

Disertační práce

## **Studium degradace biogenních aminů**

**Study of the biogenic amines degradation**

Autor: Mgr. Irena Butor

Studijní program: Chemie a technologie potravin (P2901)

Studijní obor: Technologie potravin (2901V013)

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

Zlín, červen 2023

© Irena Butor

Vydala **Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně** v edici **Doctoral Thesis Summary**.  
Publikace byla vydána v roce 2023

Klíčová slova: *biogenní aminy, histamin, tyramin, Bacillus subtilis, Bacillus pumilus, degradace, izolace*

Keywords: *biogenic amines, histamine, tyramine, Bacillus subtilis, Bacillus pumilus, degradation, isolation*

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

„Vzdělání je ta nejsilnější zbraň, kterou lze změnit svět.“

[Nelson Mandela]

#### Poděkování:

Na tomto místě bych v první řadě ráda poděkovala své školitelce, paní prof. RNDr. Leoně Buňkové, Ph.D. za její optimismus, neutuchající podporu, ochotu a čas, který mi věnovala během celého studia, za všechny připomínky a cenné rady, které mi dala. Rovněž bych chtěla poděkovat panu prof. Ing. Františku Buňkovi, Ph.D. za jeho cenné rady, vstřícnost a ochotu mi pomoci při sepisování nejen této práce. Velice děkuji paní prof. Ing. Miroslavě Kačániové, Ph.D. za pomoc s analýzami. Děkuji také paní Mgr. Petře Jančové, Ph.D. za ochotnou pomoc v závěru studia, Ing. Veronice Kučabové, Ing. Olze Vlčkové, Ing. et Ing. Ludmile Zálešákové a Lence Machálkové za pomoc v laboratořích. Ráda bych poděkovala i všem mým kolegům a přátelům z FT UTB za jejich humor a neustálou snahu člověka motivovat. V neposlední řadě bych ráda poděkovala svým rodičům a manželovi, kteří mě celou dobu podporovali, motivovali, a hlavně mi studium umožnili.

Tato práce vznikla za podpory grantu Grantové agentury ČR (GAČR No.17-09594S) a interních grantů Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně (IGA/FT/2014/005, IGA/FT/2015/012, IGA/FT/2016/012, IGA/FT/2017/003).

## ABSTRAKT

Disertační práce se zabývá izolací a identifikací mikroorganismů degradujících biogenní aminy a následným studiem kinetiky jejich rozkladu. Jednotlivé mikroorganismy byly získány analýzou komerčně dostupných potravin a potravin vyrobených v potravinářských laboratořích FT UTB. Tyto mikroorganismy byly následně identifikovány pomocí MALDI-TOF MS. Výsledky identifikace metodou MALDI-TOF byly verifikovány sekvenací části genu pro 16S rRNA. Cílem práce bylo *in vitro* studium schopnosti získaných a identifikovaných izolátů degradovat biogenní aminy za působení různých kombinací vnějších podmínek a kvantifikace snížení koncentrace biogenních aminů tryptaminu,  $\beta$ -fenylethylaminu, putrescinu, kadaverinu, histaminu a tyraminu. Základní schopnost degradace byla určena na základě schopnosti růstu v minerálním médiu s biogenními aminy jako jedinými zdroji uhlíku a dusíku. Izolované kmeny se schopností degradace jednoho a/nebo více biogenních aminů byly kultivovány v médiu obohaceném o příslušné biogenní aminy, derivatizovány a separovány za pomoci HPLC.

V experimentální části práce bylo analyzováno 895 vzorků potravin, ze kterých bylo izolováno 114 mikroorganismů degradujících biogenní aminy. Pomocí MALDI-TOF byly izoláty identifikovány. Ze všech testovaných izolátů bylo získáno 22 různých druhů mikroorganismů. Identifikace 13 vybraných mikroorganismů byla ověřena pomocí PCR a následnou sekvenací (16S rRNA). U izolátů *Acinetobacter pittii*, *Agrobacterium radiobacter*, *Bacillus altitudinis*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus safensis*, *Bacillus subtilis*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Micrococcus luteus*, *Pseudomonas koreensis*, *Pseudomonas fulva*, *Serratia marcescens*, *Serratia ureylitica* byla zjištěna významnější míra degradace biogenních aminů a byla pozorována schopnost degradovat všechny testované biogenní aminy v rozmezí 8-100 %. Nejvyšší míra degradační aktivity byla zaznamenána u kmene *Bacillus subtilis* IB23, u nějž byl dále sledován vliv vnějších podmínek na degradační aktivitu. Testované parametry kultivace (teplota, pH média, způsob kultivace) výrazně neovlivnily míru degradace a všechny biogenní aminy byly degradovány o více než 50 %. V další fázi práce byl porovnáván vliv vnějších faktorů (teplota, pH a typ média, koncentrace soli) na míru degradace u kmenů *Bacillus subtilis* IB23 a *Bacillus pumilus* IB26. Bylo zjištěno, že pH média v testovaném rozsahu výrazně neovlivňuje míru degradace v ani jednom z testovaných typů médií. Rozklad BA probíhal naopak v menší míře se zvyšující se koncentrací soli (0-3 % w/v) a snižující se teplotou. V nutrient broth bylo prokázáno, že míra degradace je závislá pouze na době kultivace při 30 °C. Srovnání degradace mezi kmeny *Bacillus subtilis* IB23 a *Bacillus pumilus* IB26 ukázalo, že *B. subtilis* IB23 efektivněji degraduje BA v minerálním médiu, *B. pumilus* IB26 naopak v nutrient broth.

## ABSTRACT

In the dissertation thesis we investigate the isolation and identification of microorganisms degrading biogenic amines and the study of the kinetics of their decomposition. Individual microorganisms were obtained by analyzing commercially available foods and foods produced in the food laboratories of FT UTB. These microorganisms were subsequently identified using MALDI-TOF MS. The results of the MALDI-TOF identification were verified by sequencing part of the 16S rRNA gene. The aim of the work was to study the ability of the obtained and identified isolates to degrade biogenic amines under the influence of various combinations of external conditions *in vitro* and to quantify the decrease in the concentration of biogenic amines tryptamine,  $\beta$ -phenylethylamine, putrescine, cadaverine, histamine and tyramine. The basic degradability was determined based on the ability to grow in a mineral medium with biogenic amines as the sole sources of carbon and nitrogen. Isolated strains with the ability to degrade one and/or more biogenic amines were cultured in a medium enriched with the appropriate biogenic amines, derivatized with dansyl chloride and separated using HPLC.

