické praktiky používané ke zvýšení jakosti vína, jako je např. delší macerace hroznových slupek, silně zvyšuje koncentraci biogenních aminů, zatímco přidávání pektolytických enzymů k tomu nepřispívá [16]. Proto se biogenní aminy používají jako deskriptory enologických procesů nebo mohou také usnadnit rozlišení mladých vín od sebe [17].

### 1.3 Biologické účinky

Biogenní aminy jsou přírodní antinutriční látky. Jsou velice stabilní, odolávají teplu, přežívají v kyselých a zásaditých podmínkách. V buňkách plní různé specifické funkce jako např. kontrola a inhibice translace mRNA do bílkoviny a regulace translace. Polyaminy mohou stimulovat spojení jednotek ribozomů, stabilizovat strukturu tRNA a snižovat rychlost degradace RNA. Potom mohou také posilovat syntézu RNA a DNA a regulovat stabilitu a pevnost buněčných membrán [6]. Jsou nepostradatelné pro organismus, ale ve vysokých koncentracích mohou způsobit otravu. Škodlivé účinky lze očekávat pouze pokud aminy mají přístup do krevního oběhu. Vyšší množství se může projevit dvěma fyziologickými účinky na člověka – psychoaktivními a vazoaktivními. Tyto účinky mají histamin, tryptamin,  $\beta$ -fenyletylamin, tyramin, putrescin a kadaverin. Psychoaktivní aminy působí na centrální nervový systém, zatímco vazoaktivní aminy působí na vaskulární systém [10]. Nejmarkantnější příznaky konzumace vysokých dávek jsou zvracení, návaly horka, pocení, průjem, křeče, dýchací potíže, bušení srdce, hypotenze nebo hypertenze a migrény. Fenyletylamin a tyramin zvyšují krevní tlak, kdežto histamin ho snižuje [6].

Toxický účinek aminů spočívá v aktivitě enzymů, *monoaminoxidáz* (MAO) a *diaminoxidáz* (DAO), které odbourávají biogenní aminy. Aktivita těchto enzymů je různá a závisí na každém jedinci zvlášť. Především závisí na přítomnosti aktivátorů nebo inhibitorů v těle. Toxicita konkrétních aminů je různá, záleží na množství spotřebované potravin. Zvýšené množství histaminu (nad  $500 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) může vyvolat anafylaktický šok (extrémní alergickou reakci organismu) [2]. Četné ohnisko otrav histaminem pochází z konzumace sýra nebo ryb, kromě toho může být také ve víně a masných výrobcích. Jeho toxický účinek

závisí také na přítomnosti ostatních aminů, aminosložkové aktivitě a střevní fyziologii jedince. Střevo absorbuje až desetkrát více histaminu pokud jsou přítomny putrescin, kadaverin a spermidin [6].

Biogenní monoaminy (např. serotonin, fenyletylamin, tyramin) a diaminy (histamin, tryptamin) jsou tvořeny i degradovány během buněčného metabolismu a mají různé fyziologické funkce jako je regulace tělesné teploty a pH nebo ovlivňování mozkové činnosti. Aminy jsou zkoumány jako možné mutagenní prekurzory. Sekundární aminy (tj. agmatin, spermin a spermidin) mohou tvořit nitrozaminy, které jsou karcinogenní pro různé druhy zvířat a představují i zdravotní riziko pro člověka. Reakcí aminosloučenin s nitrozačnicí činidly (dusitany, dusičnany, oxidy dusíku) vznikají karcinogenní, mutagenní a teratogenní N-nitrososloučeniny. Vznikají v průběhu skladování a kulinárního zpracování (smažení, uzení, fermentace apod.) [6].

Tyramin působí nepřímo uvolněním noradrenalinu do sympatického nervového systému a způsobuje zvýšení krevního tlaku. Rozšiřuje zornice, způsobuje slzení a slinění, zvyšuje dýchání a hladinu cukru v krvi [10]. Kromě toho má tyramin významnou antioxidační aktivitu, která roste s jeho koncentrací. Jeho antioxidační účinek lze připsat jeho amino a hydroxy skupinám. Biogenní aminy jako putrescin, kadaverin, spermidin a mnohé další jsou radikálovými zhašeči. Polyaminy inhibují oxidace polynenasycených mastných kyselin. Antioxidační účinek souvisí s počtem aminových skupin v molekule polyaminu [6].

#### 1.4 Bakterie tvořící biogenní aminy

Množství a typ biogenních aminů vznikajících v potravinách závisí na povaze produktu a přítomných mikroorganizmech. Mikroorganismy mají různé schopnosti syntézy *dekarboxyláz*. Jednu či více aminokyselin jsou schopny dekarboxylovat různé druhy mikroorganismů z rodů jako je např. *Bacillus*, *Citrobacter*, *Clostridium*, *Klebsiella*, *Escherichia*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Shigella*, *Photobacterium* a mléčné bakterie *Lactobacillus*, *Pediococcus* a *Streptococcus*. Kmeny s vysokou pravděpodobností proteolytické aktivity enzymu mají vyšší potenciál tvorby biogenních aminů. V případě fermentovaných potravin a nápojů zavádění startovacích kultur může ovlivnit produkci biogenních aminů a to buď přímo anebo nepřímo prostřednictvím různých populací mikroorganismů [3].

Nejvyšší biologickou aktivitu ze všech aminů má histamin, proto je také na jeho produkci zaměřena největší pozornost. Četná distribuce histidin dekarboxylázové aktivity směřuje od rodů *Escherichia*, *Salmonella*, *Clostridium*, *Bacillus* a *Lactobacillus*. Avšak relativně malé množství bakterií tvoří toxikologicky významné množství histaminu [4].

V mikrobiologii rybích produktů jsou významnými producenty histaminu organizmy jako *Morganella morganii*, některé kmeny *Klebsiella pneumoniae* a *Hafnia alvei* [3, 6]. Stejně tak produkují histamin i *Proteus vulgaris*, *Escherichia*, *Clostridium*, *Salmonella* a *Shigella*. Ve fermentovaných rybách lze produkci přisoudit *Staphylococcus sp.*, *Vibrio*, *Pseudomonas* a *Bacillus sp.* Za syntézu kadaverinu a putrescinu jsou odpovědné *Morganella morganii*, *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter freundii* a *Serratia liquefaciens* [6].

Některé bakterie používající se v mlékárenském průmyslu jako startovací kultury, jimiž jsou *Lactococcus lactis* a *Lactobacillus helveticus*, jsou identifikovány jako producenti histaminu. Stejná činnost byla dokázána i u *Streptococcus faecium*, *Streptococcus mitis*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus acidophilus* a *Propionibacteriaceae* [10]. Při zrání sýrů je převládající mikroflóra spojována s tvorbou tyraminu (*Streptococcus faecalis*). Přirozená mikroflóra a přídavek kyseliny mléčné má významný vliv na tvorbu biogenních aminů. V anglickém sýru Čedar byla zjištěna tyrozin a histidin dekarboxylázová aktivita u *Escherichia coli*. Bakterie *Pseudomonas sp.* a *Enterococcus faecalis* jsou spojovány s produkcí tyraminu [3, 6].

Mléčné bakterie *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus carnis*, *Lactobacillus divergens* a *Lactobacillus hilgardii* tvoří aminy v mase a masných výrobcích. Produkci aminů se snadno přizpůsobuje *Escherichia coli* a *Klebsiella oxytoca* a příbuzná *Morganella morganii*. Za vysokou úroveň biogenních aminů je spíše zodpovědná kontaminující mikroflóra než samotné startovací kultury. Tyramin a histamin se např. vyskytují v salámech na konci zrání [3, 10]. U čistých kultur experimenty ukázaly, že během růstu na aerobně skladovaném vepřovém mnohé kmeny *Enterobacteriaceae* produkují značné množství kadaverinu, zatímco *Pseudomonas* produkují hlavně putrescin [10].

U některých vín dochází ke vzniku histaminu činností bakterií *Pediococcus cerevisiae*, které odolávají přítomnosti oxidu siřičitého. Při výrobě belgického piva různé druhy kvasinek tvoří a používají biogenní aminy (kadaverin, putrescin) ve svém metabolismu [3].

## 1.5 Stanovení

Studium výskytu biogenních aminů v potravinách a kontrola jejich limitů není možná bez podpory analytických metod. Již v minulosti byly publikovány metody pro izolaci a odhad aminů, avšak žádná metoda neumožňovala jednotné kvantitativní stanovení všech biogenních aminů v potravinách. Komplexní matrice vzorku, přítomnost možných rušivých složek a současný výskyt několika biogenních aminů ve stejném extraktu jsou charakteristickými problémy při analýze potravin [10].

Pro extrakci aminů z potravin se používají činidla jako je kyselina chloristá, trichloroctová, chlorovodíková a organická rozpouštědla (aceton, etanol, metanol, xylen, toluen) [10]. Pro separaci biogenních aminů byly vyvinuty různé analytické techniky zahrnující papírovou chromatografii (PC), tenkovrstvou chromatografii (TLC), plynovou chromatografii (GC), vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii (HPLC) a kapilární elektroforézu (CE) [18].

Pro stanovení jednotlivých aminů se používaly fluorimetrické metody. Pro určení histaminu v rybách byla vyvinuta a přijata metoda (AOAC, 1990), která spočívala v extrakci vzorku metanolem, oddělení histaminu od rušivých látek pomocí iontově výměnné chromatografie a reakci s *o*-ftalaldehydem (OPA) pod důslednou kontrolou a následným fluorimetrickým měřením. Následně pak byly vyvíjeny podobné metody, kdy metanol a anex AOAC metody byly nahrazeny 10 % trichloroctovou kyselinou a katexem. Dále mohla být iontová výměna z AOAC nahrazena ještě sekvenční extrakcí (podobný postup se používá pro stanovení tyraminu v potravinách) [10].

Vzhledem k tomu, že biogenní aminy se často vyskytují současně ve stejném výluhu, jsou žádoucí vysoce účinné a citlivé metody jako je ultravýkonná kapalinová chromatografie (UPLC), plynová rozdělovací chromatografie (GLC), vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC), tenkovrstvá chromatografie (TLC) a iontově výměnná kapalinová chromatografie (IEC) s využitím automatického analyzátoru aminokyselin (AAA) [3, 10]. Nejčastěji se používají citlivé chromatografické metody na reverzních fázích s fluorescenční nebo UV detekcí po danzylaci, benzoylaci nebo derivatizaci reakcí s 9-fluorometylchloroformátem, N-hydroxysuccinimidyl-6-chinolylylkarbamátem nebo *o*-ftalaldehydem (OPA) [18].

Předkolonová derivatizace je používána pro simultánní stanovení histaminu, tyraminu, kadaverinu, putrescinu, tryptaminu a fenyletylaminu pomocí HPLC v sýrech a rybách. Po extrakci aminů ze salámů je 9 danzylovaných aminů od sebe odděleno a stanoveno HPLC metodou. Během derivatizace se však někdy mohou objevit nežádoucí produkty. Proto se většinou používá postkolonová derivatizace, a to např. při stanovení biogenních aminů v sýrech, víně a kyselém zelí sloučením s ninhydrinem. Reakce probíhá zahřátím po separaci. Problémy mohou nastat i při samotné analýze, mobilní fáze nebo nosný plyn mají omezené použití. Mobilní fáze také může snižovat odezvu detektoru. Právě pro tyto účely je vhodná metoda tenkovrstvé chromatografie (TLC). Metoda je jednoduchá, účinná, použitelná pro velký počet vzorků v minimálním čase a levná co se týče používaných činidel a vybavení [10].

Jednou z nejjednodušších metod pro stanovení biogenních aminů v potravinách je stanovení pomocí automatického analyzátoru aminokyselin (AAA) využívající iontově výměnnou chromatografii (IEC) [3]. AAA analyzátor je vybaven iontově-výměnnou kolonou, kde dochází k postupné eluci vzorku pufrů o různém pH. Následuje postkolonová derivatizace s ninhydrinem a spektrofotometrická detekce [19].

Bylo také popsáno tekuté médium, kde byla po 24 h detekována histidin dekarboxylázová činnost u čisté bakteriální kultury. Další metoda spočívá v automatizovaném měření vodivosti v médiu obsahující histidin a inkubaci při 25 °C [3].

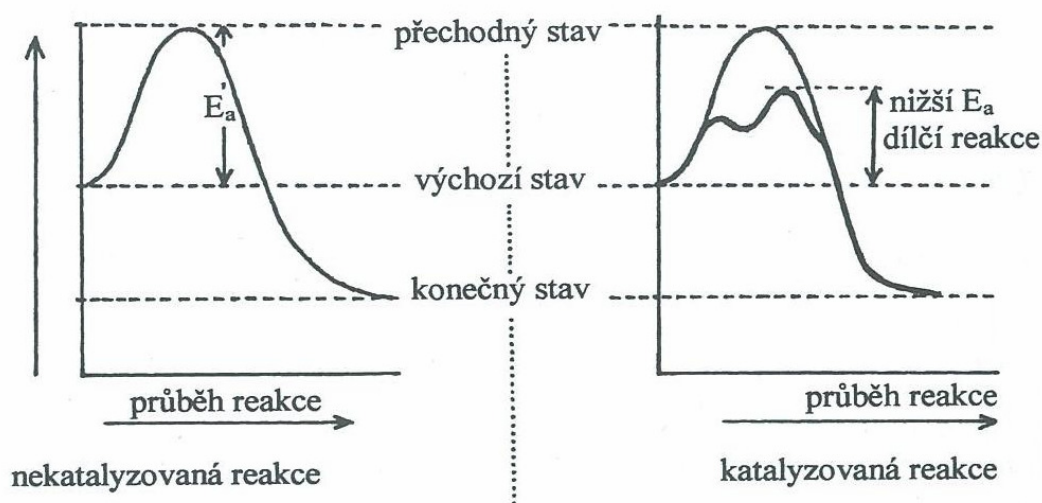
Velice spolehlivé a citlivé jsou chromatografické metody s elektrochemickou detekcí nebo detekcí za pomoci hmotnostní spektrometrie (LC/MS) [18].

Metody jsou harmonizované a normalizované různými analytiky. Jsou spíše obtížné, časově náročnější a vyžadují nákladné přístrojové vybavení. Co se týče analýzy, metody by měly být jednoduché, rychlé, robustní a dostatečně citlivé. Hlavní výzkum, znalosti mikroorganismů a podmínek vedoucích k tvorbě biogenních aminů v potravinách jsou užitečné pro zabránění potravinových otrav způsobených aminy [3]. Další vývoj není možný bez spolupráce výzkumných pracovníků ve vládě a v průmyslu. V tomto zájmu je třeba pokračovat a vytvořit organizovaný program, který bude vyžadovat mezinárodní spolupráci a bude zahrnovat databázi biogenních aminů pro lepší informovanost a dostupnost těchto údajů na celém světě [10].

## 2 ENZYMY

Téměř všechny chemické reakce v živých organizmech jsou umožňovány katalytickým působením biokatalyzátorů – enzymů. Enzymy pracují jako ostatní katalyzátory, liší se pouze v některých aspektech, jako je např. jejich vysoká účinnost, umožnění reakce i za mírných podmínek (nízká teplota, neutrální pH, apod.) a snadná regulovatelnost, což je pro život za měnících se podmínek okolí důležité [20].

Z fyzikální chemie již víme, že žádný katalyzátor nemění termodynamickou rovnováhu reakce. Jakýkoli katalyzátor pouze ovlivní rychlost, kterou se k dosažení termodynamické rovnováhy dospěje. Enzym ve velmi malých množstvích urychluje průběh chemické reakce tak, že snižuje velikost její aktivační energie [21]. Za přítomnosti enzymu reakce může proběhnout daleko rychleji, až do ustavení rovnováhy. Proč dochází ke snížení aktivační energie vysvětluje fakt, že živý organismus nemůže k překonání energetické bariéry využít vysokou teplotu, extrémně měnit tlak či pH. Jediným řešením pro téměř všechny reakce je enzym. Mezi enzymem a přeměňující se látkou (substrátem) dojde k vytvoření jednoho nebo několika přechodných stavů. Jedna reakce se tedy rozdělí na několik postupných menších s nižší hodnotou aktivační energie, což je pro organismus uskutečnitelné [20]. Následující graf (obr. 5) ukazuje, jak se hodnota aktivační energie celkové reakce v dílčích reakcích snižuje.



Obr. 5. Průběh katalyzované a nekatalyzované reakce [20]

V nekatalyzované reakci má jen málo molekul dostatek energie k překonání energetické bariéry (aktivační energie  $E_a$ ). Zatímco u enzymové reakce je větší počet molekul schopných překonat nižší energetickou bariéru dílčích reakcí [20].

## 2.1 Definice a struktura

Enzymový průmysl, jak jej známe dnes, je výsledkem rychlého rozvoje během posledních čtyř desetiletí a to především díky vývoji moderních technologií. Přírodní enzymy byly používány už od starověku na výrobu chleba, piva, vína a octa. Lidé tenkrát ani netušili, že se při tomto procesu kvašení mění škrob a cukry na etanol [22].

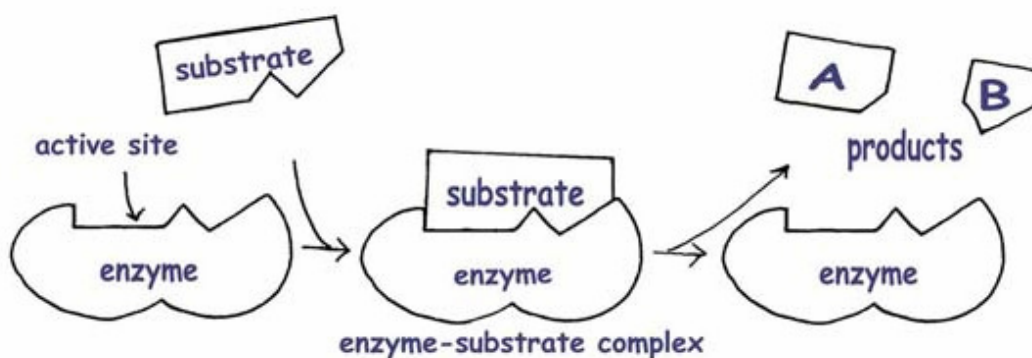
Roku 1878 vznikl název enzym – z řeckého *en* = uvnitř *zymo* = uvést v kvas, nebo také ferment (starší název) jako faktor způsobující kvašení. 1897 bylo zjištěno Eduardem Buchnerem, že ke kvasnému účinku není nutno zapotřebí živé kvasinky. Enzymy jsou bílkovinné látky produkované v žijících buňkách z aminokyselin. Organismus získává aminokyseliny z trávení bílkovin obsažených v potravě. Musí být ve specifickém pořadí seřazeny do dlouhých polypeptidových řetězců. Byla tedy dokázána velká molekula enzymu – bílkovina, která si v čistém stavu, po izolaci zachovává aktivitu [23]. Bílkovinná část enzymu se nazývá apoenzym. Dalším rozvojem vědy byla nalezena i neproteinová složka, tzv. koenzym – slabě vázaný kofaktor. Samotný apoenzym je enzymově neúčinný, ale může se slučovat s kofaktorem za vzniku komplexu. Celý enzym se pak nazývá holoenzym [24].

Téměř všechny enzymy jsou jednoduché či složené bílkoviny. Je známo velké množství enzymů, bílkovinných enzymů v lidské buňce se odhaduje na 50 000. V 80. letech 20. století bylo zjištěno, že vlastnosti katalyzátoru mají i některé druhy RNA. Jsou jimi ribozymy. Přírodovědci se domnívají, že tyto molekuly RNA dříve plnily katalytickou funkci místo tehdy ještě neexistujících bílkovin. Ribozymy jsou RNA katalyzující štěpení a vazbu RNA-substrátů bez přítomnosti proteinů. Jinými slovy, ribozymy katalyticky napadají fosfodiesterové vazby v RNA a mají klíčovou úlohu při spojování intronů při konverzi hnRNA na mRNA [25, 26].