In the experimental part of the work, 895 food samples were analyzed, from which 114 microorganisms degrading biogenic amines were isolated. Using MALDI-TOF, the isolates were identified. 22 different types of microorganisms were obtained from all tested isolates. The identification of 13 selected microorganisms was verified using PCR and sequencing. In isolates of *Acinetobacter pittii*, *Agrobacterium radiobacter*, *Bacillus altitudinis*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus safensis*, *Bacillus subtilis*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Micrococcus luteus*, *Pseudomonas koreensis*, *Pseudomonas fulva*, *Serratia marcescens*, *Serratia ureylitica*, the degradation rate of biogenic amines was observed and the ability to degrade all tested biogenic amines in the range of 8-100 % was proved. The highest degree of degradation activity was recorded in the strain *Bacillus subtilis* IB23, in which the influence of external conditions on degradation activity was monitored. The tested cultivation parameters (temperature, pH medium, cultivation method) did not significantly affect the degradation rate and all biogenic amines were degraded by more than 50 %. In the next phase of the work, the influence of external factors (temperature, pH and type of medium, salt concentration) on the degree of degradation in *Bacillus subtilis* IB23 and *Bacillus pumilus* IB26 strains was compared. It was found that the pH of the medium in the tested range does not significantly affect the rate of degradation in any of the tested types of media. On the contrary, BA decomposition was lower with increasing salt concentration (0-3 % w/v) and decreasing temperature. In nutrient broth, it was demonstrated that the rate of degradation is dependent only on the time of cultivation at 30 °C. Comparison of degradation between *Bacillus subtilis* IB23 and *Bacillus pumilus* IB26 strains

showed that *B. subtilis* IB23 degrades BA more efficiently in mineral medium, *B. pumilus* IB26 on the contrary in nutrient broth.

# OBSAH

<b>ABSTRAKT</b> .....	<b>4</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>5</b>
<b>1. SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY</b> .....	<b>9</b>
1. 1. DEKARBOXYLACE AMINOKYSELIN .....	11
1. 2. KLINICKÉ ASPEKTY A TOXIKOLOGIE .....	12
1. 2. 1. Toxické působení histaminu .....	14
1. 2. 2. Toxické působení tyraminu, $\beta$ -fenylethylaminu a tryptaminu .....	16
1. 2. 3. Toxické působení putrescinu a kadaverinu .....	16
1. 2. 4. Biogenní aminy jako karcinogeny .....	17
1. 3. VÝSKYT BIOGENNÍCH AMINŮ V POTRAVINÁCH .....	18
1. 3. 1. Rybí maso a rybí produkty.....	21
1. 3. 2. Maso a mléčné výrobky .....	21
1. 3. 3. Sýry a mléčné produkty .....	23
1. 3. 4. Ostatní fermentované potraviny .....	24
1. 3. 5. Alkoholické nápoje .....	25
1. 3. 6. Čerstvé ovoce, zelenina a další .....	26
1. 4. KONZERVACE POTRAVIN .....	26
1. 5. MOŽNOSTI SNÍŽENÍ BIOGENNÍCH AMINŮ V POTRAVINÁCH .....	29
1. 5. 1. Změna pH.....	29
1. 5. 2. Změna koncentrace NaCl.....	29
1. 5. 3. Změna teploty .....	30
1. 5. 4. Změna tlaku .....	30
1. 5. 5. Vliv ionizujícího záření .....	31
1. 5. 6. Aplikace potravinářských přídatných látek .....	32
1. 5. 7. Použití startérových kultur .....	33
1. 5. 8. Adsorbce .....	33
1. 6. AMINOXIDÁZY .....	34
1. 6. 1. Aminoxidázy obsahující měď (CuAO).....	34
1. 6. 2. Monoaminoxidázy obsahující flavin (MAO) .....	35
1. 6. 3. Multicopperoxidázy (MCO) .....	35
1. 7. DETEKCE A KVANTIFIKACE BIOGENNÍCH AMINŮ .....	36
1. 8. MIKROORGANISMY DEGRADUJÍCÍ BIOGENNÍ AMINY .....	38
<b>2. CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE</b> .....	<b>42</b>
<b>3. MATERIÁL A METODIKA</b> .....	<b>43</b>
3. 1. MATERIÁL .....	43
3. 1. 1. Použité mikroorganismy .....	43
3. 1. 2. Kultivační média, chemikálie a roztoky .....	44
3. 1. 3. Laboratorní přístroje a pomůcky .....	47
3. 2. ZVOLENÁ METODIKA A POSTUP ZPRACOVÁNÍ.....	47

3. 2. 1. Skríníng a izolace .....	48
3. 2. 2. Stanovení biochemických charakteristik jednotlivých kmenů.....	49
3. 2. 3. Metoda hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF.....	49
3. 2. 4. Sekvenování kmenů schopných degradovat biogenní aminy .....	49
3. 2. 5. Sledování kinetiky degradace biogenních aminů.....	50
3. 2. 6. Detekce biogenních aminů metodou HPLC.....	52
3. 2. 7. Statistické metody .....	53
<b>4. VÝSLEDKY .....</b>	<b>54</b>
4. 1. EXPERIMENT I – SKRÍNING MIKROORGANISMŮ NA SCHOPNOST DEGRADACE BIOGENNÍCH AMINŮ .....	54
4. 1. 1. Identifikace pomocí MALDI-TOF.....	54
4. 1. 2. Identifikace pomocí sekvenace genu pro 16S rRNA .....	56
4. 2. EXPERIMENT II – MÍRA DEGRADACE BIOGENNÍCH AMINŮ .....	56
4. 3. EXPERIMENT III – DEGRADACE BIOGENNÍCH AMINŮ KMENEM <i>BACILLUS SUBTILIS</i> IB23 V ZÁVISLOSTI NA VNĚJŠÍCH PODMÍNKÁCH .....	60
4. 4. EXPERIMENT IV – SROVNÁNÍ DEGRADACE BIOGENNÍCH AMINŮ KMENY <i>BACILLUS SUBTILIS</i> IB23 A <i>BACILLUS PUMILUS</i> IB26 V ZÁVISLOSTI NA VNĚJŠÍCH PODMÍNKÁCH .....	68
4. 4. 1. Kinetika degradace biogenních aminů kmenem <i>Bacillus subtilis</i> IB23 .....	69
4. 4. 2. Kinetika degradace biogenních aminů kmenem <i>Bacillus pumilus</i> IB26 .....	85
<b>5. SOUHRNNÁ DISKUZE .....</b>	<b>104</b>
<b>6. ZÁVĚR .....</b>	<b>112</b>
<b>7. PŘÍNOS PRO VĚDU A PRAXI.....</b>	<b>114</b>
<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....</b>	<b>115</b>
<b>SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....</b>	<b>138</b>
<b>SEZNAM TABULEK A OBRÁZKŮ .....</b>	<b>139</b>
<b>CURRICULUM VITAE .....</b>	<b>143</b>
<b>SEZNAM PUBLIKACÍ .....</b>	<b>144</b>



# 1. SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

Biogenní aminy (BA) jsou dusíkaté organické báze o nízké molekulové hmotnosti, přirozeně se vyskytující v živých systémech jako meziprodukty a produkty metabolismu aminokyselin (AMK) a proteinů (Iversen et al., 2012). Tyto sloučeniny lze podle chemické struktury rozdělit na aromatické ( $\beta$ -fenylethylamin a tyramin), alifatické (putrescin, kadaverin, spermidin a spermin) a heterocyklické (histamin a tryptamin) (Tab. 1). Podle počtu aminoskupin v molekule je možné biogenní aminy klasifikovat jako monoaminy - histamin, tyramin a tryptamin; diaminy – putrescin a kadaverin a polyaminy - spermin, spermidin a agmatin (Silla Santos, 1996; Önal, 2007; Stadnik a Dolatowski, 2010).

Tab. 1. Charakteristika hlavních biogenních aminů (podle Nuñez a Medina, 2011)

Amin	Chemický název	Sumární vzorec	Klasifikace
Tyramin	4-(2-aminoethyl)phenol	C <sub>8</sub> H <sub>11</sub> NO	aromatický, monoamin
Fenylethylamin	phenylethan-2-amine	C <sub>8</sub> H <sub>11</sub> N	aromatický, monoamin
Histamin	2-(1H-imidazol-4-yl)ethanamin	C <sub>5</sub> H <sub>9</sub> N <sub>3</sub>	heterocyklický, monoamin
Tryptamin	2-(1H-indol-3-yl)ethanamin	C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub>	heterocyklický, monoamin
Kadaverin	pentan-1,5-diamin	C <sub>5</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub>	alifatický, diamin
Putrescin	butan-1,4-diamin	C <sub>4</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub>	alifatický, diamin
Spermidin	N-(3-aminopropyl)butan-1,4-diamin	C <sub>7</sub> H <sub>19</sub> N <sub>3</sub>	alifatický, polyamin
Spermin	N-N'-bis(3-aminopropyl)butan-1, 4-diamin	C <sub>10</sub> H <sub>26</sub> N <sub>4</sub>	alifatický, polyamin
Agmatin	1-(4-aminobutyl)guanidin	C <sub>5</sub> H <sub>14</sub> N <sub>4</sub>	alifatický, polyamin

Biogenní aminy jsou syntetizovány a degradovány během normálního metabolismu živočichů, rostlin a mikroorganismů. Vznikají především dekarboxylací jednotlivých AMK nebo aminací a transaminací aldehydů a ketonů. Biogenní aminy hrají důležitou roli v mnoha lidských fyziologických funkcích, jako je mozková aktivita, sekrece žaludeční kyseliny, imunitní reakce (Shalaby, 1996) či buněčný růst a diferenciací (Ladero et al., 2010). Díky činnosti mikroorganismů a jejich metabolické aktivitě se mohou BA ve vysokých koncentracích akumulovat v potravinách. Zvýšená hladina BA může zapříčinit

kažení zejména nefermentovaných potravin a jejich přítomnost tak může sloužit jako indikátor kvality a čerstvosti daných potravin (Gardini et al., 2016; Durak-Dados et al., 2020; Dabadé et al., 2021). Nadměrný perorální příjem BA může způsobit zdravotní potíže. Možné zdravotní komplikace se týkají především citlivých jedinců, jejichž detoxikační systémy pracují méně dobře (Bodmer et al., 1999). U těchto jedinců jsou příčinou genetická alterace, alergie, nadměrný příjem alkoholu a/nebo užívání některých druhů antidepresiv (Alvarez a Moreno-Arribas, 2014; Jairath et al., 2015), jako jsou inhibitory monoaminoxidázy (Hernandez-Jover et al., 1997; Yongmei et al., 2009), léků používaných pro léčbu Alzheimerovy a Parkinsonovy choroby, případně léků proti bolesti (Mohedano et al., 2015). Vzhledem k možným nepříznivým účinkům BA na lidské zdraví, je potřeba zabránit jejich hromadění v potravinách (EFSA, 2011).

Potraviny, které mohou často obsahovat vysoké hladiny BA, jsou ryby, výrobky z ryb a fermentované produkty (ten Brink et al., 1990; Halász et al., 1994; Linares et al., 2011; Fusek et al., 2020). Jednou z nejčastějších fermentovaných potravin spojených s otravou BA jsou sýry. Pro označení intoxikace tyraminem se dokonce používá termín „cheese reaction“ (ten Brink et al., 1990). V sýru byly také zaznamenány koncentrace BA vyšší než 1 g/kg, a to nejčastěji zvýšené koncentrace tyraminu a histaminu. Tyto aminy se zároveň vyskytují nejhojněji ze všech BA (Stratton et al., 1991; Fernández et al., 2007a), podle stanoviska EFSA se současně jedná o nejvíce toxické BA. Jejich toxicita může být pak dále umocňována přítomností jiných BA (EFSA, 2011), nejčastěji kadaverinem a putrescinem (Ladero et al., 2010). Pro snížení produkce a následné akumulace BA v potravinách byly navrženy různé strategie, jako je například inhibice bakterií produkujících BA (např. přidáním siřičitanu do vína), snížení viability producentů BA, např. pomocí pasterizace mléka, které má být použito při výrobě sýrů, snížení proteolytické aktivity (tedy snížení dostupnosti aminokyselinových prekurzorů biogenních aminů) atd. Dalším z možných způsobů, jak snížit obsah BA v potravinách, je jejich přímé odstranění ze suroviny pomocí mikroorganismů. Je známo, že například někteří zástupci rodů *Brevibacterium*, *Lactobacillus* a dalších mléčných tyčinek\*, *Pediococcus* a *Micrococcus* jsou schopni BA degradovat a snížit tak jejich koncentraci v potravinách (Herrero-Fresno et al., 2012).