Enzym je globulární bílkovina různé velikosti, o relativní molekulové hmotnosti 25 000 až několik milionů. Velikostí většinou převyšuje molekuly substrátu. Aby mohl enzym fungovat, musí vytvořit se substrátem enzym-substrátový komplex (obr. 6). Na enzymu je



malé místo, na které se substrát napojuje – aktivní místo (centrum). Na povrchu enzymu je obvykle jen jedno aktivní místo. Tvarově aktivní místo připomíná prohlubeň neboli zářez, do které pak zapadne molekula substrátu a naváže se. Aktivní místo je trojrozměrný útvar tvořený zbytky aminokyselin, které v primární struktuře mohou být daleko od sebe. Vazba mezi enzymem a substrátem byla nazvána teorií klíče (substrát) a zámku (enzymy). Substrát může zapadnout a působit jen v enzymu, jehož výřez tvarově přesně odpovídá. Specifita vůči substrátu není však téměř nikdy absolutní. Později se ukázalo, že substrát je schopný do jisté míry měnit konformaci enzymu, který se mu dokáže přizpůsobit. Stejně tak různé inhibující látky se mnohdy usadí do aktivního místa, i když jejich molekula je větší než prohlubeň a některé se i tvarově přizpůsobují enzymu [20, 23].



Obr. 6. Vznik enzym-substrátového komplexu [27].

Na vazbě enzym-substrát se podílejí nevazebné interakce, jako např. vodíkové vazby, hydrofobní interakce, elektrostatické síly a van der Waalsovy síly. Kovalentní vazba se vyskytuje spíše výjimečně. V aktivním místě enzymu se nacházejí vazebné skupiny zajišťující spojení se substrátem a katalytické skupiny, které obstarávají vlastní katalytické reakce. Není však jednoduché odhadnout, která skupina je vazebná a která katalytická. Na obou funkcích se v aktivním místě enzymu podílejí hlavně reaktivní zbytky a skupiny (cystein, hydroxykyseliny, kyselé a bazické aminokyseliny). Zářez je obvykle hydrofobní, přispívá k vazbě substrátu. Polární skupiny přítomné v aktivním místě, mající zásadní význam při mechanismu katalýzy, zůstávají nedotčeny. Vazba substrátu do aktivního centra enzymu způsobí změnu mikroklimatu. Spojením se vytlačí voda, prostředí se stane nepolární a vymizí dielektrikum, které znemožňovalo uplatnění elektrovalentních vazeb. Mechaniz-

my můžeme rozdělit na: acidobazickou katalýzu, kovalentní katalýzu, katalýzu kovovými ionty (vznik komplexu enzym-kov-substrát), elektrostatickou katalýzu, katalýzu na základě přiblížení a prostorové orientace a vazbu přechodného stavu na enzym s vyšší afinitou, než má substrát nebo produkt. Pro mechanismy je běžné, že se vždy uplatní současně několik katalytických mechanismů [20].

Na vazbě substrátu a katalýze se také podílí koenzym. Je to kofaktor – nízkomolekulární organická látka nebílkovinné povahy tvořící součást složených enzymů (obvykle nukleotid účastníci se reakce jako akceptor nebo donor chemických skupin či elektronů). Vitaminy jsou často prekurzory kofaktorů nebo i samotnými kofaktory [28].

Aromatická jádra fenylalaninu a tyrozinu a bazické aminokyseliny obstarávají vazbu substrátu v enzymech. Na katalýze se podílejí karboxyly dikarboxylových aminokyselin, hydroxylové skupiny serinu, karbonylové kyslíky, histidin a arginin [20].

Na povrchu enzymu se nachází allosterická místa, která jsou typická pro allosterické enzymy – regulační enzymy s oligomerní strukturou snadno měnící konformaci pod vlivem efektorů [29]. Na povrchu enzymu se stejně tak nalézají determinantní skupiny určující imunitní charakteristiku molekuly. Enzymy dále mohou vázat cizorodé látky jako např. jedy a farmaka. [20].

## 2.2 Složení a molekulová hmotnost

Enzym se může skládat z jednoho polypeptidového řetězce, ale i z více řetězců. Pokud obsahuje pouze jeden, neznamená to, že má specifickou aktivitu. Enzym se dále může skládat z jednoho řetězce složeným z několika domén se stejnou enzymovou specifičností nebo z jednoho řetězce složeným z domén s různou specifičností. Multienzymový komplex je pak enzymově aktivní bílkovina s kvarterní strukturou s molekulou složenou z několika podjednotek, které mají různou specifičnost [20].

Molekulová hmotnost se pohybuje od hodnot nepříliš vzdálených polypeptidům až k ohromným číslům. Např. enzym *ribonukleáza* je poměrně malý a jeho  $M_r$  je přibližně 13700. Naproti tomu multienzymový komplex *pyruvátdehydrogenáza* izolovaný z prasečího myokardu má molekulovou hmotnost asi  $1 \times 10^7$  [30]. Mnohé enzymy, obzvláště hydrolytické enzymy, se buňkami trávicích žláz produkují nejdříve jako neúčinné proen-

zymy a aktivují se tím, že se část jejich molekuly odštěpí (obvykle *proteázou*), čímž se de-maskuje jejich aktivní místo. Odštěpená část trávicích enzymů bývá rozměrná [20].

### 2.3 Formy enzymů

Jeden enzym se stejným názvem se mnohdy vyskytuje v několika formách, které mají stejnou specifickou, ale liší se od sebe velikostí molekuly a malými rozdíly ve struktuře. Může jít např. o různý počet elektrických nábojů (což umožňuje jejich separaci elektroforézou). Liší se také odolností vůči vyšším teplotám nebo imunitními vlastnostmi. Jde o mnohočetné formy, které mohou vznikat různými mechanismy [20].

Rozdíly mohou být determinovány geneticky, pak se lišící formy nazývají izoenzymy. Izoenzymy katalyzují stejnou reakci, ale mají odlišnou primární strukturu [31]. Podjednotky vzniklé podle příslušného genetického kódu se spolu mohou různým způsobem hybridizovat, tím vznikají dimery, tetramery atd. Rozdílů mezi izoenzymy s výhodou využívají klinické laboratoře k diagnostickým účelům. Stanovením katalytické aktivity příslušného izoenzymu např. v krvi (resp. v plazmě) lze usuzovat na poškození nebo poruchu konkrétní části těla. Příkladem izoenzymu je *laktátdehydrogenáza* (LD). V jádře buňky obratlovců jsou dva geny pro odlišné částice, a ty se po skončení proteosyntetického pochodu shlukují pěti možnými způsoby do tetrametru. Existuje tedy pět izoenzymů *laktátdehydrogenázy* LD-1 až LD-5 [20, 32].

Pseudoizoenzymy jsou mnohočetné formy katalyzující stejnou reakci, ale rozdíly v jejich vlastnostech nejsou způsobeny geneticky podmíněnými odlišnostmi v primární struktuře. Jejich existence je důsledkem enzymových nebo neenzymových modifikací enzymu s jednou primární strukturou *in vivo*. Příkladem jsou různé *chymotrypsiny*, *trypsiny*, *pepsiny* a atd., odvozené od jednoho inaktivního prekurzoru [33].

### 2.4 Názvosloví a klasifikace

Ze začátku dostávaly enzymy jména podle nápadů samotných objevitelů. Pro některé enzymy trávicího traktu byly použity názvy končící na koncovku -in (*pepsin*, *trypsin*, *ptyalin*, atd.) a dodnes se ještě používají. Později se ujal zvyk k názvům enzymů přidávat koncovku

-áza, kmen vyjadřuje buď účastníci se substrát (např. *ureáza*) nebo typ reakce (*oxidáza*). Docházelo však ke zmatkům. Čím více enzymů vědci objevili, tím těžší bylo zachovat přehled. Pořádek vnesla až Mezinárodní biochemická unie EC/IUBMB (Enzyme Commission International Union of Biochemistry and Molecular Biology) zavedením pravidel pro klasifikaci a názvosloví enzymů.

Názvosloví je:

- a) **Systematické** – popisuje katalyzovanou reakci. Skládá se z označení substrátu/ů, co se přenáší, typ reakce a na konec se přidá koncovka -áza.  
Např. *1,4-alfa-D-glukan glukanohydroláza*.
- b) **Triviální** – je kratší a obsahuje název substrátu a typu reakce.  
Např. *alkoholdehydrogenáza*.

Unie zavedla také pro každý enzym číselný kód skládající se ze čtyř čísel. Čísla označují třídu – podtřídu – podpodtřídu (nebo skupinu) – pořadové číslo v oficiálním seznamu. Tak např. EC 4.1.1.1. je *pyruvátdekarboxyláza* [20, 23].

Enzymy se rozčleňují do šesti tříd, které se pak podle dalších kritérií dělí na podtřídy a na podpodtřídy:

1. **Oxidoreduktázy (EC 1.)** katalyzují oxidačně-redukční procesy. Přenášejí vodík nebo kyslík, nebo jen elektrony z jedné látky na druhou. Příklad katalyzované reakce:  

$$\text{C}_2\text{H}_5\text{OH} + \text{NAD}^+ \rightarrow \text{CH}_3\text{CHO} + \text{NADH} + \text{H}^+ \quad \textit{alkoholdehydrogenáza}$$
2. **Transferázy (EC 2.)** přenášejí celé skupiny atomů (metyl, acyl, amino, glykosyl, fosfát). Dělí se podle skupin, které přenášejí.  

$$\text{ATP} + \text{D-Glc} \rightarrow \text{ADP} + \text{D-Glc-6-fosfát} \quad \textit{fosfotransferáza}$$
3. **Hydrolázy (EC 3.)** katalyzují hydrolýzu určité vazby, štěpí substráty za vstupu vody. Podle substrátu rozeznáváme *peptidázy*, *lipázy*, *esterázy*, *glykosidázy* a jiné.  

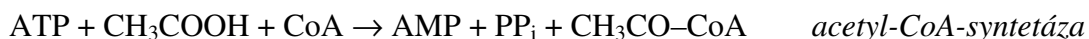
$$\text{CO}(\text{NH}_2)_2 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CO}_2 + 2 \text{NH}_3 \quad \textit{ureáza}$$
4. **Lyázy (EC 4.)** katalyzují štěpení vazby mezi uhlíky C–C, mezi uhlíkem a dusíkem C–N (ale bez vstupu vody), nebo odstranění určité skupiny, popř. jejich vnášení za vzniku vazeb (C–C, C–N, C–O).  

$$(\text{COOH})_2 \rightarrow \text{HCOOH} + \text{CO}_2 \quad \textit{dekarboxyláza}$$

**5. Izomerázy (EC 5.)** katalyzují vzájemné přeměny izomerů vnitřním přeskupením molekuly substrátu. Podle typu izomerace se dělí na podtřídy *cis-trans izomerázy*, *epimerázy*, *mutázy*, atd.



**6. Ligázy (EC 6.) (syntetázy)** spojují dvě sloučeniny za tvorby nových vazeb mezi atomy C–C, C–O, C–N, C–S, a to za spotřeby energie získané štěpením ATP.



Enzymy prvních tří tříd se vyskytují nejčastěji v živočišných tělech. Počet enzymů z ostatních tříd je daleko nižší [20, 34, 35]. Běžně užívané názvy podtříd jsou uvedeny v tabulce 1.

Enzymy se dají také rozdělit podle místa působení na:

- Intracelulární – působí uvnitř buněk, ve kterých vznikly. Vyskytují se v cytoplazmě nebo v buněčných organelách. Fungují v rozpuštěné formě nebo vázané v různých biologických strukturách
- Extracelulární – jsou buňkami vylučovány. Nachází se v tkáňových kapalinách (např. u živočichů v krvi, mozkomíšním moku)

Nebo podle formy výskytu:

- Izoenzymy, neaktivní proenzymy, rozpuštěné/volné, vázané/imobilizované na biologické struktury, multienzymové komplexy [23, 34].

Tab. 1. Běžně užívané (doporučené) názvy enzymů [36].

<b><i>Oxidoreduktázy</i></b>	<b><i>Transferázy</i></b>	<b><i>Hydrolázy</i></b>
<i>dehydrogenáza</i>	<i>skupinatransferáza (př. aminotransferáza)</i>	<i>esteráza</i>
<i>reduktáza</i>	<i>kináza</i>	<i>fosfatáza</i>
<i>oxidáza</i>	<i>fosforyláza</i>	<i>fosfodiesteráza</i>
<i>peroxidáza</i>	<i>transketoláza</i>	<i>nukleáza</i>
<i>oxygenáza</i>	<i>transaldoláza</i>	<i>peptidáza</i>
<i>hydroxyláza</i>		<i>glykosidáza</i>
<i>desaturáza</i>		<i>lipáza</i>
<b><i>Lyázy</i></b>	<b><i>Izomerázy</i></b>	<b><i>Ligázy</i></b>
<i>dekarboxyláza</i>	<i>epimeráza</i>	<i>karboxyláza</i>
<i>hydratáza</i>	<i>mutáza</i>	<i>syntetáza</i>
<i>dehydratáza</i>		
<i>syntáza</i>		

## 2.5 Aktivita enzymů, specifita a účinnost katalýzy

Místo stanovení látkového množství enzymu v molech se měří katalytická aktivita enzymu. Je to rychlost reakce za definovaných podmínek. Aktivita enzymů je závislá na koncentraci substrátu, teplotě, pH a přítomnosti nezbytných kofaktorů. Základní jednotkou je 1 katal [kat] a udává množství enzymu, které přemění 1 mol substrátu za 1 s. Tato jednotka je příliš vysoká, proto se spíše užívají její zlomky –  $\mu\text{kat}$ ,  $\text{nkat}$  až  $\text{pkat}$ . Koncentrace katalytické aktivity vyjadřuje koncentraci enzymu v biologickém materiálu ( $\mu\text{kat}\cdot\text{l}^{-1}$ ) [20, 36].

Podmínky vytváření komplexu enzym-substrát a následně enzym a produkt určují kromě rychlosti reakce také další charakteristiky jako je vysoká katalytická účinnost a vysoká specifita. Účinnost se uvádí jako číslo přeměny a udává počet molekul substrátu (substrátů), které jedna molekula enzymu přemění za sekundu. Hodnoty čísla přeměny bývají většinou obrovské.

Specifita se dělí na dva typy:

- Vazebná (substrátová) specifita stanovuje, jaký substrát bude atakován. Enzym může být absolutně specifický, jestliže působí pouze na jediný substrát. Např. *ureáza* přeměňuje výhradně močovinu (ureu). Častější je relativní specifita. Při ní je

enzym schopen vazby a přeměny několika substrátů, běžně členů téže homologické řady nebo jiných strukturou podobných látek (např. glukóza – fruktóza); afinita ke každému substrátu je ovšem jiná.

- b) Kinetická specifita (specifita účinku) je druhým typem. Např. aminokyselina může podlehnout deaminaci na oxokyselinu a  $\text{NH}_3$ , dekarboxylaci na primární amin, nebo se může přeměnit na jinou aminokyselinu. Co enzym se substrátem provede, závisí do značné míry na přítomném koenzymu. Protože ale různé reakce jednoho substrátu jsou katalyzovány někdy ve spolupráci se stejným koenzymem, je zřejmé, že i na specifitě účinku se musí podílet proteinový apoenzym. Také mezi enzymy působícími stejným typem reakce na stejný substrát může být různá působnost [20, 37].

## 2.6 Kinetika enzymových reakcí

Rychlost enzymové reakce je dána buď úbytkem substrátu za časovou jednotku, nebo přírůstkem produktu. Vždy se zvolí sledování té složky, která se určuje snadněji. Měření musí probíhat za standardizovaných podmínek.

**Faktory ovlivňující enzymovou reakci** jsou následující:

- Koncentrace enzymu – při konstantní koncentraci substrátu je závislost reakční rychlosti na koncentraci enzymu lineární.
- Koncentrace substrátu – musí být taková, aby během měření nebyla ovlivněna reakční rychlost, reakce má probíhat maximální rychlostí ( $V_{\text{max}}$ ).
- Teplota – rychlost enzymové reakce roste s teplotou. Činnost enzymů je od teplot okolo nuly až do teplot vyšších  $+100\text{ }^\circ\text{C}$ . Ale kvůli bílkovinnému složení a následné možné denaturaci je teplotní stabilita většiny enzymů od  $+20\text{ }^\circ\text{C}$  do  $+40\text{ }^\circ\text{C}$ .
- pH a pufr – každý enzym má své optimální pH, které se však může lišit od pH, při němž pracují enzymy v lidském organismu. Pufr schopně udržuje stabilní pH a také jeho složení a přítomnosti nečistot ovlivňuje vlastní enzymovou reakci.
- Inhibitory a aktivátory – inhibitory zpomalují rychlost enzymové reakce a aktivátory ji naopak zrychlují [34].

### 2.6.1 Jednosubstrátové reakce

Jednosubstrátová reakce má jednoduchou kinetiku. Jeden substrát vstupuje do reakcí katalyzovaných enzymy z třídy *izomeráz*, *lyáz* a *hydroláz*.



kde  $k_1$ ,  $k_2$ ,  $k_3$  a  $k_4$  jsou reakční konstanty. Ve stavu dynamické rovnováhy reakční rovnice vypadá takto:

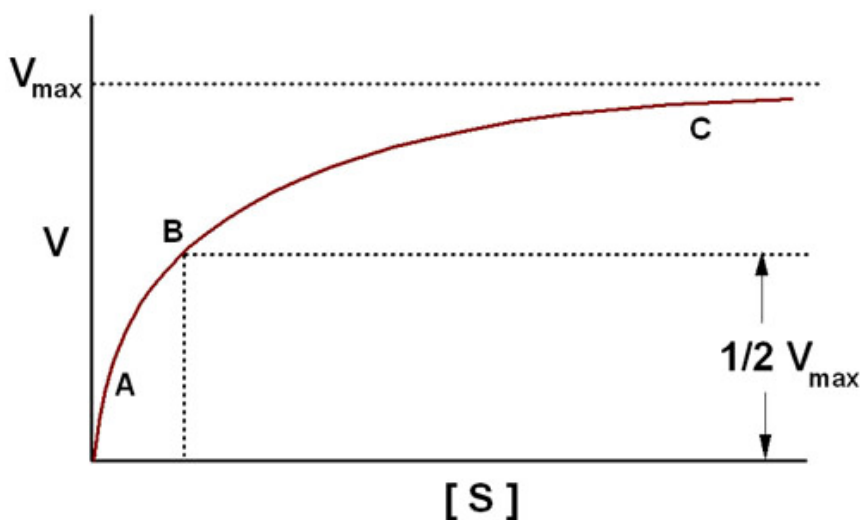
$$k_1[E][S] + k_4[E][P] = k_2[ES] + k_3[ES] \quad (2)$$

Analýza se omezuje na počáteční reakční rychlost, kdy  $[P]$  je zanedbatelné a  $[S]$  je prakticky konstantní, člen obsahující  $[P]$  lze tedy vypustit a členy s  $[ES]$  spojit. Dostaneme:

$$k_1[E][S] = (k_2 + k_3) [ES] \quad \text{nebo} \quad \frac{[E][S]}{[ES]} = \frac{k_2 + k_3}{k_1} = K_m \quad (3)$$

Kde  $K_m$  je Michaelisova konstanta [20].

Když vyneseme koncentraci substrátu v molech na litr  $[S]$  proti rychlosti  $[v]$ , dostaneme následující závislost (obr. 7).



Obr. 7. Závislost rychlosti jednosubstrátové reakce na koncentraci substrátu [38].