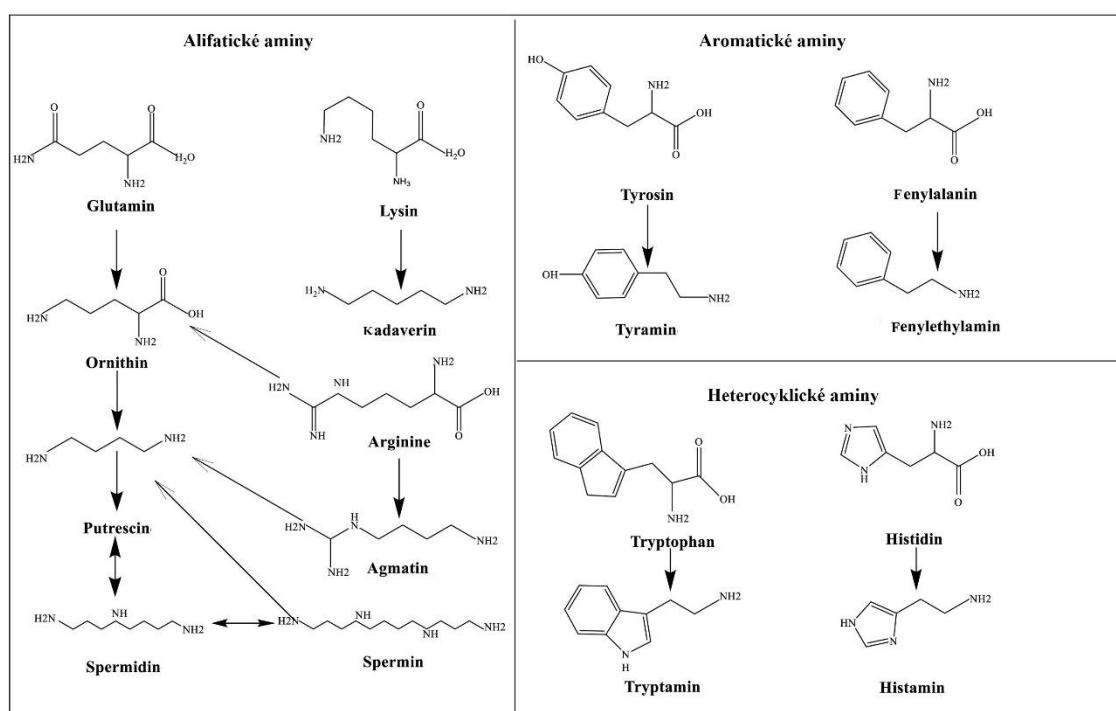
Přestože akumulace BA v potravinách představuje významné zdravotní riziko, evropská legislativa stanovuje limity definující pouze maximální obsah histaminu, 100 mg/kg. Tato hodnota je navíc dle Nařízení Komise (ES) č. 2073/2005, ve znění pozdějších předpisů stanovena pouze pro ryby a produkty rybolovu.

---

\* Starší studie používají shodně rodový název *Lactobacillus*, k poměrně rozsáhlým změnám v taxonomii mléčných tyčinek došlo po roce 2020. Předložený text využívá pojmenování mikroorganismů dle současně platné nomenklatury (Zheng et al., 2020; <https://www.bacterio.net/>).

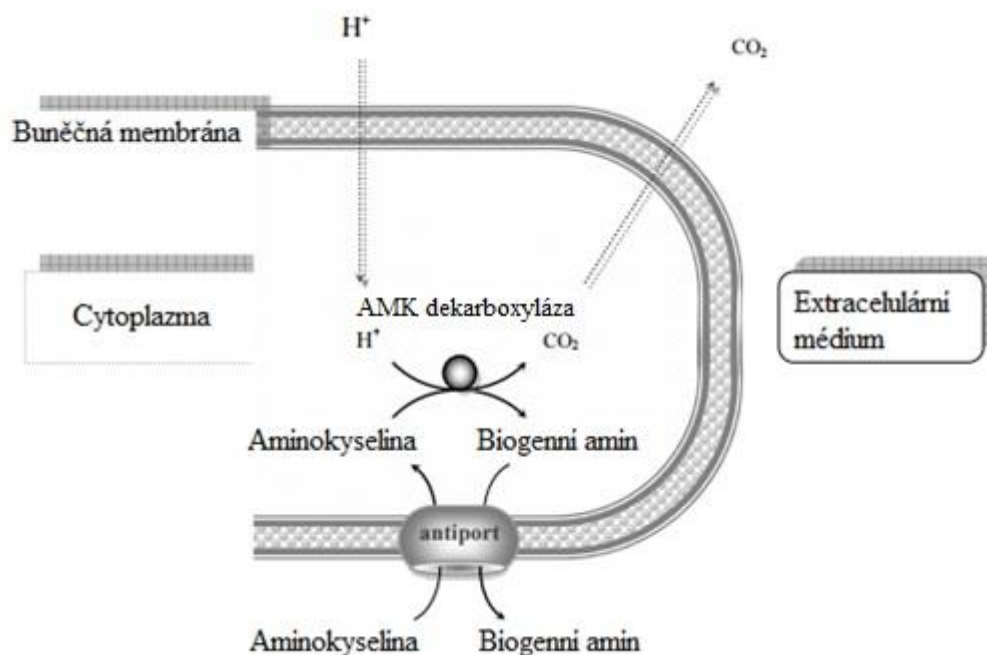
## 1. 1. Dekarboxylace aminokyselin

Hromadění biogenních aminů v potravinách je obvykle výsledkem dekarboxylace volných aminokyselin enzymy bakteriálního původu. Tuto metabolickou dráhu mikroorganismům zajišťuje přítomnost substrátově specifického enzymu – bakteriální dekarboxylázy (Obrázek 1). Tyto enzymy jsou důležité pro řadu metabolických funkcí včetně zmíněné dekarboxylace aminokyselin (Suzuki et al., 1991).