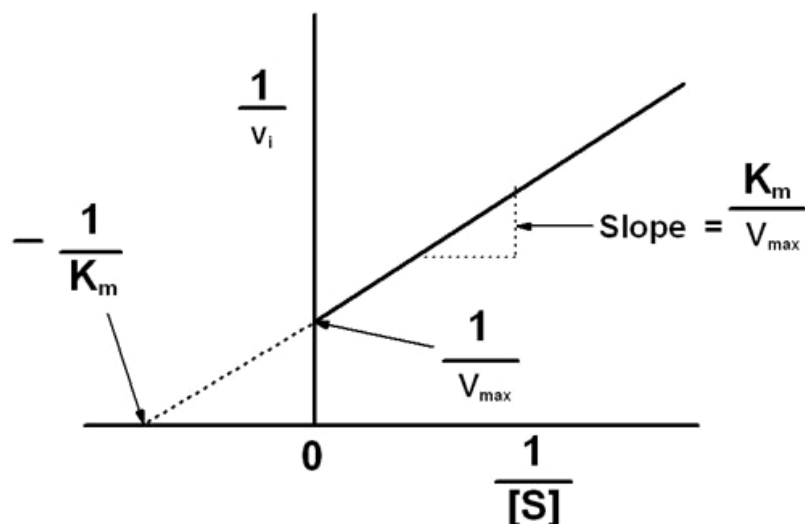
Předpokladem sestrojení křivky je konstantní koncentrace enzymu [E] a registrace počátečních rychlostí reakce. Křivka, spojující jednotlivé naměřené body má tvar hyperboly a asymptoticky se blíží určité maximální hodnotě reakční rychlosti ( $V_{\max}$ ). Jde o maximální iniciální reakční rychlost, kterou lze získat, aniž se zvýší množství enzymu. Při nízkých koncentracích substrátu je závislost lineární, odpovídající reakci prvního řádu. Při vyšších koncentracích substrátu rychlost roste už méně, až dosáhne maximální rychlosti  $V_{\max}$ , tady se uplatňuje závislost nultého řádu, tedy nezávislost na [S]. Při rozdílných koncentracích substrátu se mění snadnost tvorby enzym-substrátového komplexu, což je předpoklad rozpadu na produkt a původní enzym. Matematickým vyjádřením hyperboly na obr. 7 je rovnice podle L. Michaelise a M. L. Mentenové:

$$v = \frac{V_{\max} [S]}{K_m + [S]} \quad (4)$$

Michaelisova konstanta  $K_m$  je taková koncentrace substrátu, při níž je počáteční rychlost enzymové reakce rovna polovině  $V_{\max}$ , je dosaženo polovičního nasycení enzymu. Hodnoty  $K_m$  a [S] jsou vyjádřeny ve stejných jednotkách,  $\text{mol.l}^{-1}$ . Rovnici lze převést do názornějšího tvaru:

$$K_m = [S] \cdot \left( \frac{V_{\max}}{v} - 1 \right) \quad (5)$$

Čím je hodnota  $K_m$  nižší, tím je afinita enzymu k danému substrátu větší. Stačí tedy malá koncentrace substrátu, aby se enzym z poloviny nasytil.  $K_m$  se pohybuje od  $10^{-1}$  do  $10^{-6}$   $\text{mol.l}^{-1}$ . Michaelisova konstanta se stanovuje graficky – výška maximální rychlosti ( $\frac{1}{2} V_{\max}$ ) se rozdělí na polovinu a koncentrace substrátu odpovídající této hodnotě je  $K_m$ . Avšak k tomuto určení je potřeba velké množství naměřených dat a stanovení nemusí být přesto přesné, takže se toto stanovení v praxi nepoužívá. Více se prokázalo stanovení pomocí převrácených hodnot ( $1/v$  a  $1/[S]$ ). Jde o reciproké vyjádření podle Lineweavera a Burka. Na ose x je  $1/[S]$ , na ose y  $1/v$ . Výsledkem vnesení je přímka, která protíná osu y v bodě, který odpovídá hodnotě  $1/V_{\max}$  a osu x v bodě  $-1/K_m$  (obr. 8). Pro toto stanovení není třeba velkého počtu naměřených dat. V enzymologii se využívají ještě i jiná vynesení, ty ale mají složitější matematický podklad [20, 30].



Obr. 8. Reciproké vyjádření podle Lineweavera a Burka [38].

### 2.6.2 Dvousubstrátové reakce

Složitější kinetika se zabývá reakcemi, na kterých se podílejí zároveň nebo po sobě dva substráty a vznikají obvykle dva produkty. Na těchto reakcích se nejčastěji účastní *transferázy*, *oxidoreduktázy* a *kinázy*. Tady se používá dvojitě reciproké vynesení. Produkt může být také jen jeden, jako při účinku *lyáz*, když fungují jako syntetizující enzymy.

Existují i reakce třísubstrátové, popř. i více substrátové. Postup, kterého se účastní tři substráty, katalyzují hlavně *ligázy* [20, 33].

## 2.7 Podmínky pro enzymovou katalýzu

Enzymy jsou regulovatelné, snadno se adaptují na měnící se podmínky uvnitř buňky. Významnými působícími fyzikálními faktory jsou teplota, pH, redoxpotenciál prostředí, iontová síla okolního prostředí a ionizující záření [20].

Rychlost enzymové reakce vzrůstá s rostoucí teplotou. Reakce se urychluje na dvojnásobek až trojnásobek při zvýšení teploty o 10 °C. Současně také dochází k inaktivaci enzymu v důsledku denaturace bílkovinné části a případné odštěpování kofaktoru. Jde o přerušení vodíkových a hydrofobních interakcí. Denaturace způsobuje zároveň pokles či ztrátu enzymové aktivity. Výsledkem protichůdných efektů (teplota versus denaturace) je vznik

závislosti s maximem, kterému se říká teplotní optimum. Kulminace u enzymů lidského těla je mezi 40 až 50 °C. Za vyšších teplot aktivita klesá, až při 60 °C dosáhne nuly. Poloha maxima není spolehlivou charakteristikou enzymu, je dána jeho termostabilitou, délkou působení vyšší teploty, iontovou silou a hodnotou pH. Na rozdíl od enzymů lidského těla v přírodě existují i odolnější enzymy. Některé bakterie dokážou vegetovat i v horkých zřídlech při 80 – 100 °C, což jim umožňují právě termostabilní enzymy.

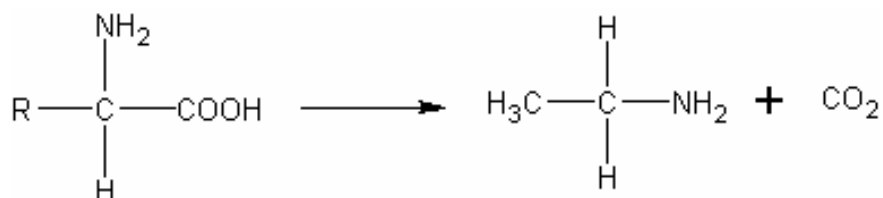
Enzymy jsou polyamfolyty, obsahují jak pozitivně tak negativně nabitě monomery na hlavním řetězci, většina jejich vlastností je závislá na pH. Závislost katalytické aktivity na koncentraci vodíkových iontů podmiňují protonované skupiny, které jsou součástí aktivních center enzymů a molekul mnohých substrátů. Reakce mezi enzymem a substrátem závisí na stupni jejich protonace. Většina enzymů proto působí katalyticky jen v určité oblasti pH, mimo ní účinnost klesá. Závislost rychlosti enzymové reakce na pH má tvar zvonovité křivky. Její maximum je pak tzv. pH-optimum, kde je aktivita enzymu nejvyšší. Vliv na rychlost enzymové reakce může mít také účinkem pH změněná disociace substrátu, pokud obsahuje disociovatelné skupiny. Při extrémním vybočení pH okolí mění enzym svou konfiguraci a nevratně se denaturuje. Většina enzymů má optimum účinnosti při pH 5 – 7. Výjimkou je ale např. enzym trávicích šťáv *pepsin* s optimem pH 1,5 – 2 odpovídající pH žaludeční šťávy v době trávení potravy. Naopak *argináza* a *sukcinátdehydrogenáza* jsou nejaktivnější v mírně alkalickém až zcela alkalickém prostředí.

Aktivita enzymů může dále záviset na redoxním potenciálu prostředí (je dán rovnováhou mezi skupinami –S–S– a –SH), dále na iontové síle a relativní permitivitě, které ovlivňují sílu nekovalentních interakcí uplatňujících se při reakci enzymu se substrátem, a taktéž na ionizujícím záření. Záření  $\gamma$  však škodí až při vysokých dávkách [20, 33].

## 2.8 Dekarboxylázy

Dekarboxylace je chemická reakce, při které se z molekuly aminokyseliny (resp. její karboxylové skupiny) odštěpuje oxid uhličitý a dochází ke vzniku aminu [39]. Tato reakce je katalyzována enzymy ze třídy *lyáz*, které se nazývají *dekarboxylázy* [40]. Proces je ireverzibilní a probíhá často za zvýšených teplot. Je také důležitým biochemickým pochodem v živých organismech při odbourávání keto- a aminokyselin [20].

Velice známé jsou aminokyselinové *dekarboxylázy*, jejichž činností vznikají biogenní aminy. Vznikají z aminokyselinových prekurzorů jako jsou histidin, tyrozin, tryptofan, 5-hydroxytryptofan, fenylalanin, lyzin, cystein, arginin, ornitin a mnohé další [41]. Dekarboxylační reakce je schematicky znázorněna na obrázku 9.



Obr. 9. Dekarboxylace aminokyselin [39].

Biogenní aminy vznikají v buňkách dekarboxylací volných aminokyselin za vyšších teplot a v přítomnosti dekarboxylázy-pozitivních mikroorganismů. Může jít jak o čisté bakteriální kultury, tak i o kontaminující mikroflóru, která tvoří specifické dekarboxylázové enzymy důležité pro katalýzu dekarboxylační reakce. *Dekarboxylázy* jsou většinou specificky orientované na určitou aminokyselinu, především na její L-formu. Volné aminokyseliny se vyskytují v potravinách jako takové a také se uvolňují z bílkovin proteolytickou činností nebo při tepelném rozkladu. Dekarboxylázovou aktivitu ovlivňuje teplota, pH, přístup kyslíku, přítomnost vitaminů a kofaktorů, přítomnost volných aminokyselin a fermentovatelných cukrů [41].

Produkty dekarboxylace (biogenní aminy) a látky, které z primárních aminů dále vznikají, se uplatňují jako hormony, neuromediátory, látky působící na tonus krevních cév a jako stavební kameny pro syntézu složitějších látek (fosfolipidů, koenzymu A, pantotenátu) [20].

*Dekarboxylázy* jsou také známé pro jejich různé role v metabolických drahách. *Pyruvátdekarboxyláza* (EC 4.1.1.1) je enzym významný pro etanolové kvašení. Je to enzym, který za anaerobních podmínek provádí dekarboxylaci pyruvátu na konečné produkty. V kvasu tato *dekarboxyláza* převádí spolu s *alkoholdehydrogenázou* pyruvát přes meziprodukt acetaldehyd na etanol a CO<sub>2</sub>. Nejdůležitějším mikrobiálním zdrojem *pyruvátdekarboxylázy* je *Saccharomyces cerevisiae*. *Benzoylformátdekarboxyláza* (EC 4.1.1.7) se podílí na katabolismu aromatických sloučenin. Tento enzym tvoří rody *Pseudomonas* a *Acinetobacter*.

Hlavní reakce je dekarboxylace benzoylformátu na benzaldehyd. Stejně metabolické dráhy se také účastní *fenylpyruvátdekarboxyláza* (EC 4.1.1.43), která byla nalezena u podobných rodů (*Achromobacter*, *Acinetobacter* a *Thauera*) [42].

Bylo popsáno a izolováno i mnoho dalších aminokyselinových *dekarboxyláz*. Ačkoli mají tyto enzymy úzkou substrátovou specifitu, byla prokázána jejich široká prospěšnost. Nadále se budou rozvíjet další průmyslové procesy a s nimi i další užitečné *dekarboxylázy* [43].

## 2.9 Faktory ovlivňující činnost *dekarboxyláz*

Dekarboxylázová aktivita mikroorganismů je velice rozmanitá. Především záleží na složení média a růstové fázi mikroorganismů. Tvorbu aminů rozhodně ovlivňuje teplota. Některé bakterie citlivější na teplotu mají menší produkci biogenních aminů při nižších teplotách (okolo 10 °C), než při normální pokojové teplotě (20 – 25 °C) [4]. Např. produkce histaminu v potravinách se zpomaluje při 10 °C a zastavuje již při 5 °C v důsledku zničení bakterií produkujících histamin. S rostoucí skladovací teplotou koncentrace aminů vzrůstá. Pozitivní vliv lze sledovat i u vaření, s výjimkou sperminu, jehož koncentrace při zahřívání klesá [6].

Přísun kyslíku má také významný vliv na biosyntézu aminů. Anaerobní podmínky v některých případech omezují tvorbu biogenních aminů a jindy ji zase podporují. Závisí to na typu bakterie nebo i na vznikajícím aminu. Fakultativně anaerobní mikroorganismy produkují méně biogenních aminů v anaerobních podmínkách. Mezi další působící faktory patří pH. První studie aminokyselinových *dekarboxyláz* prokázaly, že optimální pH pro tvorbu aminů je v rozmezí 2,5 – 6,5; tedy kyselé prostředí. Přítomnost fermentovatelných sacharidů jako je glukóza zvyšuje růst i dekarboxylázovou aktivitu mnoha bakterií. Optimální koncentrace cukru je 0,5 – 2,0 %, úroveň vyšší jak 3 % už enzymovou tvorbu inhibuje. Redoxní potenciál také ovlivňuje tvorbu aminů. Podmínky vedoucí ke snížení oxidačně-redukčního potenciálu stimulují tvorbu histaminu [4, 6].

Produkce biogenních aminů (zejména histaminu) může být inhibována přidávkem NaCl a to bez ohledu na koncentraci solného roztoku. Během skladování při 25 °C je inhibiční účinek úměrný nárůstu koncentrace v solném nálevu. Např. syntézu histaminu, tyraminu a tryptaminu pomocí *Streptococcus cremoris* lze potlačit přidáním již 0,5 % NaCl

k základnímu médiu. Ale při vyšších teplotách (30 °C) a koncentraci 2 % NaCl naopak tvorba histaminu prudce roste [3].

Přítomnost již vytvořeného biogenního aminu v médiu také zpomaluje dekarboxylaci aminokyseliny. Bylo zjištěno potlačení dekarboxylace histidinu při akumulaci histaminu v médiu [3].

Biogenní aminy nemusí být jen škodlivé pro citlivé jedince, některé mohou mít synergický efekt. Proto je důležité, aby výrobci optimalizovali a přísně dodržovali podmínky správné hygienické praxe, technologii výroby a skladovací podmínky. Aby při výrobě fermentovaných potravin využívali krátkého kvašení s pečlivě vybranou startovací kulturou pro zajištění nízké úrovně biogenních aminů v potravinách [3, 4].

### 3 AKTIVACE A INHIBICE ENZYMŮ

#### 3.1 Aktivace enzymů

Účinnost enzymů ovlivňuje velké množství látek. Tyto látky se nazývají efektory nebo modifikátory. Látky zvyšující aktivitu enzymu jsou pozitivní efektory neboli aktivátory [44]. Aktivátory se dělí na přirozené (endogenní) a nepřirozené (exogenní). Ty přirozené jsou běžné složky buněk (metabolity, koenzymy) a jsou významné pro regulaci metabolismu buňky. Nepřirozené efekторы jsou modelové látky, léčiva a jedy. Spousta enzymů potřebuje ke své plné aktivitě přítomnost aktivátorů, jako jsou např. ionty kovů, organické látky nebo vzácně některé aniony (např. chloridové). Aktivátory se vážou na enzym vratně, nejsou tedy součástí enzymové bílkoviny [33]. Za aktivaci lze považovat přechod proenzymu na enzym. Do skupiny aktivátorů patří také sloučeniny chránící enzym před inaktivací, což je např. redukovaný glutation (GSH), který ochraňuje enzymy buňky před oxidací jejich SH-skupin [20].

#### 3.2 Inhibice enzymů

Látky snižující účinek enzymu se nazývají negativní efekторы neboli inhibitory. Mohou to být látky různé povahy – organické látky, anorganické látky, ale i ionty. Inhibitor snižuje aktivitu enzymu, aniž by jej destrukoval. Jedna z možností inhibice je, když tzv. falešný „klíč“ pronikne do správného „zámku“ [20, 33].

Inhibice je jedním z hlavních regulačních prostředků živé buňky. Použití inhibitorů je důležitá diagnostická metoda enzymologie. Inhibitory umožňují zasahovat do látkové přeměny organismů. Jejich využití je v medicíně v boji proti infekcím (sulfonamidy) [45] a zhoubnému bujení (cytostatika), při transplantacích (imunosupresiva) [46], v zemědělství a zahradnictví (herbicidy a insekticidy) [47] a v neposlední řadě se mezi ně řadí i mnoho bojových látek. Aktivitu enzymů lze snížit také destrukcí drastickými fyzikálními a chemickými faktory, které naruší strukturu a vazby uvnitř proteinové molekuly. Jsou to např. var, silné hydroxidy a kyseliny, organická rozpouštědla, detergenty a koncentrované roztoky močoviny a guanidinu. Tato rozrušení struktury se však mezi inhibice neřadí. Mezi přirozené inhibitory, přítomné v tkáních a sekretech různých orgánů živočichů i některých

roślin, patří látky povahy polypeptidů, které inaktivují některé proteolytické enzymy. Jsou to např. inhibitory enzymu *trypsinu* a některých *proteáz* účastnících se procesu srážení krve [20, 33].

Existuje více mechanismů inhibice. Inhibitory lze dělit podle pevnosti vazby na enzym. Při ireverzibilní inhibici je inhibitor poután kovalentně k enzymu nebo je připojen tak pevně, že možnost disociace inhibitoru od enzymu je velmi nízká až prakticky nulová. Ireverzibilními inhibitory specifických enzymů jsou některá léčiva, např. penicilín [48]. Reverzibilní inhibice je oproti tomu charakterizována skutečnou rovnováhou mezi volným enzymem a inhibitorem a komplexem enzym-inhibitor. V mnoha případech může dojít k tvorbě kovalentní vazby, ale tato vazba je následně hydrolyzována. Dojde k obnově volného enzymu a inhibitoru [49]. Inhibitory se dělí podle mechanismu účinku (vztahu k vazbě substrátu a k jeho přeměně na produkt). Lze je od sebe rozlišit kinetickým měřením, srovnáním Michaelisovy konstanty a mezní rychlosti naměřené bez a za přítomnosti inhibitoru. Základní typy inhibicí jsou:

- **Kompetitivní**, kdy inhibitor neovlivňuje mezní rychlost a zvyšuje Michaelisovu konstantu.
- **Nekompetitivní**, kdy inhibitor neovlivňuje Michaelisovu konstantu, ale snižuje mezní rychlost.
- **Akompetitivní**, kdy inhibitor snižuje mezní rychlost i Michaelisovu konstantu, ale tak, že se nemění jejich vzájemný poměr.
- **Smíšená**, kdy inhibitor mění Michaelisovu konstantu, mezní rychlost i jejich vzájemný poměr [33].