Obr. 1: Struktura biogenních aminů a jejich prekurzory (podle Li, Lu, 2020).

Dekarboxylázy náleží do skupiny enzymů, které využívají jako kofaktor pyridoxal-5-fosfát (PLP). Na tento kofaktor se následně váže konkrétní L-aminokyselina za tvorby Schiffovy báze. Kationty dusíku pyridinového kruhu odtahují elektrony z  $C_{\alpha}$  uhlíku L-aminokyseliny a vytváří tak kladný mezomerní efekt. Zároveň dochází k destabilizaci vazeb vycházejících z  $C_{\alpha}$  uhlíku a k odštěpení  $CO_2$ . K ustálení mezomerního stavu pak dochází prostřednictvím adice jednoho protonu na  $C_{\alpha}$  a následnou hydrolýzou Schiffovy báze na primární amin (Shalaby, 1996; Karovičová a Kohajdová, 2005, Purevdorj, 2021). Takto vzniklé biogenní aminy jsou pak dále vyloučeny z cytoplazmy buňky pomocí antiportu s normální aminokyselinou v buněčné membráně (Obr. 2). Přítomnost antiportu pro histidin (histidin $\uparrow$ ↓histamin) byla pozorována u *Lentilactobacillus buchneri* (dříve *Lactobacillus buchneri*) ST2A (Molenaar et al., 1993), *Levilactobacillus brevis* (dříve *Lactobacillus brevis*) - antiport pro tyramin (Wolken et al., 2006) a *Escherichia coli* - antiport pro kadaverin a putrescin (Soksawatmaekhin et al., 2004; Purevdorj, 2021).



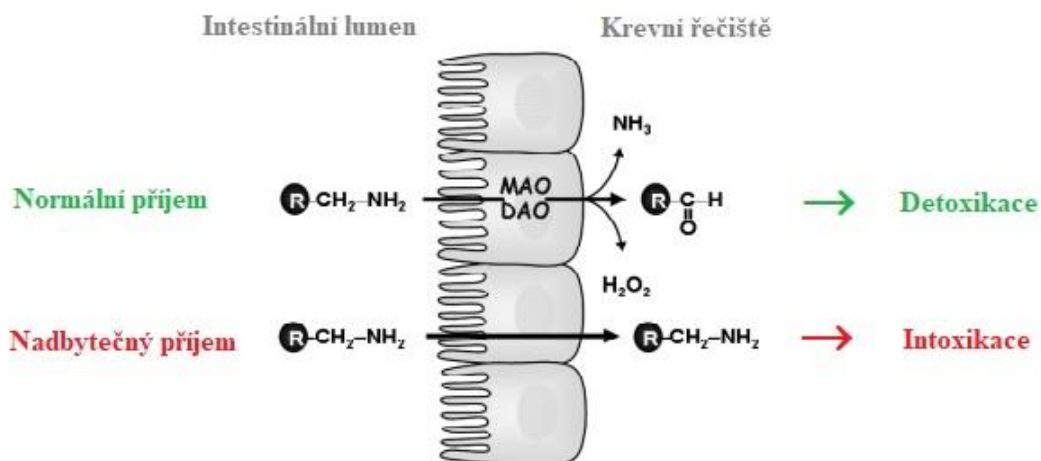
Obr. 2: Syntéza BA a jejich transport přes buněčnou membránu (podle EFSA, 2011)

Je dobře známo, že dekarboxylázová aktivita mikroorganismů je velmi proměnlivá, přičemž ve většině případů je druhově specifická. Detekce těchto bakterií je tedy důležitá k odhadu obsahu BA v potravinách a s tím spojených rizik a snahou o zabránění jejich akumulace ve fermentovaných potravinách (Martinez et al., 2011; Postollec et al., 2011).

## 1. 2. Klinické aspekty a toxikologie

Biogenní aminy jsou přírodní antinutriční faktory a jsou důležité z hygienického a toxikologického hlediska, neboť jsou identifikovány jako původci řady otrav jídlem a jsou také schopny iniciovat různé farmakologické reakce. Histamin, putrescin, kadaverin, tyramin, tryptamin,  $\beta$ -fenylethylamin, spermin a spermidin jsou považovány za nejdůležitější biogenní aminy vyskytující se v potravinách. Tyto aminy jsou označeny jako biogenní, protože jsou vytvořeny působením živých organismů (Shalaby, 1996). Vztah mezi úrovní BA a otravami jídlem byl široce studován a bylo zjištěno, že intoxikace histaminem a tyraminem jsou dvěma nejčastěji hlášenými potravinovými intoxikacemi (EFSA, 2011). Lidé běžně konzumují potraviny s určitým množstvím BA, tyto jsou detoxikovány ve střevní sliznici enzymatickými reakcemi (oxidázami) (Obr. 3). Při nadměrném perorálním příjmu BA může zvýšená koncentrace těchto látek vyvolat v organismu řadu nežádoucích účinků, jako jsou nevolnost, střevní problémy, alergie, bolest hlavy, vyrážku a změny krevního tlaku (Ladero et al., 2010). Výjimečně může nastat hypertenze, způsobující nevratné poškození srdce nebo centrálního nervového systému

(Alvarez, Moreno-Arribas, 2014). V mnohých případech potravinových otrav je jako původce označován právě histamin, zatímco tyramin a  $\beta$ -fenylethylamin byly označeny jako iniciátory hypertenzní krize. Histamin, tryptamin,  $\beta$ -fenylethylamin a tyramin mají významné fyziologické účinky na člověka, obvykle buď psychoaktivní nebo vazoaktivní. Psychoaktivní aminy ovlivňují nervový systém působením na neurotransmitery, zatímco vazoaktivní aminy působí na vaskulární systém (Lovenberg, 1973).



Obr. 3: Cesta přijatých biogenních aminů v intestinálním traktu člověka (podle Pleva, 2017, Taylor a Speckhard, 1983; Lehane a Olley, 2000).

\* MAO/DAO – monoamino/diaminoxidáza

Konzumace potravin obsahujících biogenní aminy zodpovídá za mnoho fyziologických efektů (Tab. 2), které mohou vést k několika typům alimentárních onemocnění, včetně otravy histaminem a tyraminem. Toxické působení BA na organizmus bylo zaznamenáno i u kuřat, kde byla popsána výrazná ztráta hmotnosti, u těžkých intoxikací byla hlášena i zvýšená mortalita. Škodlivé účinky vyplývající ze zvýšené konzumace potravin bohatých na biogenní aminy lze očekávat pouze tehdy, když jsou tyto látky schopny dostat se do krevního řečiště (Joosten, 1988). Biogenní aminy byly také studovány jako karcinogenní prekurzory (Shalaby, 1996).

Tab. 2: Biogenní aminy a jejich fyziologické a farmakologické účinky na organismus (podle Shalaby, 1996)

Amin	Fyziologické a farmakologické účinky
Histamin	Uvolnění adrenalinu a noradrenalinu Podráždění hladkých svalů dělohy, střeva a dýchací soustavy Stimulace senzorických i motorických neuronů Řízení sekrece žaludeční kyseliny
Tyramin	Periferní vazokonstrikce Zvýšení srdeční činnosti Zvýšení dýchací frekvence Zvýšení hladiny cukru v krvi Uvolňování noradrenalinu ze sympatiku Původce migrén
Putrescin a kadaverin	Hypotenze Bradykardie Křeče žvýkacího svalu Paréza končetin Zesílení toxicity jiných aminů
β-fenylethylamin	Uvolňování noradrenalinu ze sympatiku Zvýšení krevního tlaku Původce migrén
Tryptamin	Zvýšení krevního tlaku

### 1. 2. 1. Toxické působení histaminu

Ačkoli je endogenní histamin produkován v lidském těle různými tkáněmi a buňkami (mozkové neurony, krvinky a žírné buňky/mastocyty) a je důležitý pro realizaci mnoha fyziologických funkcí, jako je neurotransmise, regulace buněčného růstu, syntéza nukleových kyselin a proteinů, vývoj mozku a růst a regenerace nervů (Kalač a Krausová, 2005; Onal, 2007), může kromě mutagenních a karcinogenních účinků mít nepříznivý efekt na zdravotní stav člověka včetně intoxikace (Chen et al., 2010).

Histaminová intoxikace je způsobena konzumací histaminu v množství, které nemůže být detoxikováno normálními metabolickými mechanismy zdravých konzumentů, nebo i když je konzumován v relativně nízkém množství, zejména u osob trpících nedostatkem diaminoxidázy (DAO) odpovědné za detoxikaci histaminu. Přítomnost inhibitorů DAO je označována jako histaminová intolerance, při které se histamin hromadí v plazmě, a projevuje své nepříznivé zdravotní účinky (Sallam et al., 2021). Tato intolerance pak způsobuje četné příznaky, které se mohou projevovat jako alergická reakce, a to i po požití velmi malého množství BA, které je obvykle u zdravých jedinců tolerováno

(Maintz a Novák, 2007). Intoxikace histaminem se začíná projevovat v rozmezí od několika minut až do několika hodin po jeho konzumaci a její příznaky obvykle po dalších několika hodinách samovolně vymizí. Ve výjimečných případech mohou symptomy přetrvávat déle než 24 hodin (Hungerford, 2010). Je dobře známo, že otrava histaminem je většinou spojena s konzumací ryb a mořských plodů, proto se nazývá jako „otrava scombroid“ nebo „histaminová otrava z ryb“ kvůli souvislosti s konzumací ryb z čeledi *Scombridae* a *Scomberesocidae* (Rodriguez et al., 2014; Souza et al., 2015). Tyto druhy obecně obsahují ve svém těle vysokou koncentraci volného histidinu (až 5–20 g/kg), ten je vlivem působení bakteriálních dekarboxyláz transformován na histamin, který se zde kumuluje (Feng et al., 2016). To vedlo ke zvýšení zájmu vědců o výzkum o studium těchto potravin (Sallam et al., 2021). Se zvyšujícím se počtem dalších studií roste zájem o detekci obsahu histaminu v rybách a rybích produktech, aby byla zajištěna bezpečnost a kvalita těchto potravin (Chen et al., 2010; FDA, 2014). Histaminová intoxikace je charakterizována symptomy podobnými alergii včetně bolestí hlavy, nevolnosti, zvracení, průjmů, kopřivky, svědění a hypotenze. Závažnost symptomů se liší v závislosti na několika faktorech, ale ve většině případů je intoxikace mírná a pouze několik případů může vyžadovat lékařskou péči (Onal, 2007). Další příznaky otravy histaminem jsou nejčastěji spojeny s působením na krevní cévy a hladké svaly. Takovými typickými příznaky mohou být bolesti hlavy, zvýšená nosní sekrece, bronchospasmus, tachykardie, extrasystola, hypotenze, edém očních víček, kopřivka, svědění, zarudnutí obličeje a krku a astma (Jarisch, 2004; Maintz a Novák, 2007). Histamin přijatý v potravě rovněž hraje roli v patogenezi migrén u citlivých jedinců, kteří trpí nedostatkem DAO (Maintz a Novák, 2007). Tento jev byl popsán u pacientů, kteří trpěli migrénami a konzumovali potraviny bohaté na histamin, které jim způsobovaly silné bolesti hlavy, které byly zmírněny dietou skládající se z potravin s minimálním obsahem histaminu (Wantke et al., 1993).

Otrava histaminem v souvislosti s konzumací ryb je nejčastěji hlášena v Japonsku a Spojeném království. Největší ohnisko otrav, které kdy bylo zaznamenáno, zahrnovalo 2656 osob, a bylo zdokumentováno v Japonsku v roce 1973 (Feng et al., 2016). V USA bylo v letech 1998 až 2008 zaznamenáno 333 případů otrav, které vedly k 59 hospitalizacím. V letech 2009 až 2012 bylo hlášeno 40 ohnisek zahrnujících 136 osob, tyto zaznamenané případy vedly k jedné hospitalizaci (Feng et al., 2016). Histaminové otravy byly hlášeny také v Austrálii, Kanadě, Číně, Egyptě, Francii, Německu, Švédsku, Švýcarsku, Itálii a také v mnoha dalších zemích (Sallam et al., 2021; Feng et al., 2016). V letech 2010–2016 bylo oficiálně hlášeno 221 ohnisek otravy histaminem ze zemí EU. Nejčastější příčinou otravy byla opět konzumace ryb a produktů rybolovu a také sýrů (EFSA, 2017). Aktuální data EFSA a Evropského střediska pro prevenci a kontrolu nemocí (ECDC) ukazují, že v roce 2017 došlo ve srovnání s předchozím rokem k 22% nárůstu ohnisek histaminových otrav. V roce 2017 bylo zaznamenáno 117 ohnisek intoxikace histaminem, které zahrnovalo

572 osob, 9 % těchto osob vyžadovalo hospitalizaci. Nebylo však zaznamenáno žádné úmrtí (EFSA 2017, ECDC 2018).