### 3.2.1 Kompetitivní inhibice

Substrát s inhibitorem soutěží o aktivní místo enzymu, protože se nemohou současně vázat na tutéž formu enzymu. Kompetitivní inhibitory jsou strukturní analogy substrátu, enzym je nerozezná a vytvoří s nimi inaktivní komplex s inhibitorem, který se nemění na produkt [50]. Tato tvorba komplexu je vratná, protože jde pouze o slabé vodíkové vazby, které se časem opět přeruší [51]. Lze ji úplně odstranit, pokud koncentrace přirozeného substrátu silně vzroste. Rozsah inhibice závisí na poměru koncentrací substrátu a inhibitoru a na poměru jejich afinit k enzymu. Čím více je molekul kompetitivního inhibitoru, tím větší je



zábrana pro přístup přirozeného substrátu. To zpomaluje tvorbu produktu. Ke kompetitivní inhibici může dojít i soutěžením inhibitoru s koenzymem o příslušné vazebné centrum na povrchu enzymové molekuly. Tato inhibice není příliš častá v živých systémech, spíše se prosazuje u méně specifických enzymů. Kompetitivní inhibitory jsou látky chemicky příbuzné přirozenému substrátu. Jde často o členy téže homologické řady [20]. Patří mezi ně různá léčiva, např. sulfonamidy. Substituované sulfanilamidy jsou antibakteriální léčiva, protože efektivně soutěží s jim podobnou kyselinou *p*-aminobenzoovou při syntéze folátu. Zablokování syntézy kyseliny listové potlačuje bakteriální infekce, ale buňkám lidského těla neškodí, protože je pro ně vitamínem [52].

### 3.2.2 Nekompetitivní inhibice

Nekompetitivní inhibitor je molekula, která se váže na enzym v jiném než aktivním místě. Snižuje aktivitu enzymu tím, že způsobuje změny v jeho struktuře, aby zabránil katalytickým skupinám v aktivním místě jejich působení [51]. Pokud je vazba inhibitoru nekovaletní, je inhibice vratná. Ale při kovaletním spojení je nevratná, inhibitor nelze odpoutat. Tento inhibitor má pak úlohu enzymového jedu. Při této inhibici soutěž neprobíhá, na enzym se váže současně i substrát do aktivního místa. Tvorba produktu je pomalejší kvůli mírné deformaci molekuly inhibitorem v aktivním místě. Nekompetitivní inhibitor nevykazuje žádnou podobnost se substrátem [20]. Můžou to být např. látky z vaječného bílku a ze sojových bobů. Nevratně působí nervové jedy – nervový plyn sarin [53], jodacetamid (váže se na cystein) a různé insekticidy [54].

### 3.2.3 Akompetitivní inhibice

Akompetitivní inhibitor je látka, která reaguje až s komplexem enzym-substrát, nikdy ne s volným enzymem [55]. Vazbou na tento komplex zabraňuje jeho přeměně na produkt a enzym. Tato inhibice probíhá hlavně u dvousubstrátových reakcí, kdy se inhibitor váže na vazebné místo pro druhý substrát a vůči němu se pak chová jako kompetitivní inhibitor [33].

### 3.2.4 Smíšené inhibice

Jsou také prokázány případy smíšené inhibice; do této skupiny jsou zahrnovány různé typy inhibice, při nichž inhibitor mění afinitu enzymu k substrátu, ale i katalytickou rychlost přeměny substrátu na produkt [33].

## **II. PRAKTICKÁ ČÁST**

## 4 CÍL PRÁCE

Cílem této práce bylo sledování vybraných faktorů ovlivňující růst a dekarboxylázovou činnost bakterie *Serratia marcescens* a její následnou produkci biogenních aminů. Sledovanými faktory byly růstové médium, přídavek aminokyselin – lyzinu, argininu a ornitinu (jednotlivě a také v kombinaci dvou a tří aminokyselin), pH 6, 7, 8 a přídavek monosacharidů glukózy, fruktózy a galaktózy.

Pro pochopení souvislostí a problematiky biogenních aminů bylo nutné z teoretického hlediska popsat biogenní aminy, zejména jejich strukturu, tvorbu, výskyt v potravinách, biologické účinky a metody, kterými se dají tyto látky stanovit. Dále bylo třeba obecně charakterizovat enzymy, podrobněji popsat skupinu enzymů *dekarboxyláz*, faktory působící na jejich činnost a v neposlední řadě popsat inhibice enzymů.

## 5 MATERIÁL A METODIKA

### 5.1 Charakteristika bakterie *Serratia marcescens*

*Serratia marcescens* je pohyblivá, fakultativně anaerobní, gramnegativní bakterie patřící do čeledi *Enterobacteriaceae*. Rovné tyčinky mají v průměru 0,5 – 0,8  $\mu\text{m}$  a jsou dlouhé 0,9 – 2,0  $\mu\text{m}$ . Kolonie na agaru jsou neprůhledné, kruhové, konvexní a mají bílý, růžový nebo červený pigment. Některé kmeny *S. marcescens* totiž produkují pigment s názvem prodigiozin, který se pohybuje v barvě od tmavě červené až po bledě růžovou. Zbarvení závisí na věku kolonií, u starších kolonií tento pigment mizí. *S. marcescens* roste v rozmezí pH 5 až 9 a při teplotách 5 – 40 °C [56, 57, 58].

Vyskytuje se v přirozeném prostředí, tzn. v půdě, vodě a na povrchu rostlin. Upřednostňuje spíše vlhké prostředí. V podobě červených skvrn se vyskytuje na nekyselých potravinách a způsobuje jejich kažení. Bakterie často roste na škrobových potravinách, kde jsou pigmentované kolonie snadno a mylně považovány za kapky krve. *Serratia* je lyzin a ornitin dekarboxyláza-pozitivní [57, 58]. Další diagnostické znaky jsou uvedeny v tabulce 2.

Tab. 2. Diagnostické znaky *Serratia marcescens* [59].

kataláza	oxidáza	acetoin	indol	laktóza	glukóza	škrob
+	-	+	-	-	+	-

### 5.2 Použité chemikálie a přístroje

#### 5.2.1 Chemikálie

Lyzin, arginin, ornitin (Sigma-Aldrich)

Glukóza, fruktóza (Penta), galaktóza (Acros Organics)

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

Pufry pro stanovení BA (Lach-Ner)

BA pro přípravu standardu (Sigma-Aldrich)

Ninhydrinové činidlo pro stanovení BA (ZMBD Chemik)

### 5.2.2 Přístroje

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

Biologický termostat 30 °C, 37 °C (Laboratorní přístroje Praha, Česká republika)

Centrifuga MIKRO 200 R (Hettich-Zentrifugen, Tuttlingen, Německo)

Automatický analyzátor aminokyselin AAA 400 (Ingos, Praha, Česká republika)

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

Spektrofotometr Libra S6 s diodovým polem (Biochrom, Cambridge, UK)

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

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

## 5.3 Mikrobiologické analýzy

### 5.3.1 Kultivační média

Masopeptonový bujón (MPB)

- masový extrakt (HiMedia).....0,3 g
- pepton (HiMedia).....0,5 g
- NaCl (Lach-Ner).....0,3 g
- destilovaná voda.....100 ml

Složky bujónu byly naváženy a rozpuštěny ve 100 ml vody. Bujón byl vysterilován v autoklávu při 121 °C po dobu 15 minut.

Kromě základního MPB byly ke kultivacím použity bujóny s obsahem 0,2 % aminokyselin (lyzinu, argininu a ornitinu), a 0,25 – 1 % monosacharidů (glukóza, galaktóza, fruktóza) jejichž přesné složení je uvedeno v kapitolách 5.3.3, 5.3.4 a 5.3.5.

## Dekarboxylázové médium (DM)

- pepton (HiMedia).....0,5 g
- kvasničný extrakt (HiMedia).....0,3 g
- destilovaná voda.....100 ml

Složky média byly naváženy a rozpuštěny ve 100 ml vody. DM bylo vysterilováno v autoklávu při 121 °C po dobu 15 minut.

## Plate count agar (PCA)

- pepton (HiMedia).....5,0 g
- kvasničný extrakt (HiMedia).....2,5 g
- glukóza (Penta).....1,0 g
- agar (HiMedia).....15,0 g
- destilovaná voda.....1000 ml

Složky PCA byly naváženy a rozpuštěny v 1 l vody. Agar byl vysterilován v autoklávu při 121 °C po dobu 15 minut.

Připravený agar byl za tepla nalit na sterilní Petriho misky, které byly po ztuhnutí otočeny dnem vzhůru.

### 5.3.2 Kultivace bakterie

Bakterie *Serratia marcescens* byla nakultivována na pevném médiu a uchována v lednici při 4 °C. Pomnožení bakterie probíhalo v MPB, jehož přesné složení je uvedeno v kapitolách 5.3.3, 5.3.4 a 5.3.5. Kultivace byla provedena v termostatu při 30, resp. 37 °C po dobu 20 hodin.

### 5.3.3 Optimalizace složení kultivačního média

Bakterie byla pomnožena v MPB s obsahem 0,2 % lyzinu, argininu a ornitinu při 30 °C po dobu 20 hodin.

Kultivace probíhala jednak v MPB a dále také v DM. Do kultivačních médií byly přidány aminokyseliny v koncentraci 0,2 %. Jednotlivé varianty přidavku aminokyselin do obou médií jsou uvedeny v tabulce 3.

Tab. 3. Varianty přidavku aminokyselin

Varianta č.	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.
Lyzin (%)	0,2	–	–	0,2	0,2	–	0,2
Arginin (%)	–	0,2	–	0,2	–	0,2	0,2
Ornitin (%)	–	–	0,2	–	0,2	0,2	0,2

Zkumavky s takto připravenými médii byly vysterylvány v autoklávu při 121 °C po dobu 15 minut a po vychladnutí sterilně zaočkovány 50 µl bakterie pomnožené v MPB. Zaočkované zkumavky byly umístěny na 20 hodin do termostatu při 30 °C.

### 5.3.4 Stanovení počtu bakteriálních buněk

Bakterie byla pomnožena jednak v základním MPB a dále také v MPB s obsahem 0,2 % ornitinu. Po sterilizaci (121 °C, 15 minut) a vychladnutí byla média zaočkována kolonií *S. marcescens*. Kultivace probíhala 20 hodin jak v termostatu při 30 °C, tak i při 37 °C.

U všech 4 variant bylo provedeno ředění  $10^0 - 10^{-8}$  a byla změřena optická hustota (denzita) buněk. K tomuto účelu byl využit spektrofotometr s diodovým polem Libra S6 (Biochrom, Cambridge, UK) s programem pro měření optické hustoty buněk ( $\lambda = 600$  nm).

Ředění  $10^{-3} - 10^{-8}$  byla sterilně rozhojekována po 100 µl na misky s PCA. Misky byly umístěny do termostatu na 20 hodin při teplotě 37 °C a poté byly spočítány vyrostlé kolonie.



Ze získaných výsledků optické hustoty a počtu kolonií byla sestrojena kalibrační křivka, která byla proložena mocninnou regresí. Rovnice kalibrační přímky má tvar:

$$y = a \cdot x^b \quad (6)$$

Pomocí této rovnice byl určován počet buněk bakterie v dalších vzorcích.

### 5.3.5 Stanovení vlivu pH a přídavku monosacharidů na růst a dekarboxylázovou aktivitu *Serratia marcescens*

Bakterie byla pomnožena v MPB s obsahem 0,2 % ornitinu při 30 °C po dobu 20 hodin.

Kultivace probíhala jednak v základním MPB a dále také v MPB s obsahem 0,2 % ornitinu. Do obou médií byla přidána glukóza, galaktóza, resp. fruktóza v koncentraci 0,25 %, 0,5 %, 0,75 % a 1 %. Kromě toho proběhla kultivace též v médiích bez přídavku sacharidu. Bakterie byla kultivována jednak při pH 7 (tj. pH MPB) a dále také při pH 6 a 8. pH bylo upraveno 1 mol.l<sup>-1</sup> HCl, resp. NaOH.

Zkumavky s takto připravenými médii byly vysterilovány v autoklávu při 121 °C po dobu 15 minut a po vychladnutí sterilně zaočkovány 50 µl bakterie pomnožené v MPB s obsahem 0,2 % ornitinu. Zaočkované zkumavky byly umístěny na 20 hodin do termostatu při 30 °C. Část zkumavek (ve všech výše uvedených variantách) byla z důvodu srovnání pH a optické denzity umístěna do termostatu bez zaočkování.

Ve všech zkumavkách bylo po kultivaci změřeno pH a optická hustota buněk. V každém vzorku celkem třikrát (n = 3).

## 5.4 Stanovení obsahu biogenních aminů

### 5.4.1 Příprava vzorků

Po kultivaci byl obsah zkumavek důkladně promíchán a přepipetován do mikrozkušavek typu Eppendorf. Eppendorfy byly centrifugovány při 15000 otáčkách po dobu 10 min a supernatant byl následně zfiltrován 0,45 µm filtrem. Takto připravené vzorky byly analyzovány pomocí iontové výměnné chromatografie.

#### 5.4.2 Iontově výměnná kapalinová chromatografie

100  $\mu$ l zfiltrovaného vzorku bylo automaticky nastříknuto do analyzátoru aminokyselin AAA 400 (Ingos, Praha, Česká republika), jehož fotografie je součástí přílohy P III. Důležitým prvkem analyzátoru je kolona (55  $\times$  3,7 mm) naplněná iontoměničem Ostion LG ANG (Ingos, Praha, Česká republika). Detekce probíhala po postkolonové ninhydrinové derivatizaci spektrofotometrickým detektorem ( $\lambda = 570$  nm). Složení jednotlivých pufrů, činidel a eluční program je uveden v práci Buňková a kol. [60].

Vzorky pro optimalizaci složení kultivačního média byly připravovány celkem třikrát po dvou opakováních a každý byl dvakrát analyzován na analyzátoru aminokyselin ( $n = 12$ ).

Vzorky pro stanovení vlivu pH a přídavku monosacharidů na růst a dekarboxylázovou aktivitu *S. marcescens* se připravovaly při každém pH a přídavku monosacharidů třikrát a každý vzorek byl opět dvakrát analyzován na analyzátoru aminokyselin ( $n = 6$ ).

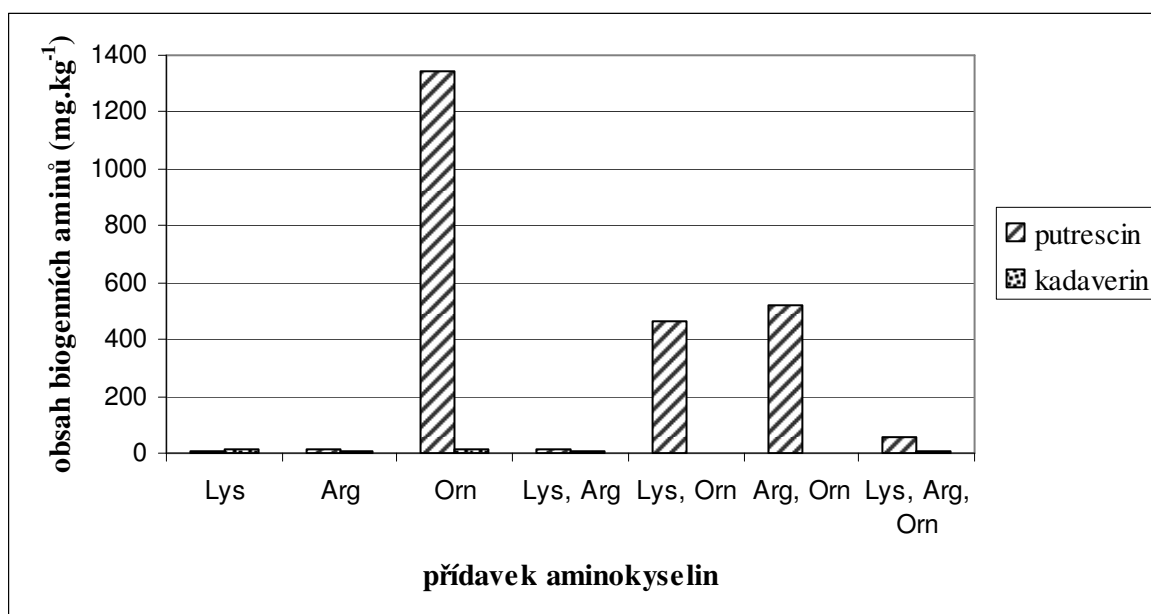
#### 5.5 Statistické vyhodnocení výsledků

Výsledky stanovení biogenních aminů byly podrobeny statistickému hodnocení s použitím parametrického testu srovnávajícího střední hodnoty dvou nezávislých výběrů (Studentův t-test). Statistická analýza byla provedena pomocí programu StatK25 na hladině významnosti 5 %.

## 6 VÝSLEDKY A DISKUZE

### 6.1 Optimalizace složení kultivačního média

Dekarboxylázová aktivita byla testována za použití masopeptonového bujónu (MPB) a dekarboxylázového média (DM). V obou médiích byl detekován putrescin a kadaverin. Obsah biogenních aminů se pohyboval od 2,9 mg.kg<sup>-1</sup> do 1342,2 mg.kg<sup>-1</sup>. Obsah putrescinu a kadaverinu produkovaný v přídatku různých kombinací aminokyselin v MPB, resp. DM je uveden na obrázku 10, resp. 11.

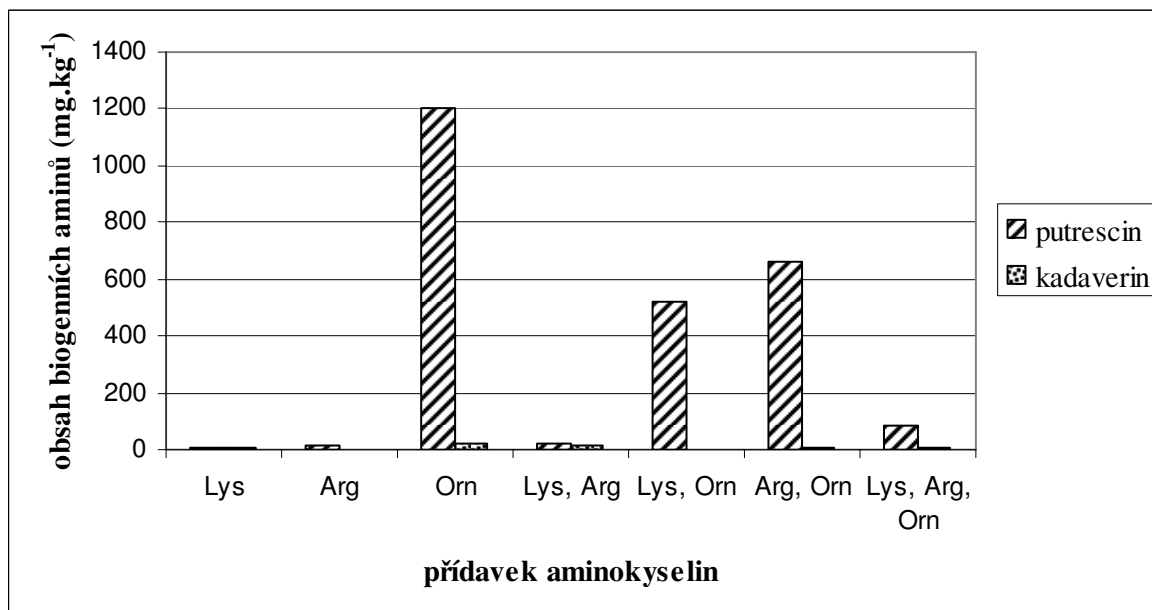


Obr. 10. Vliv přídavku aminokyselin na produkci biogenních aminů v MPB

Skríníng přídavku tří aminokyselin – lyzinu, argininu, ornitinu v koncentraci 0,2 % (jednotlivě či v kombinaci dvou a tří aminokyselin dohromady) ukázal, že *Serratia* vykazovala největší dekarboxylázovou aktivitu vůči ornitinu ( $P < 0,05$ ). Výsledky produkce putrescinu z ornitinu se u obou médií nelišily ( $P \geq 0,05$ ). Tvorba putrescinu pro kombinaci prekurzorů lyzin – ornitin a lyzin – arginin – ornitin byla u obou médií srovnatelná ( $P \geq 0,05$ ). Produkce putrescinu z kombinace aminokyselin arginin – ornitin byla významně vyšší v DM než v MPB ( $P < 0,05$ ). Je zajímavé, že s přídavkem lyzinu, tedy aminokyseliny, která je prekurzorem kadaverinu, se tento biogenní amin téměř netvořil. Stejný případ pak nastal i při-

přídavku argininu, který sice je prekurzorem putrescinu, ale tento BA z něj byl produkován v minimálním množství.

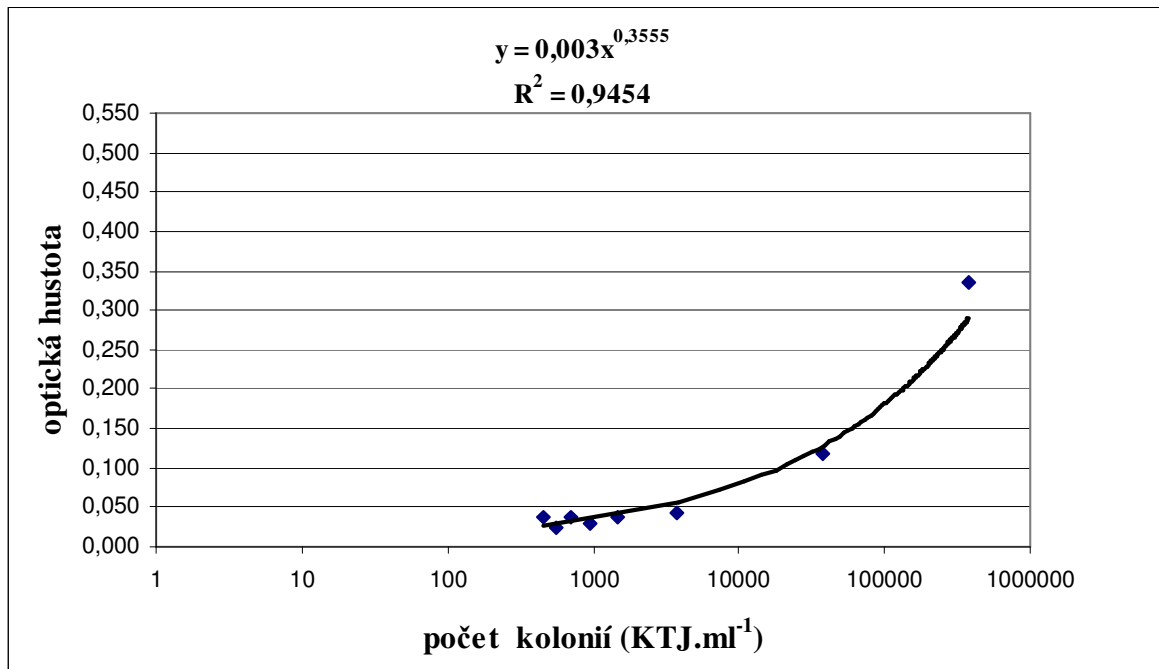
Pro kultivaci *S. marcescens* v dalších experimentech byl vybrán MPB s přídavkem 0,2 % ornitinu a byla sledována pouze produkce putrescinu.



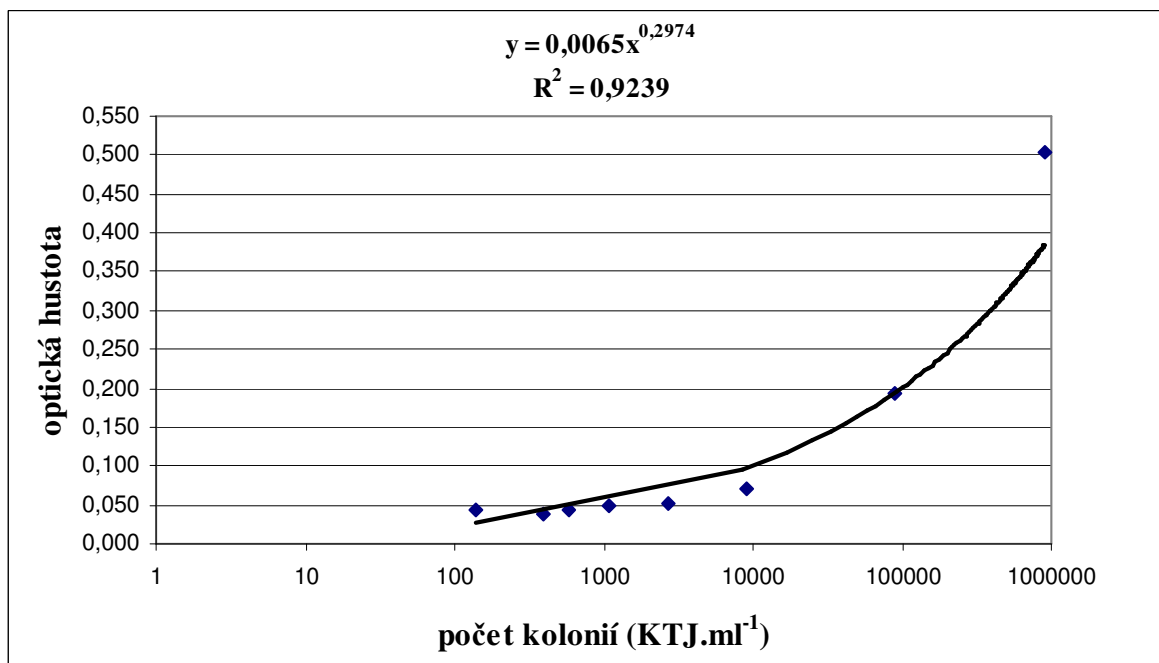
Obr. 11. Vliv přídavku aminokyselin na produkci biogenních aminů v DM

## 6.2 Stanovení počtu bakteriálních buněk

Pro stanovení počtu bakteriálních buněk byla zvolena metoda kalibrační křivky, což je závislost optické hustoty (denzity) na počtu kolonií. Kalibrační křivka pro kultivaci při 30 °C bez přídavku ornitinu je zobrazena spolu s rovnicí regrese a hodnotou spolehlivosti na obrázku 12. Kalibrační křivka s rovnicí regrese a hodnotou spolehlivosti pro vzorky kultivované při 30 °C s přídavkem ornitinu je zobrazena na obrázku 13.



Obr. 12. Kalibrační křivka pro vzorky bez ornitinu (kultivace při 30 °C)



Obr. 13. Kalibrační křivka pro vzorky s ornitinem (kultivace při 30 °C)

Kultivace vzorků probíhala i při 37 °C, avšak výsledky pro obě zvolené teploty byly srovnatelné ( $P \geq 0,05$ ); proto další kultivace probíhaly už jen při 30 °C.

### 6.3 Stanovení vlivu pH a přídavku monosacharidů na růst a dekarboxylázovou aktivitu *Serratia marcescens*

Před vlastním stanovením vlivu pH a přídavku monosacharidů na růst a dekarboxylázovou aktivitu *S. marcescens* bylo provedeno orientační měření za účelem zjištění, zda přídavek monosacharidů glukózy, galaktózy a fruktózy ovlivňuje pH média a jeho optickou hustotu (média tedy nebyla zaočkována *S. marcescens*). Z tabulky č. 4 lze rozeznat, že při přídavku všech tří sacharidů docházelo s rostoucí koncentrací sacharidů v médiu k nepatrnému poklesu pH bez rozdílu na druh monosacharidu. 1% koncentrace monosacharidu snižovala pH průměrně o hodnotu pH 0,6 ve srovnání s 0% koncentrací. Z výsledků je také zřejmé, že přídavek jakéhokoliv monosacharidu neovlivňoval optickou hustotu média.

Tab. 4. Vliv přídavku monosacharidů na pH média a optickou hustotu (bez *S. marcescens*)

		pH 6		pH 7		pH 8	
Sacharid	%	pH	OD	pH	OD	pH	OD
Glukóza	0	6,23	0	6,58	0	7,92	0
	0,25	6,13	0,01	6,39	0,01	7,79	0
	0,5	6,01	0,01	6,36	0,02	7,66	0
	0,75	5,94	0,01	6,27	0,01	7,52	0
	1	5,61	0	6,13	0,01	7,41	0
Galaktóza	0	6,23	0	6,58	0	7,92	0
	0,25	5,99	0	6,30	0,02	7,73	0
	0,5	5,82	0,01	6,05	0,02	7,53	0
	0,75	5,74	0	6	0,02	7,37	0,01
	1	6,03	0,03	5,93	0,04	7,26	0,02
Fruktóza	0	6,23	0	6,58	0	7,92	0
	0,25	6,04	0	6,38	0	7,57	0
	0,5	5,72	0,01	6,19	0	7,25	0
	0,75	5,6	0,01	6,15	0,02	7,07	0,07
	1	5,57	0,02	5,98	0,03	6,84	0,02

Pozn.: OD = optická hustota. Toto měření bylo provedeno pouze 1x, a proto nejsou u výsledků uvedeny směrodatné odchylky.

Následující tabulky 5 – 7 poukazují na vliv přídavku monosacharidů na pH média a počet buněk v médiu po zaočkování bakterií *S. marcescens* při pH 6, 7 a 8.

Tab. 5. Vliv přidavku monosacharidů na pH média a počet buněk po zaočkování *S. marcescens* při pH 6

Sacharid	%	pH		Počet buněk (log KTJ.ml <sup>-1</sup> )	
		0 % ORN	0,2 % ORN	0 % ORN	0,2 % ORN
Glukóza	0	7,37 ± 0,03	7,43 ± 0,13	7,53 ± 0,06	7,85 ± 0,11
	0,25	5,54 ± 0,03	6,02 ± 0,28	7,61 ± 0,03	8,31 ± 0,09
	0,5	4,77 ± 0,01	4,97 ± 0,01	7,62 ± 0,09	8,34 ± 0,03
	0,75	4,57 ± 0,02	4,75 ± 0,01	7,63 ± 0,03	8,27 ± 0,04
	1	4,43 ± 0,00	4,61 ± 0,03	7,74 ± 0,03	8,17 ± 0,06
Galaktóza	0	7,37 ± 0,03	7,43 ± 0,13	7,53 ± 0,06	7,85 ± 0,11
	0,25	6,77 ± 0,06	6,83 ± 0,04	7,70 ± 0,06	8,18 ± 0,04
	0,5	6,52 ± 0,04	6,62 ± 0,04	7,67 ± 0,04	8,33 ± 0,07
	0,75	6,51 ± 0,01	6,59 ± 0,03	7,72 ± 0,11	8,20 ± 0,09
	1	6,33 ± 0,07	6,77 ± 0,22	7,59 ± 0,05	7,77 ± 0,40
Fruktóza	0	7,37 ± 0,03	7,43 ± 0,13	7,53 ± 0,06	7,85 ± 0,11
	0,25	4,96 ± 0,01	5,35 ± 0,09	7,49 ± 0,02	8,30 ± 0,02
	0,5	4,85 ± 0,02	4,94 ± 0,01	7,61 ± 0,02	8,25 ± 0,03
	0,75	4,81 ± 0,01	4,91 ± 0,02	7,61 ± 0,05	8,24 ± 0,02
	1	4,80 ± 0,02	5,02 ± 0,20	7,66 ± 0,07	7,71 ± 0,12

Pozn.: ORN = ornitin. Výsledky jsou vyjádřeny jako průměr ± směrodatná odchylka.

Při přidavku monosacharidů se pH média snižovalo, a to zejména u vzorků bez přidavku ornitinu ( $P < 0,05$ ). U vzorků s ornitinem docházelo k poklesu pH pouze v přítomnosti glukózy ( $P < 0,05$ ); v případě monosacharidů galaktózy a fruktózy nebyl pokles pH významný ( $P \geq 0,05$ ). V médiu s přidavkem ornitinu a jednotlivých monosacharidů bylo pH ve většině případů o něco vyšší, než u média bez ornitinu ( $P < 0,05$ ).

Co se týče počtů buněk, docházelo u vzorků bez ornitinu k různému kolísání hodnot. U vzorků s ornitinem docházelo k výraznému zvýšení buněk při přidavku 0,25 – 0,75 % všech tří monosacharidů ve srovnání s nulovou koncentrací těchto cukrů ( $P < 0,05$ ). Z toho plyne, že monosacharidy v koncentraci 0,25 – 0,75 % jsou při pH 6 v přítomnosti ornitinu pro *S. marcescens* vhodným zdrojem energie a uhlíku. Přídavek monosacharidů v množství 1 % již další zvýšení počtu buněk nevyvolal ( $P \geq 0,05$ ). U vzorků s ornitinem byla optická hustota, resp. počet buněk ve většině případů vyšší, než u vzorků bez ornitinu ( $P < 0,05$ ).

Tab. 6. Vliv přidavku monosacharidů na pH média a počet buněk po zaočkování *S. marcescens* při pH 7

Sacharid	%	pH		Počet buněk (log KTJ.ml <sup>-1</sup> )	
		0 % ORN	0,2 % ORN	0 % ORN	0,2 % ORN
Glukóza	0	7,52 ± 0,21	6,63 ± 0,11	7,29 ± 0,12	7,03 ± 0,09
	0,25	6,23 ± 0,11	6,15 ± 0,21	7,77 ± 0,07	7,41 ± 0,11
	0,5	4,73 ± 0,01	4,60 ± 0,08	7,56 ± 0,03	7,36 ± 0,08
	0,75	4,56 ± 0,03	4,41 ± 0,00	7,46 ± 0,06	7,51 ± 0,07
	1	4,47 ± 0,03	4,25 ± 0,02	7,45 ± 0,03	7,34 ± 0,02
Galaktóza	0	7,52 ± 0,21	6,63 ± 0,11	7,29 ± 0,12	7,03 ± 0,09
	0,25	6,76 ± 0,18	6,41 ± 0,09	7,55 ± 0,05	7,47 ± 0,03
	0,5	6,29 ± 0,13	6,19 ± 0,15	7,45 ± 0,04	7,54 ± 0,06
	0,75	6,13 ± 0,04	6,02 ± 0,01	7,37 ± 0,06	7,67 ± 0,04
	1	6,06 ± 0,02	6,03 ± 0,02	7,47 ± 0,10	7,71 ± 0,11
Fruktóza	0	7,52 ± 0,21	6,63 ± 0,11	7,29 ± 0,12	7,03 ± 0,09
	0,25	5,47 ± 0,28	5,22 ± 0,07	7,54 ± 0,06	7,44 ± 0,16
	0,5	4,75 ± 0,00	4,56 ± 0,06	7,63 ± 0,02	7,67 ± 0,07
	0,75	4,76 ± 0,06	4,65 ± 0,04	7,62 ± 0,01	7,57 ± 0,12
	1	4,68 ± 0,03	4,68 ± 0,09	7,47 ± 0,05	7,51 ± 0,15

Pozn.: ORN = ornitin. Výsledky jsou vyjádřeny jako průměr ± směrodatná odchylka.

Přídavek monosacharidů způsoboval výrazné snížení pH média téměř ve všech případech ( $P < 0,05$ ), jak u vzorků bez ornitinu, tak i s jeho přidavkem. Mezi přidavky 0,75 % a 1 % monosacharidu nebyl zaznamenán významný rozdíl, což lze pozorovat např. u vzorků s fruktózou a galaktózou ( $P \geq 0,05$ ). U vzorků s přidavkem ornitinu byl zaznamenán výrazně větší pokles pH, než u vzorků bez ornitinu ( $P < 0,05$ ).

Přídavek monosacharidů až na jednu výjimku (přídavek 0,75 % galaktózy) výrazně zvyšoval počet buněk v médiu ( $P < 0,05$ ). Z hlediska přidavku různých koncentrací cukrů nebyl zaznamenán jednoznačný stoupající či klesající trend, hodnoty kolísaly s přidavkem každého monosacharidu jiným způsobem. Lze tedy konstatovat, že při pH 7 měly na růst *S. marcescens* pozitivní vliv všechny testované koncentrace glukózy, galaktózy i fruktózy. Médium s přidavkem ornitinu vykazovalo nižší počet buněk (kromě vzorku s 0,75 % galaktózy), než médium bez ornitinu ( $P < 0,05$ ).



Tab. 7. Vliv přidavku monosacharidů na pH média a počet buněk po zaočkování *S. marcescens* při pH 8

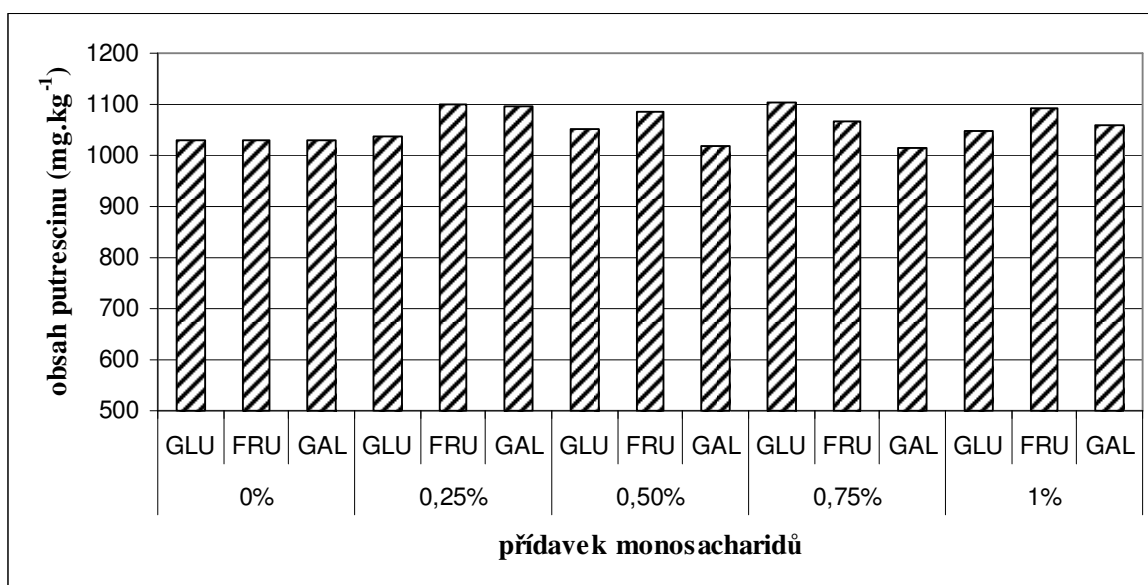
Sacharid	%	pH		Počet buněk (log KTJ.ml <sup>-1</sup> )	
		0 % ORN	0,2 % ORN	0 % ORN	0,2 % ORN
Glukóza	0	7,65 ± 0,25	7,95 ± 0,02	6,85 ± 0,33	7,07 ± 0,21
	0,25	5,52 ± 0,38	6,36 ± 0,11	7,29 ± 0,11	8,10 ± 0,03
	0,5	5,04 ± 0,03	5,50 ± 0,03	7,45 ± 0,03	8,24 ± 0,06
	0,75	4,82 ± 0,01	5,09 ± 0,01	7,31 ± 0,05	8,14 ± 0,08
	1	4,68 ± 0,01	4,97 ± 0,00	7,44 ± 0,06	8,06 ± 0,07
Galaktóza	0	7,65 ± 0,25	7,95 ± 0,02	6,85 ± 0,33	7,07 ± 0,21
	0,25	6,62 ± 0,04	6,97 ± 0,36	7,32 ± 0,13	7,73 ± 0,24
	0,5	6,37 ± 0,12	6,77 ± 0,38	7,26 ± 0,04	7,82 ± 0,21
	0,75	6,12 ± 0,09	6,53 ± 0,10	7,35 ± 0,06	8,00 ± 0,03
	1	6,16 ± 0,06	6,48 ± 0,04	7,22 ± 0,06	8,07 ± 0,09
Fruktóza	0	7,65 ± 0,25	7,95 ± 0,02	6,85 ± 0,33	7,07 ± 0,21
	0,25	5,32 ± 0,17	5,98 ± 0,18	7,46 ± 0,14	8,16 ± 0,06
	0,5	4,95 ± 0,01	5,17 ± 0,00	7,27 ± 0,05	8,05 ± 0,02
	0,75	4,93 ± 0,00	5,09 ± 0,00	7,39 ± 0,08	8,11 ± 0,03
	1	4,93 ± 0,01	5,03 ± 0,01	7,42 ± 0,06	8,05 ± 0,02

Pozn.: ORN = ornitin. Výsledky jsou vyjádřeny jako průměr ± směrodatná odchylka.