### **1. 2. 2. Toxické působení tyraminu, $\beta$ -fenylethylaminu a tryptaminu**

Tyramin,  $\beta$ -fenylethylamin a tryptamin se v lidském těle běžně nachází ve stopovém množství, proto jsou občas nazývány „stopovými aminy“. V lidském organismu hrají tyto BA důležitou roli jako neurotransmitery a neuromodulátory (Narang et al., 2011). Vazokonstrikční efekt tyraminu,  $\beta$ -fenylethylaminu a tryptaminu způsobuje hypertenzi, ale byly popsány i další příznaky, jako jsou bolesti hlavy, pocení, zvracení, rozšíření zornic apod. Intoxikace tyraminem byla poprvé spojena s konzumací sýra (odtud termín „cheese reaction“). Obecně jsou právě sýry potravinou, která může obsahovat vysoké koncentrace tyraminu. V případě intoxikace se klinické příznaky objevují v rozmezí od 30 minut do několika málo hodin po konzumaci potravin s vysokým obsahem těchto biogenních aminů a obvykle odezní během několika hodin. Jedinec se obvykle zcela zotaví v průběhu 24 hodin. Ve vědeckých studiích a databázích o potravinových a lékových interakcích, zejména s léky obsahujícími inhibitory monoaminoxidázy, byly zaznamenány případy hypertenzní krize a v malém množství případů také migrény způsobené konzumací potravin potenciálně bohatých na tyramin (Stockley's Drug Interactions, 2011). Bylo popsáno, že koncentrace tyraminu vyšší než 125 mg/kg nemá na zdravé jedince negativní účinky, avšak pro pacienty léčené inhibitory MAO je potenciálně toxická koncentrace už od 6 mg/kg (McCabe-Sellers, 1986). Abnormálně vysoké hladiny tyraminu v mozkové tkáni jsou spojovány s depresí, schizofrenií, Parkinsonovou chorobou a Reyeovým syndromem (Ladero et al., 2010). Kromě toxikologických účinků mohou tyto BA působit i na střevní mikrobiotu. Je například známo, že tyramin zvyšuje adheenci enteropatogenní *E. coli* O157H k epiteliálním buňkám (Lyte, 2004).

### **1. 2. 3. Toxické působení putrescinu a kadaverinu**

Putrescin a kadaverin se významnou měrou podílejí na mnoha fyziologických funkcích, jako jsou regulace genové exprese, buněčný růst a buněčná diferenciaci (Alvarez a Moreno-Arribas, 2014). Farmakologické účinky putrescinu a kadaverinu se zdají být méně významné než u histaminu a tyraminu. Mezi popsané nežádoucí účinky se řadí zejména hypotenze, tachykardie, křeče žvýkacích svalů a paréza končetin (Shalaby, 1996; Halász a Baráth, 2002). Jedním z nejdůležitějších aspektů v otázce intoxikace putrescinem a kadaverinem je schopnost zesílení toxicity jiných aminů, obzvláště histaminu (Chu a Bjeldanes, 1981; Hui a Taylor, 1985). Tyto diaminy mohou navíc reagovat s dusitany za vzniku karcinogenních nitrosaminů (Nebelin et al., 1980). V posledních letech přibývá důkazů, že putrescin by mohl hrát roli v podpoře maligní transformace buněk. Buňky kolorektálního karcinomu mají



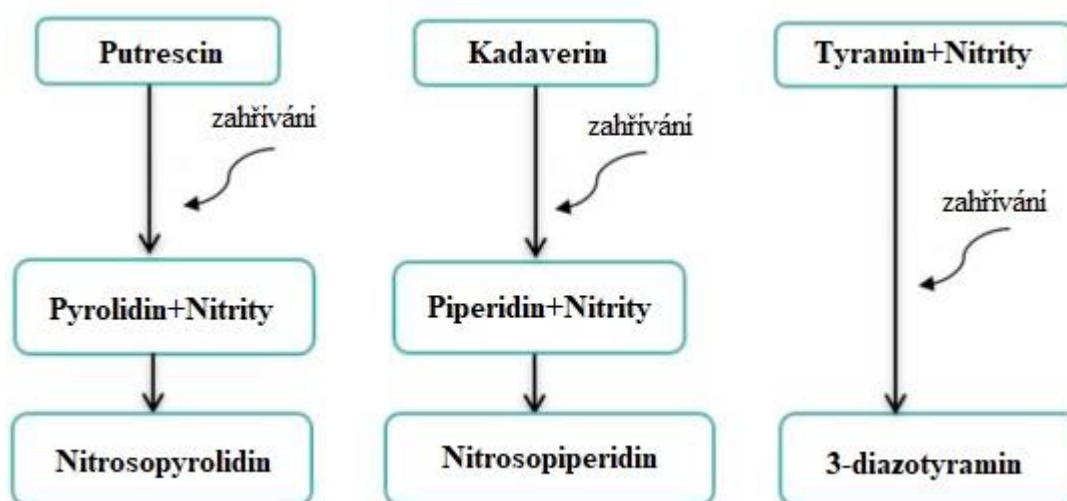
vyšší obsah polyaminů než přilehlá sliznice nebo ekvivalentní normální tkáň (Wallace a Caslake, 2001). Zvýšené koncentrace putrescinu byly také detekovány u karcinomů žaludku způsobených *Helicobacter pylori* a tento amin je také spojován s faktory virulence grampozitivních a gramnegativních patogenů (Shah a Swiatlo, 2008). Výjimkou nejsou potraviny, které jsou často kontaminovány více než jedním BA. Dalším důležitým problémem, který vyžaduje další výzkum, jsou jejich synergické účinky. Je známo, že putrescin a kadaverin hrají roli jako inhibitory diaminoxidázy, a proto působí jako zesilovače histaminové toxicity (Lehane a Olley, 2000).