U vzorků bez ornitinu při přidání glukózy ve všech koncentracích docházelo ke snížení pH v médiu ( $P < 0,05$ ), při dodání galaktózy a fruktózy bylo pozorováno snížení pH až do koncentrace 0,75 % monosacharidu ( $P < 0,05$ ), 1% přídavek fruktózy a galaktózy už pH dál nesnižoval ( $P \geq 0,05$ ). S přídavkem ornitinu v médiu se výrazně snižovalo pH u vzorků s glukózou a fruktózou ( $P < 0,05$ ), galaktóza snížila pH v médiu v případě 0,25 % přídavku ( $P < 0,05$ ), při vyšší koncentraci galaktózy už dál nedocházelo k ovlivnění pH ( $P \geq 0,05$ ). U vzorků bez ornitinu byl pokles pH významně nižší ( $P < 0,05$ ), než u vzorků s ornitinem.

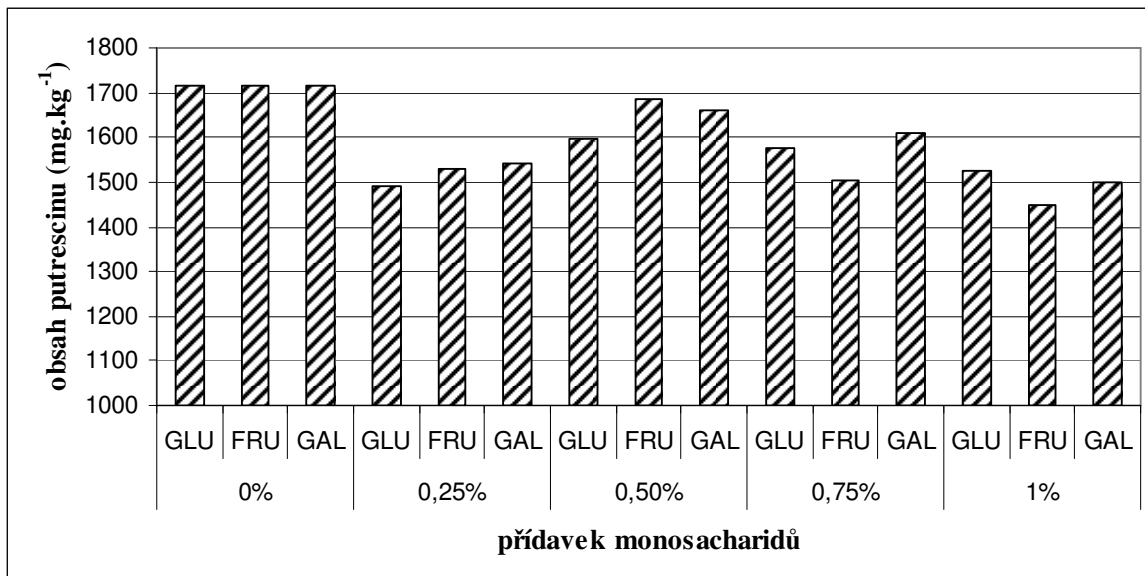
Optická denzita, resp. počet buněk se s přídavkem všech monosacharidů významně zvýšil ( $P < 0,05$ ) jak v přítomnosti ornitinu, tak i bez něj. Jednotlivé koncentrace přídavku sacharidů způsobovaly různý trend ve vývoji, nicméně lze obecně říci, že (stejně jako v případě pH 7) i při pH 8 měly na růst *S. marcescens* pozitivní vliv všechny testované koncentrace glukózy, galaktózy i fruktózy. Počet buněk byl téměř u všech vzorků s ornitinem vyšší, než u vzorků bez ornitinu ( $P < 0,05$ ).

V následující části praktického měření byl sledován vliv přidavku monosacharidů na produkci putrescinu při pH 6, 7 a 8 v MPB s přidavkem 0,2 % ornitinu (viz obrázek 14 – 16). Vzhledem k nízkým koncentracím kadaverinu (viz kapitola 6.1), nebyla jeho tvorba dále sledována. Součástí příloh P IV, P V a P VI jsou vzorové chromatogramy.



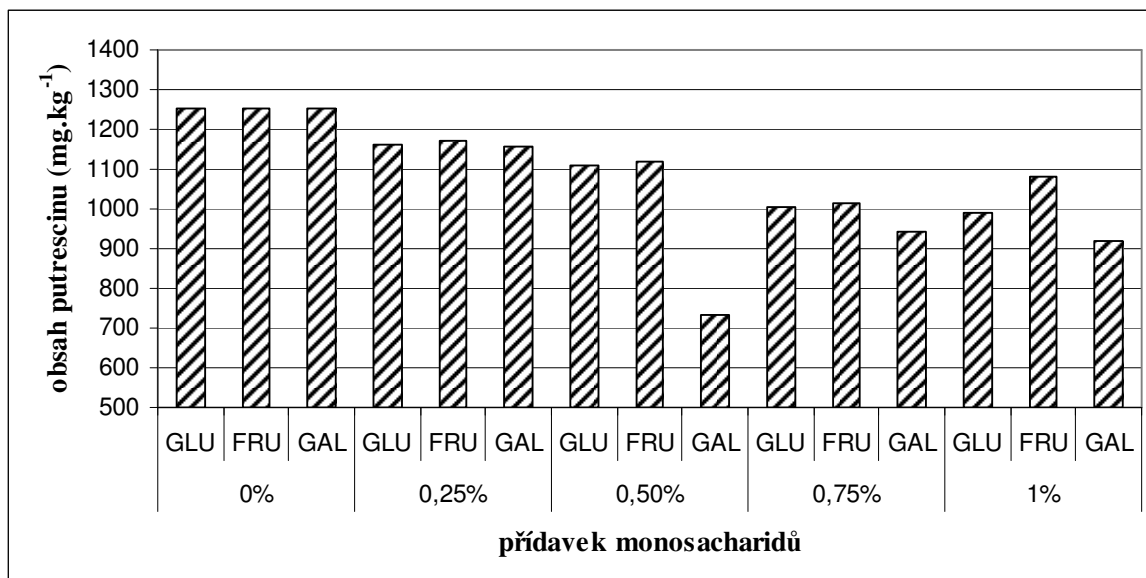
Obr. 14. Vliv přidavku monosacharidů na tvorbu putrescinu při pH 6

Na obrázku 14 je znázorněna produkce putrescinu v závislosti na přidavku monosacharidů při pH 6. V případě glukózy došlo ke zvýšení tvorby putrescinu pouze v případě koncentrace 0,75 % ( $P < 0,05$ ), zatímco ostatní koncentrace jeho tvorbu neovlivnily ( $P \geq 0,05$ ). Fruktóza v koncentraci 0,25 – 0,75 % výrazně zvýšila tvorbu putrescinu ( $P < 0,05$ ). 1% přidavek fruktózy neměl žádný vliv na tvorbu tohoto biogenního aminu ( $P \geq 0,05$ ). Přídavkem galaktózy vzrostla produkce putrescinu pouze v koncentraci 0,25 % ( $P < 0,05$ ), ostatní koncentrace se ukázaly jako neúčinné ( $P \geq 0,05$ ). Lze tedy shrnout, že při pH 6 měla fruktóza pozitivní účinek na produkci putrescinu, zatímco přidavek glukózy a galaktózy ji téměř nikterak neovlivnil. Mezi jednotlivými koncentracemi každého monosacharidu nebyl zaznamenán jednoznačný trend, hodnoty kolísaly každá jiným způsobem. Produkce putrescinu vzrostla v průměru o  $37,22 \text{ mg.kg}^{-1}$ .



Obr. 15. Vliv přidavku monosacharidů na tvorbu putrescinu při pH 7

Produkce putrescinu v závislosti na přidavku glukózy, fruktózy a galaktózy při pH 7 je zobrazena na obrázku 15. Stanovení produkce biogenních aminů při pH 7 ukázalo, že přidavkem všech koncentrací glukózy došlo k výraznému snížení tvorby putrescinu ( $P < 0,05$ ). Fruktóza také redukovala tvorbu putrescinu, pouze při dodání 0,5 % její koncentrace nedošlo k ovlivnění ( $P \geq 0,05$ ). Stejný případ nastal i u galaktózy, kdy u přidavku 0,5 % její koncentrace nebyl zaznamenán žádný účinek ( $P \geq 0,05$ ), zatímco ostatní koncentrace významně snižovaly produkci putrescinu ( $P < 0,05$ ). Monosacharidy tedy téměř ve všech případech snižovaly tvorbu zmiňovaného biogenního aminu. Pokles činil v průměru  $162,11 \text{ mg.kg}^{-1}$ . Ve většině případů byly mezi jednotlivými koncentracemi každého monosacharidu také významné rozdíly ( $P < 0,05$ ), i když ze získaných výsledků nelze vypořádat jednoznačně klesající či rostoucí trend.



Obr. 16. Vliv přidavku monosacharidů na tvorbu putrescinu při pH 8

Na obrázku 16 je zobrazena závislost obsahu putrescinu na přidavku jednotlivých monosacharidů při pH 8. Z obrázku lze vyčíst, že všechny přidané koncentrace všech tří monosacharidů výrazně snižovaly produkci putrescinu ( $P < 0,05$ ). Přídavek glukózy způsoboval s rostoucí koncentrací postupný pokles obsahu putrescinu ( $P < 0,05$ ). Fruktóza vykazovala postupný inhibiční účinek až do koncentrace 0,75 % a galaktóza pak do 0,5 % ( $P < 0,05$ ). Nicméně, i média s vyšší koncentrací fruktózy a galaktózy obsahovala nižší množství putrescinu ve srovnání s nulovou koncentrací těchto cukrů ( $P < 0,05$ ). Tvorba putrescinu se snížila v průměru o 219,21 mg.kg<sup>-1</sup>.

## 6.4 Diskuze

Obě kultivační média (MPB i DM) se skládají ze základních složek (pepton, kvasničný nebo masový extrakt, NaCl a destilovaná voda). Již v minulosti byla v těchto médiích prokázána produkce biogenních aminů různými bakteriemi [61], což se nyní potvrdilo i u bakterie *S. marcescens*. Jako kapalné médium pro růst kultury *S. marcescens* byl vybrán masopeptonový bujón (MPB) s přidavkem 0,2 % aminokyselin (lyzinu, argininu a ornitinu). MPB je vhodné pomnožovací médium, které splňuje růstové a energetické požadavky nenáročných mikrobiálních druhů. Pro produkci i aktivitu bakterie je nutné, aby kultivační

prostředí bylo saturováno živinami a neobsahovalo inhibiční látky, proto byly přidány k médiu aminokyseliny. MPB byl před DM upřednostnět také z toho důvodu, že jeho složení je bližší potravinám.

Zároveň byl v této studii proveden skrínig přidavku tří aminokyselin – lyzinu, argininu, ornitinu v koncentraci 0,2 % jednotlivě, v kombinaci dvou různých a následně i všech tří aminokyselin dohromady. Zatímco ornitin a arginin jsou prekurzory putrescinu, z lyzinu se tvoří kadaverin. *Serratia marcescens* vykazovala silnou dekarboxylázovou aktivitu vůči ornitinu, ze kterého přímo vznikal putrescin (až 1342,2 mg.kg<sup>-1</sup> v MPB a 1202,2 mg.kg<sup>-1</sup> v DM). Vysoká koncentrace putrescinu byla způsobena enzymem *ornitindekarboxyláza* (EC 4.1.1.17). Putrescin vznikal také z aminokyselin v kombinaci arginin – ornitin, lyzin – ornitin a lyzin – arginin – ornitin, ale v podstatně nižších koncentracích. Upřednostnění prekurzoru ornitinu před argininem pro tvorbu putrescinu lze pravděpodobně vysvětlit tím, že mechanismus produkce putrescinu z argininu vyžaduje mezistupeň agmatin nebo karbamoylputrescin. Pro bakterii je tak výhodnější jednostupňová cesta z ornitinu [62]. Bakterie je také *lyzindekarboxyláza*-pozitivní, proto ve všech jednotlivých i kombinovaných variantách z lyzinu docházelo k tvorbě kadaverinu. Koncentrace kadaverinu byla ovšem velice nízká (do 20,7 mg.kg<sup>-1</sup>), lze to vysvětlit tím, že optimum pro činnost *lyzindekarboxylázy* (EC 4.1.1.18) je při teplotě 37 °C a pH 5,2 – 7,0 [63]. V našem případě probíhala kultivace při 30 °C. Za nižších teplot by musela kultivace probíhat delší dobu, než jen 24 hodin, aby byla produkce kadaverinu vyšší. Podobná bakterie *Klebsiella pneumoniae* ze stejné čeledi *Enterobacteriaceae* vykazuje nejvyšší koncentraci kadaverinu při 37 °C v 30. hodině kultivace [63].

Orientační stanovení vlivu přidavku monosacharidů na pH a optickou hustotu média ukázalo, že s přidavkem monosacharidů docházelo k mírnému poklesu pH v médiu, které ovšem lze pokládat za zanedbatelné. Optická hustota média nebyla nijak ovlivněna, monosacharidy byly v médiu snadno rozpuštěny.

Po úpravě pH roztoku a zaočkování *S. marcescens* monosacharidy v médiu významně snižovaly pH. S rostoucí koncentrací cukrů pH klesalo a to zejména v médiu o pH 6, přidavek nad 0,75 % galaktózy a fruktózy v médiu o pH 7 a 8 už aciditu dál nezvyšoval. Galaktóza v médiu o pH 8 a s přidavkem ornitinu neovlivnila pH suspenze při jejím přidavku nad 0,25 %. Vzhledem k tomu, že glukóza, fruktóza a galaktóza patří mezi jednoduché fermentovatelné sacharidy, bakterie z nich produkují kyseliny – zejména kyselinu mléčnou,

octovou a propionovou, což vede k okyselení prostředí. V médiu s ornitinem byl pokles pH téměř ve všech případech o něco nižší, protože *S. marcescens* metabolizovala monosacharidy a zároveň využívala ornitin jako aminokyselinový prekurzor k tvorbě aminů.

Při přidavku 0,25 – 0,75 % monosacharidů v médiu o pH 6 bylo zaregistrováno zvýšené množství buněk. Nad 0,75 % přidavku cukrů buňky už nerostly. Při pH 7 a 8 všechny testované koncentrace cukrů zvyšovaly růst bakterie. Rozsah růstu bakterie ovlivňuje hlavně pH, potom také teplota a délka inkubace [64]. Jak je patrné z výsledků, tak *Serratii marcescens* vyhovuje spíše pH 7 a 8, než nižší pH 6. Teplota inkubace 30 °C a její délka (20h) byla zvolena jako běžná inkubační teplota pro tento typ bakterie a nikterak negativně neovlivňovala její růst a aktivitu [56, 57, 58]. Podobná bakterie *Klebsiella pneumoniae* ze stejné čeledi *Enterobacteriaceae* produkuje ve stejném médiu (MPB) nejvíce biogenních aminů při 30 a 37 °C [63]. Rozdílné hodnoty pH i optické denzity mezi jednotlivými sacharidy jsou zcela jistě také ovlivňovány metabolickou dráhou, která je různě dlouhá pro každý monosacharid (viz dále).

Stanovení produkce putrescinu ukázalo, že pH je klíčovým faktorem ovlivňující dekarboxylázovou aktivitu. Prostředí média o pH 7 přineslo nejvyšší produkci putrescinu (1717,09 mg.kg<sup>-1</sup>), při pH 8 byla produkce nižší (1252,6 mg.kg<sup>-1</sup>) a nejnižší byla při pH 6 (1027,79 mg.kg<sup>-1</sup>). Z literatury je však známo, že *dekarboxylázy* se nejvíce projevují v kyselém pH optimu mezi pH 4 a 5,5 [64, 65, 66]. Z toho vyplývá, že tvorba aminů nezávisí jen na optimálním pH pro dekarboxylázovou aktivitu, ale také na růstové aktivitě dané bakterie [64]. Tvorba putrescinu byla nejvyšší při pH 7, které bylo neoptimálnější pro růst *S. marcescens*.

Přídavek monosacharidů do média při pH 6 zvyšoval tvorbu putrescinu a to nejvíce při dodání 0,25 – 0,75% koncentrace. Nejvíce ovlivnila tvorbu fruktóza a nejméně galaktóza. Při pH 7 a 8 naopak došlo ke snížení produkce putrescinu vlivem přidavku všech monosacharidů. Nejmenší vliv na snížení měla při pH 7 fruktóza a galaktóza v koncentraci 0,5 %. Všechny ostatní koncentrace významně snižovaly tvorbu biogenního aminu jako tomu bylo i ve všech případech u stanovení při pH 8. pH 6 bylo optimálnějším prostředím pro činnost *dekarboxyláz* [64, 65], proto se produkce zvyšovala. Navíc se produkcí putrescinu bakterie chránila před účinkem nízkého pH, které, jak se ukázalo, není optimální pro její růst. Z důvodu vyššího pH (méně vhodného pro *dekarboxylázy*) byly přednostně v médiu metabolizovány monosacharidy a pak až docházelo k tvorbě biogenního aminu.

Sacharidy jsou významným zdrojem energie pro buňky a také zdrojem uhlíku pro syntézu buněčných složek. Každý monosacharid se choval v médiu jinak. Rozdílné hodnoty mezi jednotlivými monosacharidy jsou způsobeny různou délkou metabolické dráhy každého monosacharidu (viz příloha P VII). Klíčovou látkou v metabolismu sacharidů je glukóza-6-fosfát (Glc-6P), která je spojnicí metabolických drah. Nejkratší cestu v metabolismu má jednoznačně glukóza, fruktóza a galaktóza se odbourávají buď vlastní cestou, nebo opět stejnou cestou přes glukózu v glykolýze. Rozdílné hodnoty pH i optické denzity mezi jednotlivými sacharidy byly zcela jistě také ovlivňovány metabolickou dráhou každého monosacharidu. Jak je již uvedeno v kapitole 2.9, tak růst bakterie i její dekarboxylázovou aktivitu zvyšují koncentrace cukru 0,5 – 2 % [6]. V našem případě docházelo ke zvýšení nejvíce v koncentracích 0,25 – 0,75 %, ale záleželo také na druhu sacharidu.

Z výsledků také vyplynulo, že s přidavkem prekurzoru ornitinu se zvýšil růst *S. marcescens* a jak ukázalo hned první stanovení (kapitola 6.1), tak se zvýšila i produkce biogenního aminu putrescinu, což bylo prokázáno již v předchozích studiích [67].

## ZÁVĚR

Biogenní aminy patří k přirozeným antinutričním látkám, které jsou hygienicky významné ve výživě. Jsou přirozenou součástí buněčných struktur rostlin a často také vznikají při procesu výroby a skladování potravin jako výsledek metabolického působení mikroorganismů. Biogenní aminy se tvoří nejčastěji v potravinách s vyšším obsahem bílkovin, které obsahují mikroorganismy vyznačující se dekarboxylázovou aktivitou. Jak čisté bakteriální kultury přidávající se do potravin např. při procesu fermentace, tak i kontaminující mikroflóra může tvořit *dekarboxylázy*. Dekarboxylázovou činností se vyznačuje i bakterie *S. marcescens* z čeledi *Enterobacteriaceae*. Její aktivita závisí na podmínkách vhodných pro její růst a dekarboxylázovou činnost.

Práce se zabývala sledováním vybraných faktorů ovlivňující růst a dekarboxylázovou aktivitu *S. marcescens*. Sledovanými faktory byly růstové médium, přítomnost prekurzorů (aminokyselin) v médiu, pH prostředí (6 – 8) a přídavek monosacharidů (glukózy, fruktózy a galaktózy). Produkce biogenních aminů byla stanovena pomocí iontově výměnné kapalinové chromatografie. Růst příslušné bakterie byl sledován měřením optické denzity vzorků. Na základě získaných výsledků byly formulovány tyto závěry:

- masopeptonový bujón i dekarboxylázové médium poskytovaly téměř totožné výsledky v produkci biogenních aminů. Pro další experimenty byl zvolen masopeptonový bujón pro jeho složení, které je bližší potravinám,
- vhodným prekurzorem pro tvorbu biogenních aminů se ukázal ornitin,
- všechny monosacharidy snižovaly pH prostředí a to nejvíce v médiu o pH 6, nejméně ovlivnila pH prostředí galaktóza v médiu o pH 8,
- přídavek ornitinu brzdil pokles pH v médiu,
- optimální pH pro růst *S. marcescens* bylo prokázáno pH 7 – 8,
- přídavek ornitinu stimuloval růst *S. marcescens* i její dekarboxylázovou aktivitu,
- přídavek monosacharidů stimuloval růst bakterie, a to nejvíce při pH 7 a 8,
- přídavek monosacharidů zvyšoval tvorbu putrescinu při pH 6 (optimální pH pro *dekarboxylázy*),



- přidavek monosacharidů brzdil produkci putrescinu při pH 7 a 8 (preference metabolismu cukrů před tvorbou biogenních aminů),
- největší vliv na produkci aminu měla fruktóza, nejmenší galaktóza,
- všechny zmíněné faktory se ovlivňovaly mezi sebou navzájem

Na závěr lze konstatovat, že všechny vytyčené cíle této práce byly splněny. Koncentrace biogenních aminů je jedním z ukazatelů kvality potravin. Proto je velice důležité sledovat obsah biogenních aminů v potravinách a monitorovat také veškeré faktory, které jejich tvorbu ovlivňují.

## SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] LUKÁŠOVÁ, J. Význam mikrobiologie pro zajištění zdravotní nezávadnosti a jakosti potravin [online]. [cit. 2010-04-22]. Dostupný z WWW: <<http://www.vetweb.cz/projekt/clanek.asp?pid=2&cid=3482>>.
- [2] VELÍŠEK, J. *Chemie potravin 3*. 2. vyd. Tábor: OSSIS, 2002. 343 s. ISBN 80-86659-02-X.
- [3] SILLA SANTOS, M. H. Biogenic amines: their importance in foods. *International Journal of Food Microbiology*. 1996, roč. 29, s. 213-231.
- [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, roč. 5, s. 42-49.
- [5] INNOCENTE, N., BIASUTTI, M., PADOVESE, M., MORET, S. Determination of biogenic amines in cheese using HPLC technique and direct derivatization of acid extract. *Food Chemistry*. 2007, roč. 101, s. 1285-1289.
- [6] ADAMS, M. R., NOUT, M. J. R. Toxic Nitrogen Compounds Produced during Processing: Biogenic Amines, Ethyl Carbamides, Nitrosamines. *Fermentation and Food Safety*. Gaithersburg MD: Aspen Publisher, 2001. s. 119 - 140. ISBN 978-0-8342-1843-7.
- [7] *Biochemické pojmy, výkladový slovník* [online]. [cit. 2010-3-08]. Dostupný z WWW: <[http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid\\_es-002/ebook.html?p=pyridoxin](http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-002/ebook.html?p=pyridoxin)>.
- [8] *MetaCyc Encyclopedia of Metabolic Pathways* [online]. [cit. 2010-3-04]. Dostupný z WWW: <<http://biocyc.org/metacyc/index.shtml>>.
- [9] KALÁČ, P., KRAUSOVÁ, P. A review of dietary polyamines: Formation, implications for growth and health and occurrence in foods. *Food Chemistry*. 2005, roč. 90, s. 219-230.
- [10] SHALABY, A. R. Significance of biogenic amines to food safety and human health. *Food Research International*. 1996, roč. 29, s. 675-690.

- [11] FOX, P. F., MCSWEENEY, P. L. H., COGAN, T. M., GUINEE, T. P. Toxins in cheese. *Cheese – Chemistry, Physics and Microbiology. General Aspects*. 3<sup>rd</sup> ed. 2004. s. 561-571. ISBN 0-1226-3652-X.
- [12] KALAČ, P., KŘÍŽEK, M. A review of biogenic amines and polyamines in beer. *Journal of the Institute of Brewing*. 2003, roč. 109, s. 123-128.
- [13] LORET, S., DELOYER, P., DANDRIFOSSE, G. Levels of biogenic amines as a measure of the quality of the beer fermentation process: Data from Belgian samples. *Food Chemistry*. 2005, roč. 89, s. 519-525.
- [14] HALÁSZ, A., BARÁTH, A., HOLZAPFEL, W. The biogenic amine content of beer; the effect of barley, malting and brewing on amine concentration. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -Forschung A*. 1999, roč. 208, s. 418-423.
- [15] MARCOBAL, A., MARTÍN-ALVAREZ, P. J., POLO, M. C., MUÑOS, R., MORENO-ARRIBAS, M. V. Formation of biogenic amines throughout the industrial manufacture of red wine. *Journal of Food Protection*. 2006, roč. 69, s. 397-404.
- [16] MARTÍN-ÁLVAREZ, P. J., MARCOBAL, Á., POLO, C., MORENO-ARRIBAS, M. V. Influence of technological practices on biogenic amine contents in red wines. *European Food Research and Technology*. 2006, roč. 222, s. 420-424.
- [17] GARCIAA-VILLAR, N., HERNAA NDEZ-CASSOU, S., SAURINA, J. Characterization of wines through the biogenic amine contents using chromatographic techniques and chemometric. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2007, roč. 55, s. 7453-7461.
- [18] SMĚLÁ, D., PECHOVÁ, P., KOMPRDA, T., KLEJDUS, B., KUBÁŇ, V. Chromatografické stanovení biogenních aminů v trvanlivých salámech během fermentace a skladování. *Chemické listy*. 2004, roč. 98, s. 432-437.
- [19] CSOMÓS, E., SIMON-SARKADI, L. Characterisation of Tokaj Wines Based on Free Amino Acids and Biogenic Amines Using Ion-exchange Chromatography. *Chromatographia Supplement*. 2002, roč. 56, s. 185-188.

- [20] LEDVINA, M., STOKLASOVÁ, A., CERMAN, J. *Biochemie pro studující medicíny I. díl*. Praha: Nakladatelství Karolinum, 2005. 274 s.
- [21] *Enzymy (katalýza biochemických reakcí)* [online]. [cit. 2010-3-08]. Dostupný z WWW:  
<<http://is.muni.cz/do/1499/el/estud/pef/js09/biochem/web/tisk/t-enzymy.pdf>>.
- [22] KIRK, O., BORCHERT, T. V., FUGLSANG, C. C. Industrial enzyme applications. *Current Opinion in Biotechnology*. 2002, roč. 13, s. 345-351.
- [23] LEIBOLD, G. *Enzymy – enzymy při prevenci a léčbě*. Praha: Pragma, 2002. 77 s. ISBN 80-7205-700-6.
- [24] WHITAKER, J. R. *Principles of enzymology for the food science*. 2<sup>nd</sup> ed. New York: CRC Press, 1994. 625 s. ISBN 0-8247-9148-7.
- [25] *Z materiálu k výuce: přednáška Ribozymy* [online]. [cit. 2010-3-10]. Dostupné na WWW:  
<<http://www.lf2.cuni.cz/Ustavy/biochemie/vyuka/biox2.htm>>.
- [26] KHACHIGIAN, L. M. *Synthetic nucleic acids as inhibitors of gene expression: mechanisms, applications, and therapeutics implications*. USA: CRC Press, 2005. 182 s. ISBN 0-8493-3025-4.
- [27] *Enzyme-substrate complex* [online]. [cit. 2010-3-10]. Dostupné na WWW: <[http://www.hsc.csu.edu.au/biology/core/balance/9\\_2\\_1/921net.html](http://www.hsc.csu.edu.au/biology/core/balance/9_2_1/921net.html)>.
- [28] *Cofactor (biochemistry)* [online]. [cit. 2010-3-10]. Dostupné na WWW: <<http://en.wikipedia.org/wiki/Coenzyme>>.
- [29] BETTELHEIM, F. A., BROWN, W. H., CAMPBELL, M. K., FARRELL, S. O. *Introduction to organic and biochemistry*. 7<sup>th</sup> ed. USA: Cengage Learning, 2009. 569 s. ISBN 0-495-39116-6.
- [30] KOTYZA, J., BALVÍN, M., ČERNÝ, R., ČERNÁ, E., RACEK, J., ŠVARC, V. *Úvod do klinické biochemie a enzymologie pro studující lékařství: teorie a praktikum*. Praha: Karolinum, 2007. 150 s. ISBN 978-80-246-1350-5.

- [31] SHEPPARD, R. C. *Amino-acids, peptides and proteins*. USA: Royal Society of Chemistry, 1976. 504 s. ISBN 0-85186-074-5.
- [32] *Izoenzym* [online]. [cit. 2010-3-11]. Dostupné na WWW: <<http://cs.wikipedia.org/wiki/Izoenzym>>.
- [33] ZEHNÁLEK, J. *Biochemie*. Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, 2005. 168 s. ISBN 80-7157-840-1.
- [34] DASTYCH, M., HRDINEK, P., A KOL. *Klinická biochemie: bakalářský obor Zdravotní laborant*. Brno: Masarykova univerzita, 2008. 232 s. ISBN 978-80-246-1350-5.
- [35] AEHLE, W. *Enzymes in industry: production and applications*. 3<sup>rd</sup> ed. Germany: Wiley-VCH, 2007. 489 s. ISBN 978-3-527-31689-2.
- [36] *Základní pojmy enzymologie* [online]. [cit. 2010-3-12]. Dostupné na WWW: <[old.lf3.cuni.cz/chemie/cesky/materialy\\_B/enzymy.doc](http://old.lf3.cuni.cz/chemie/cesky/materialy_B/enzymy.doc)>.
- [37] STENESH, J. *Biochemistry*. USA: Birkhäuser, 1998. 568 s. ISBN 0-306-45732-6.
- [38] *Michaelis-Menten kinetics* [online]. [cit. 2010-3-13]. Dostupné na WWW: <<http://themedicalbiochemistrypage.org/enzyme-kinetics.html>>.
- [39] *Aminokyseliny* [online]. [cit. 2010-03-18]. Dostupný z WWW: <<http://www.biochemie.wz.cz/aminokyseliny.html>>.
- [40] *Decarboxylases* [online]. [cit. 2010-3-18]. Dostupné na WWW: <<http://www.expasy.org/enzyme/>>.
- [41] HUI, Y. H. *Handbook of food science, technology and engineering*. vol. 2. New York: CRC Press, 2006. 1000 s. ISBN 1-57444-551-0.
- [42] WARD, O. P., SINGH, A. Enzymatic asymmetric synthesis by decarboxylases. *Current Opinion in Biotechnology*. 2000, roč. 11, s. 520-526.
- [43] AGER, D. J. *Handbook of chiral chemicals*. 2<sup>nd</sup> ed. USA: CRC Press, 2006. 648 s. ISBN 1-57444-664-9.
- [44] BISSWANGER, H. *Enzyme kinetics: principles and methods*. 2<sup>nd</sup> ed. Germany: Wiley-VCH, 2008. 301 s. ISBN 978-3-527-31957-2.

- [45] STRANIX, B. R., SAUVÉ, G., BOUZIDE, A., COTÉ, A., SÉVIGNY, G., YELLE, J., PERRON, V. Lysine sulfonamides as novel HIV-protease inhibitors: Ne-disubstituted ureas. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2004, roč. 14, s. 3971-3974.
- [46] CRESPO-LEIRO, M. G. Calcineurin Inhibitors in Heart Transplantation. *Transplantation Proceedings*. 2005, roč. 37, s. 4018-4020.
- [47] ASHIGH, J., CORBETT, CH-A. L., SMITH, P. J., LAPLANTE, J., TARIF, F. J. Characterization and diagnostic tests of resistance to acetohydroxyacid synthase inhibitors due to an Asp<sub>376</sub>Glu substitution in *Amaranthus powellii*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 2009, roč. 95, s. 38-46.
- [48] METZLER, D. E., METZLER, C. M. *Biochemistry: the chemical reactions of living cells*. 2<sup>nd</sup> ed. USA: Academic Press, 2001. 937 s. ISBN 0-12-492540-5.
- [49] FOYE, W. O., LEMKE, T. L., WILLIAMS, D. A. *Foye's principles of medicinal chemistry*. 6<sup>th</sup> ed. USA: Lippincott Williams & Wilkins, 2007. 1377 s. ISBN 978-0-7817-6879-5.
- [50] ROSKOSKI, R. *Biochemistry*. USA: Elsevier Health Sciences, 1996. 530 s. ISBN 0-7216-5174-7.
- [51] STOKER, H. S. *General, organic, and biological chemistry*. 4<sup>th</sup> ed. USA: Cengage Learning, 2007. 871 s. ISBN 0-618-60606-8.
- [52] BAYLY, A. M., MACREADIE, I. G. Folic acid antagonism of sulfa drug treatments. *Trends in Parasitology*. 2002, roč. 18, s. 49-50.
- [53] DAVIDSON, V. L., SITTMAN, D. B. *Biochemistry*. 4<sup>th</sup> ed. USA: Lippincott Williams & Wilkins, 1999. 479 s. ISBN 0-683-30503-4.
- [54] IQBAL, S. A. *Biochemistry*. India: Discovery Publishing House, 2005. 328 s. ISBN 81-7141-985-2.
- [55] BUXBAUM, E. *Fundamentals of protein structure and function*. USA: Springer, 2007. 367 s. ISBN 978-0-387-26352-6.
- [56] *Enterobacteriaceae: Serratia marcescens* [online]. [cit. 2010-4-10]. Dostupné na WWW: <[http://www.ruf.rice.edu/~bioslabs/bios318/species\\_id\\_example.pdf](http://www.ruf.rice.edu/~bioslabs/bios318/species_id_example.pdf)>.

- [57] *Serratia marcescens* [online]. [cit. 2010-4-10]. Dostupné na WWW: <<http://www.sci.muni.cz/mikrob/MiniAtlas/serr.htm>>.
- [58] *Serratia marcescens* [online]. [cit. 2010-4-10]. Dostupné na WWW: <[http://en.wikipedia.org/wiki/Serratia\\_marcescens](http://en.wikipedia.org/wiki/Serratia_marcescens)>.
- [59] *Serratia marcescens* biochemical tests [online]. [cit. 2010-4-10]. Dostupné na WWW: <[http://inst.bact.wisc.edu/inst/index.php?module=Book&func=displayarticle&art\\_id=123](http://inst.bact.wisc.edu/inst/index.php?module=Book&func=displayarticle&art_id=123)>.
- [60] BUŇKOVÁ, L., BUŇKA, F., HLOBILOVÁ, M., VAŇÁTKOVÁ, Z., NOVÁKOVÁ, D., DRÁB, V. Tyramine production of technological important strains of *Lactobacillus*, *Lactococcus* and *Streptococcus*. *European Food Research and Technology*. 2009, roč. 229, s. 533-538. ISSN 1438-2377.
- [61] BOVER-CID, S., HOLZAPFEL, W.H. Improved screening procedure for biogenic amine production by lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*. 1999, roč. 53, s. 33-41.
- [62] BOUCHEREAU, A., AZIZ, A., LARHER, F., MARTIN-TANGUY, J. Polyamines and environmental challenges: recent development. *Plant Science*. 1999, roč. 140, s. 103-125.
- [63] GREIF, G., GREIFOVÁ, M., DVORAN, J., KAROVIČOVÁ, J., BUCHTOVÁ, V. Study of the growth and production of biogenic amines by some microorganisms in model conditions. *Czech Journal of Food Science*. 1999, roč. 17, s. 15-21.
- [64] GARDINI, F., MARTUSCELLI, M., CARUSO, M. C., GALGANO, F., CRUDELE, M. A., FAVATI, F., GUERZONI, M. E., SUZZI G. Effects of pH, temperature and NaCl concentration on the growth kinetics, proteolytic activity and biogenic amine production of *Enterococcus faecalis*. *International Journal of Food Mikrobiology*. 2001, roč. 64, s. 105 – 117.
- [65] TEODOROVIC, V., BUNCIC, S., SMILJANIC, D. A study of factors influencing histamine production in meat. *Fleischwirtschaft*. 1994, roč. 74, s. 170 – 172. ISSN 0015-363X.

- [66] GREIF, G., GREIFOVÁ, M., KAROVIČOVÁ, J. Effects of NaCl concentration and initial pH value on biogenic amine formation dynamics by *Enterobacter* spp. bacteria in model conditions. *Journal of Food and Nutrition Research*. 2006, roč. 45, s. 21-29.
- [67] FERNÁNDEZ, M., LINARES, D. M., RODRÍGUEZ, A., ALVAREZ, M. A. Factors affecting tyramine production in *Enterococcus durans* IPLA 655. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2007, roč. 73, s. 1400-1406.
- [68] *Serotonin* [online]. [cit. 2010-4-5]. Dostupné na WWW: <<http://cs.wikipedia.org/wiki/Serotonin>>.
- [69] Strukturní vzorce biogenních aminů a prekurzorů [online]. [cit. 2010-4-5]. Dostupné na WWW: <<http://www.sigmaaldrich.com>>.
- [70] Strukturní vzorce biogenních aminů a prekurzorů [online]. [cit. 2010-4-5]. Dostupné na WWW: <<http://commons.wikimedia.org>>.
- [71] *Spermine* [online]. [cit. 2010-4-5]. Dostupné na WWW: <<http://en.wikipedia.org/wiki/Spermine>>.
- [72] *Ethanolamine* [online]. [cit. 2010-4-5]. Dostupné na WWW: <<http://en.wikipedia.org/wiki/Ethanolamine>>.
- [73] ADAMS, M. R., MOSS, M. O. *Food microbiology*. 3<sup>rd</sup> ed. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 2008. 577 s. ISBN: 978-0-85404-284-5.



**SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK**

AAA	Automatický analyzátor aminokyselin (Automatic Amino Acid Analyser)
AOAC	Asociace analytických chemiků (Association of Official Analytical Chemists)
BA	Biogenní amin/y (Biogenic amine/s)
CE	Kapilární elektroforéza (Capillary electrophoresis)
DAO	Diaminoxidáza (Diamineoxidase)
DM	Dekarboxylázové médium
E	Enzym (Enzyme)
$E_a$	Aktivační energie (Activation energy)
EC/IUBMB	Enzymová komise/Mezinárodní Biochemická a Molekulárně biologická Unie (Enzyme Commission/International Union of Biochemistry and Molecular Biology)
ES	Enzym-substrátový komplex (Enzyme-substrate complex)
GC	Plynová chromatografie (Gas chromatography)
GLC	Plynová rozdělovací chromatografie (Gas-liquid chromatography)
Glc-6P	Glukóza-6-fosfát (Glucose 6-phosphate)
GSH	Glutation (Glutathione)
hnRNA	Heterogenní jaderná ribonukleová kyselina (Heterogeneous nuclear ribonucleic acid)
HPLC	Vysokoučinná kapalinová chromatografie (High performance liquid chromatography)
IEC	Iontově výměnná chromatografie (Ion exchange chromatography)
LC/MS	Kapalinová chromatografie s detekcí hmotnostní spektrometrií (Liquid chromatography/mass spectrometry)

---

LD	Laktátdehydrogenáza (Lactate dehydrogenase)
MAO	Monoaminoxidáza (Monoamineoxidase)
MPB	Masopeptonový bujón (Meat-peptone broth)
$M_r$	Relativní molekulová hmotnost (Relative molecular mass)
mRNA	Mediátorová ribonukleová kyselina (Messenger ribonucleic acid)
OD	Optická hustota (Optical density)
OPA	<i>o</i> -ftaldialdehyd ( <i>o</i> -phthalaldehyde)
ORN	ornitin
P	Produkt (Product)
PC	Papírová chromatografie (Paper chromatography)
PCA	PCA agar (Plate Count Agar)
RNA	Ribonukleová kyselina (Ribonucleic acid)
S	Substrát (Substrate)
TLC	Tenkvrstvá chromatografie (Thin layer chromatography)
UPLC	Ultravýkonná kapalinová chromatografie (Ultra-performance liquid chromatography)
UV	Ultrafialové záření (Ultraviolet radiation)

**SEZNAM OBRÁZKŮ**

Obr. 1. Kofaktor pyridoxalfosfát.....	13
Obr. 2. Dekarboxylace histidinu, lyzinu a argininu .....	14
Obr. 3. Vznik putrescinu dvěma odlišnými dráhami .....	14
Obr. 4. Vznik dopaminu a tryptaminu .....	15
Obr. 5. Průběh katalyzované a nekatalyzované reakce .....	23
Obr. 6. Vznik enzym-substrátového komplexu .....	25
Obr. 7. Závislost rychlosti jednosubstrátové reakce na koncentraci substrátu .....	32
Obr. 8. Reciproké vyjádření podle Lineweavera a Burka .....	34
Obr. 9. Dekarboxylace aminokyselin.....	36
Obr. 10. Vliv přídavku aminokyselin na produkci biogenních aminů v MPB .....	51
Obr. 11. Vliv přídavku aminokyselin na produkci biogenních aminů v DM .....	52
Obr. 12. Kalibrační křivka pro vzorky bez ornitinu (kultivace při 30 °C).....	53
Obr. 13. Kalibrační křivka pro vzorky s ornitinem (kultivace při 30 °C).....	53
Obr. 14. Vliv přídavku monosacharidů na tvorbu putrescinu při pH 6 .....	58
Obr. 15. Vliv přídavku monosacharidů na tvorbu putrescinu při pH 7 .....	59
Obr. 16. Vliv přídavku monosacharidů na tvorbu putrescinu při pH 8 .....	60

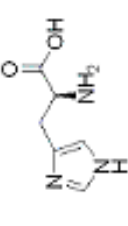

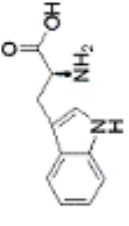
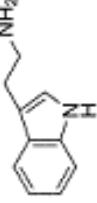
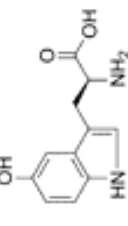
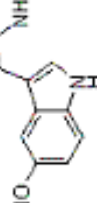
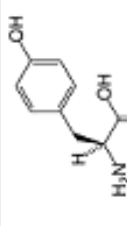
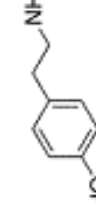
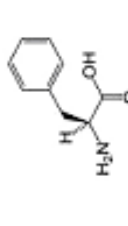
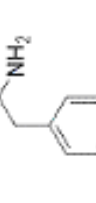
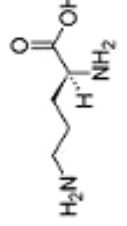

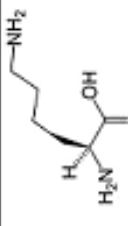

**SEZNAM TABULEK**

Tab. 1. Běžně užívané (doporučené) názvy enzymů.....	30
Tab. 2. Diagnostické znaky <i>Serratia marcescens</i> .....	45
Tab. 3. Varianty přídatku aminokyselin.....	48
Tab. 4. Vliv přídatku monosacharidů na pH média a optickou hustotu (bez <i>S. marcescens</i> ) .....	54
Tab. 5. Vliv přídatku monosacharidů na pH média a počet buněk po zaočkování <i>S. mar-</i> <i>cescens</i> při pH 6.....	55
Tab. 6. Vliv přídatku monosacharidů na pH média a počet buněk po zaočkování <i>S. mar-</i> <i>cescens</i> při pH 7.....	56
Tab. 7. Vliv přídatku monosacharidů na pH média a počet buněk po zaočkování <i>S. mar-</i> <i>cescens</i> při pH 8.....	57




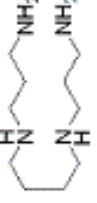
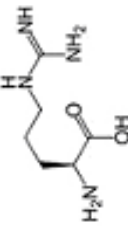

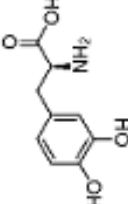
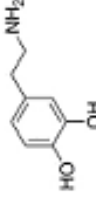
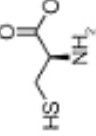

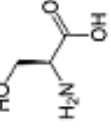

**SEZNAM PŘÍLOH**

- P I: Přehled nejdůležitějších biogenních aminů, jejich prekurzorů a biologický význam
- P II: Přehled nejdůležitějších biogenních aminů, jejich prekurzorů a biologický význam
- P III: Automatický analyzátor aminokyselin AAA 400 (Ingos, Praha, Česká Republika)
- P IV: Chromatogram standardu biogenních aminů
- P V: Chromatogram vzorku s ornitinem a s přídavkem 0,5 % glukózy
- P VI: Chromatogram vzorku bez ornitinu a s přídavkem 0,75 % fruktózy
- P VII: Metabolismus sacharidů

**PŘÍLOHA P I: Přehled nejdůležitějších biogenních aminů, jejich prekurzorů a biologický význam [2, 68, 69, 70]**

Prekurzor biogenního aminu	Vzorec prekurzoru	Biogenní amin	Vzorec biogenního aminu	Biologický význam biogenního aminu
histidin		histamin		Lokální tkáňový hormon, vliv na krevní tlak, sekreci žaludeční šťávy, účast při anafylaktickém šoku a alergických reakcích
tryptofan		tryptamin		Lokální tkáňové a rostlinné hormony (katecholaminy), vliv na krevní tlak, peristaltiku střev, psychické funkce
5-hydroxytryptofan		serotonin		Neurotransmitter, podporuje kontrakce hladkého svalstva a krevní srážlivost
tyrozin		tyramin		Prekurzor dopaminu, lokální tkáňový hormon, vliv na krevní tlak a kontrakce hladkého svalstva
fenylalanin		fenyletylamin		Prekurzor tyraminu, hormon a alkaloid skupiny amfetaminu, psychotropní vlastnosti
ornitin		putrescin		Stabilizace makromolekul (nukleové kyseliny), subcelulárních struktur (ribozomy), stimulační diferenciace buněk, rostlinný hormon
lyzin		kadaverin		Stabilizace makromolekul (nukleové kyseliny), subcelulárních struktur (ribozomy), stimulační diferenciace buněk, rostlinný hormon

**PŘÍLOHA P II: Přehled nejdůležitějších biogenních aminů, jejich prekurzorů a biologický význam [2, 69, 70, 71, 72]**

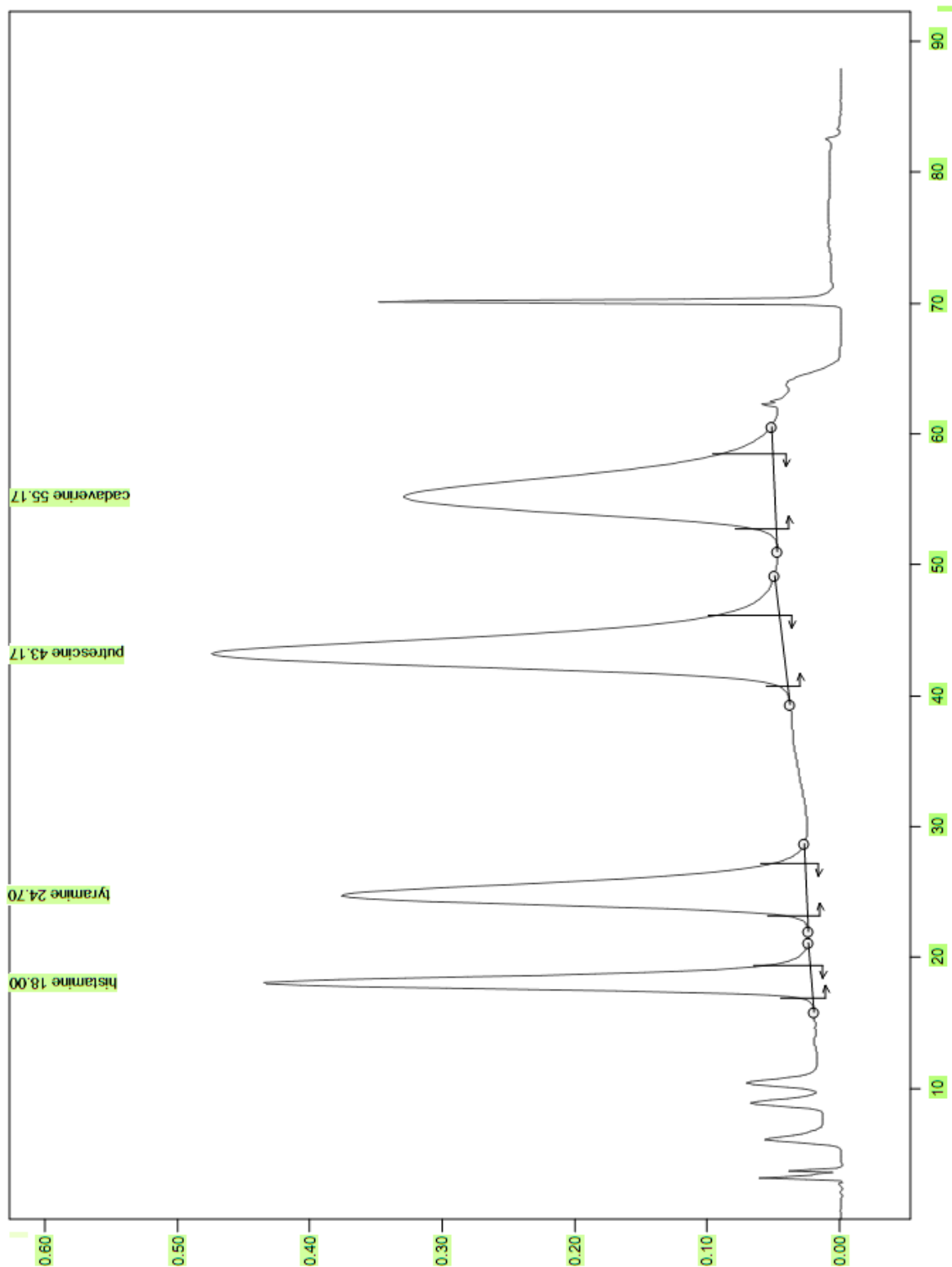
Prekurzor biogenního aminu	Vzorec prekurzoru	Biogenní amin	Vzorec biogenního aminu	Biologický význam biogenního aminu
putrescin		spermidin		Omlazuje buňky, brzdí stárnutí
spermidin		spermin		Růstový faktor některých bakterií, stabilizace helikálních struktur (virů)
arginin		agmatin		Stabilizace makromolekul (nukleové kyseliny), subcelulárních struktur (ribozomy), stimulace diferenciac buněk, rostlinný hormon
dihydroxyfenyla lanin		dopamin		Mediátory sympatických nervů, neurohormon tvořený v hypotalamu
cystein		cysteamin		Složka koenzymu A, radioprotektor
serin		etanolamin		Složka fosfolipidů v biomembránách

**PŘÍLOHA P III: Automatický analyzátor aminokyselin AAA 400 (Ingos, Praha, Česká Republika)**

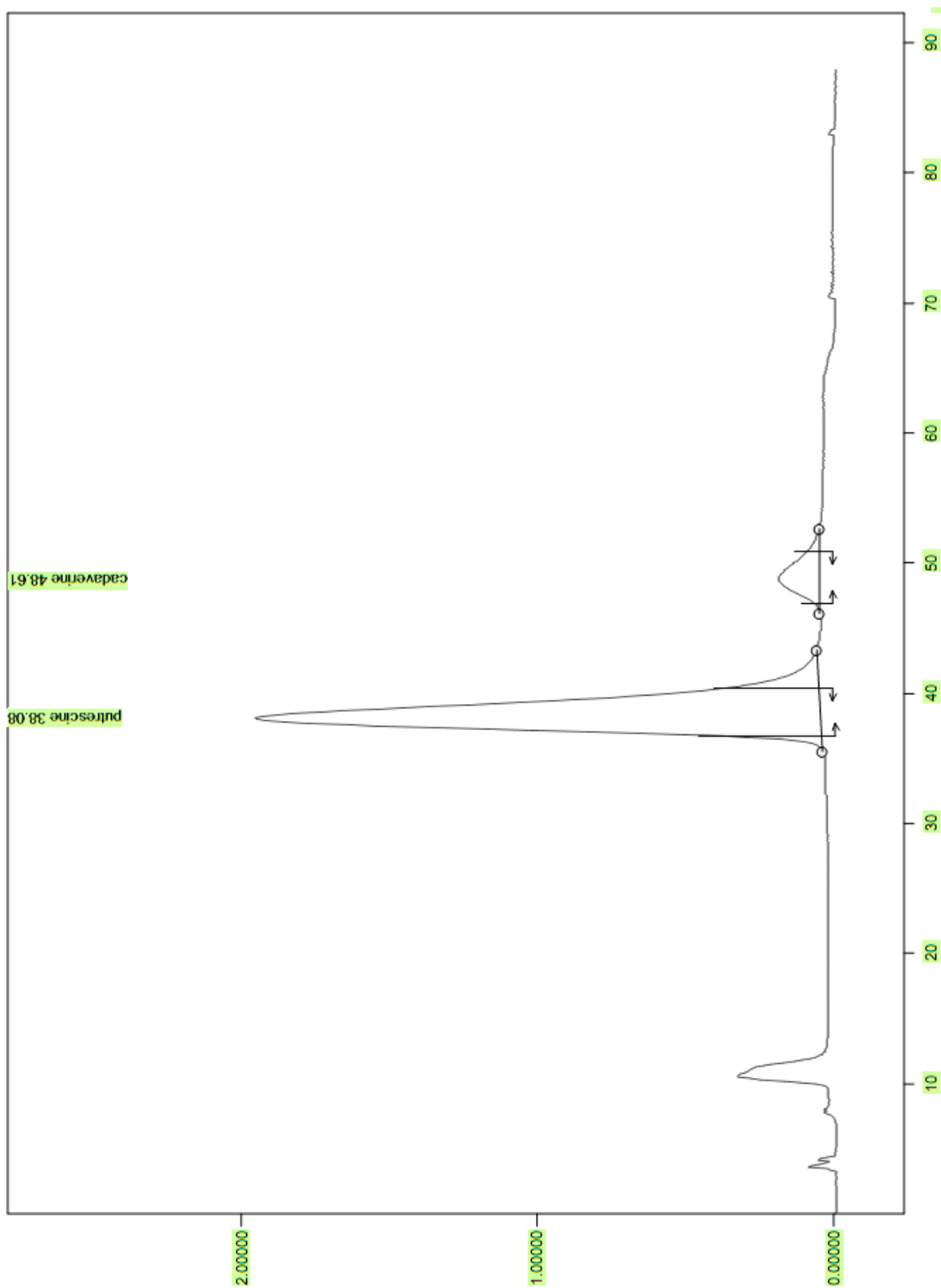




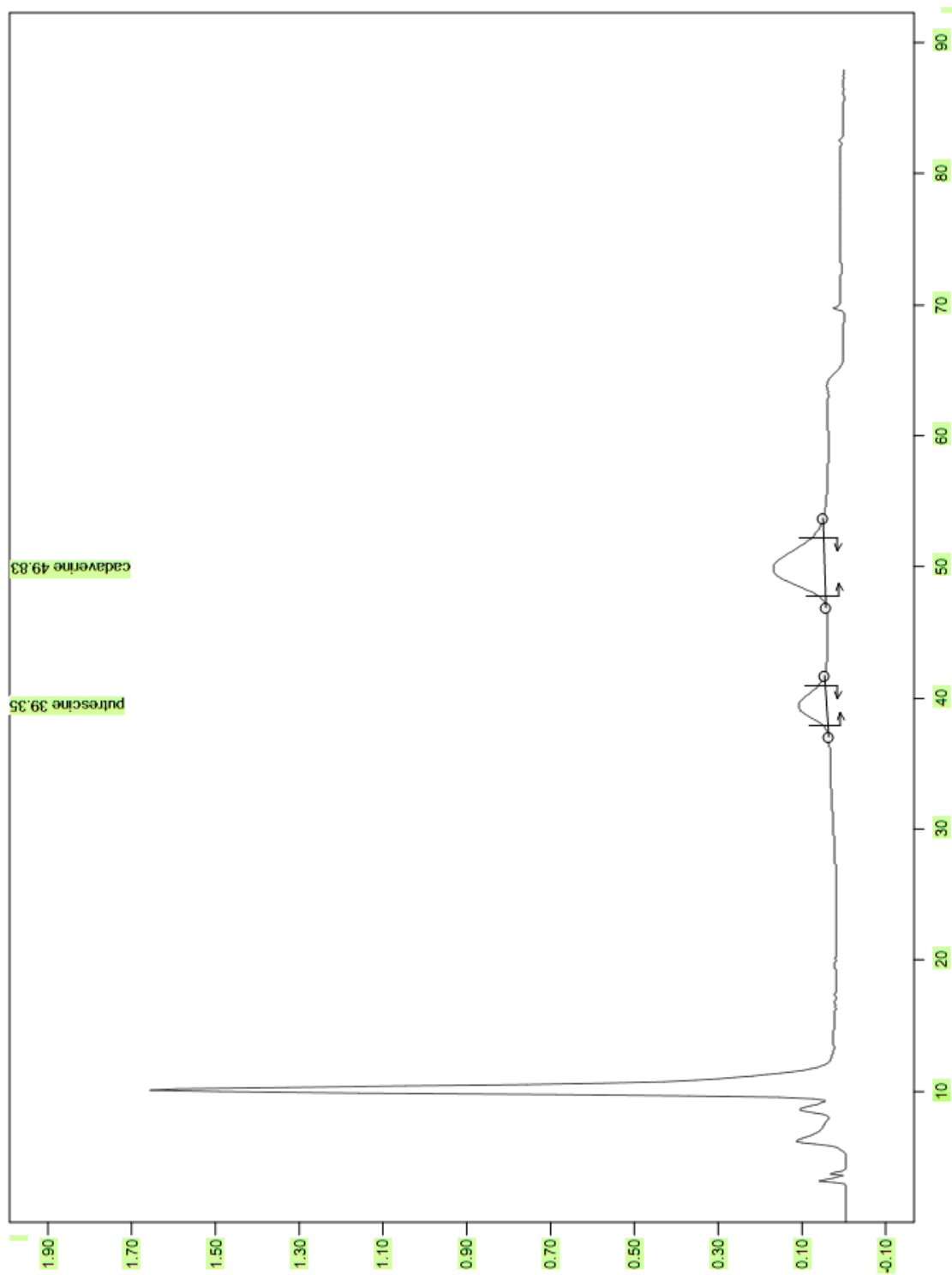
# PŘÍLOHA P IV: Chromatogram standardu biogenních aminů



**PŘÍLOHA P V: Chromatogram vzorku s ornitinem a s přidavkem 0,5 % glukózy**



**PŘÍLOHA P VI: Chromatogram vzorku bez ornitinů a s přidavkem  
0,75 % fruktózy**



## PŘÍLOHA P VII: Metabolismus sacharidů [73]