#### 1. 2. 4. Biogenní aminy jako karcinogeny

Biogenní aminy mohou být rovněž považovány za karcinogeny, protože jsou prekurzory karcinogenních a mutagenních N-nitrososloučenin a jsou schopny dobře reagovat s dusitany a tvořit tak potenciálně karcinogenní nitrosaminy (Fong et al., 2021).

Nitrosaminy jsou karcinogenní pro různé druhy živočichů a představují potenciální riziko pro zdraví člověka a domácích zvířat, která jsou krmena krmivý obsahujícími dusitany (Ender et al., 1964). N-nitrosaminy jsou ve většině případů silně karcinogenní a lze je nalézt v prostředí a v široké škále potravin. Vznikají reakcí mezi nitrosačním činidlem a sekundárním aminem, vznik těchto sloučenin může být výsledkem chemické reakce nebo mikrobiální aktivity (Park et al., 2015), jak je znázorněno na Obr. 4. V masných výrobcích se N-nitrosaminy vyskytují v důsledku použití dusitanů a dusičnanů přidaných do potravin. Dusitany ( $\text{KNO}_2/\text{E249}$  a  $\text{NaNO}_2/\text{E250}$ ) a nepřímo dusičnany ( $\text{NaNO}_3/\text{E251}$  a  $\text{KNO}_3/\text{E252}$ ) jsou konzervační látky běžně používané ke zpomalení oxidace lipidů, k inhibici růstu nežádoucích a patogenních bakterií (např. *Clostridium botulinum*). Přídavek dusitanů a dusičnanů do masných výrobků je omezen na 150 mg/kg (Park et al., 2015) a 100 mg/kg u sterilovaných masných výrobků (EFSA, 2017b). Je třeba poznamenat, že tyto sloučeniny poskytují daným potravinám specifické organoleptické vlastnosti (chuť), stabilitu (červená barva) a mikrobiologickou bezpečnost. Dusitany mají baktericidní a bakteriostatické účinky proti patogenním bakteriím (Majou a Christieans, 2018). Na základě epidemiologických studií Světová zdravotnická organizace nedávno uvedla, že zvýšené riziko karcinogenity je spojeno s vysokou spotřebou zpracovaného masa, zejména v zemích s nízkými a středními příjmy, což je pravděpodobně připisováno karcinogenním chemikáliím, jmenovitě N-nitrososloučeninám a polycyklickým aromatickým uhlovodíkům při zpracování masa (WHO, 2015). N-nitrososloučeniny byly identifikovány jako důležité dietární karcinogeny vyvolávající nádory u lidí. Tyto sloučeniny jsou často zodpovědné za nasofaryngeální karcinom (NPC), což je nádor vycházející z epiteliálních buněk vystýlajících nosohltan. Incidence a úmrtnost NPC je v západních zemích relativně nízká, ale byl zaznamenán jako častá malignita mezi kantonskými obyvateli v centrální oblasti provincie Guangdong, včetně jižní Číny

a Hongkongu, následovaných Tchaj-wanem, Malajsií, Vietnamem, Guamem atd. Proto je NPC známý jako „kantonský nádor“ (Yu a Yuan 2002; Fong et al., 2021).



Obr. 4: Nitrosační proces u putrescinu, kadaverinu a tyraminu (podle Vasconcelos et al., 2021)

### 1. 3. Výskyt biogenních aminů v potravinách

U čerstvých a fermentovaných produktů a u produktů živočišného a rostlinného původu jsou typy nalezených BA a také jejich koncentrace různé. Tyto odchylky lze odůvodnit typem zpracování, dostupností a typem aminokyselin přítomných v potravine, podmínkami, dobou a teplotou skladování, typem balení a přítomností dekarboxyláza pozitivních mikroorganismů. V důsledku dekarboxylace aminokyselin mikroorganismy během fermentace je koncentrace BA ve fermentovaných potravinách (sýry, pivo, sójová omáčka atd.) obecně vyšší než v potravinách nefermentovaných (zelenina, ovoce, maso atd.) (Wojcik et al. 2020). Tab. 3 uvádí údaje o BA v různých potravinách (Vasconcelos et al., 2021).

Obsah BA v různých potravinách a krmivech byl studován mnoha vědci a bylo již zmíněno, že jejich nejčastější výskyt byl pozorován u sýrů, ryb (např. sardinky, ančovičky a sledi), masných výrobků, dále byla přítomnost těchto látek zaznamenána u vajec, ovoce, zeleniny (Ramos et al., 2009; Figueiredo et al., 2013; Vasconcelos et al., 2021) a hub (Kalač a Křížek, 1997; Dadáková et al., 2009b). Fermentované potraviny jsou náchylnější k vyššímu obsahu BA. Fermentace je přirozená metoda používaná k výrobě potravin s jedinečnými organoleptickými vlastnostmi, jako jsou barva, chuť a konzistence, které spotřebitelé preferují. Navzdory výhodám tohoto způsobu zpracování potravin může vést fermentace k tvorbě toxických látek, mezi které patří BA. Fermentace

je založena na aktivitě mikroorganismů, kdy jsou BA produkovány několika kvasinkovými a bakteriálními kmeny, z nichž nejvýznamnější jsou BMK (bakterie mléčného kvašení). Velká část této skupiny bakterií je dekarboxyláza pozitivní, což znamená, že mají schopnost transformovat aminokyseliny na BA (Świder et al., 2020). U potravin nebo jejich částí, které prošly fermentačním procesem, nebo byly vystaveny mikrobiální kontaminaci během technologického procesu výroby nebo skladování, je pravděpodobné, že obsahují biogenní aminy. BA mohou být obsaženy také v alkoholických nápojích, jako jsou pivo a víno, ale i v dalších fermentovaných potravinách, jako je např. kysané zelí a výrobky ze sójových bobů. U čerstvých a fermentovaných produktů a u produktů živočišného a rostlinného původu jsou nalezené BA a také jejich koncentrace různé. Tyto odchylky lze odůvodnit typem zpracování, dostupností a typem aminokyselin přítomných v potravine, podmínkami a dobou a teplotou skladování, typem balení a přítomností pozitivních dekarboxylázových mikroorganismů. Tab. 3 uvádí údaje o BA v různých potravinách. Vysoké koncentrace BA byly prokázány také u různých druhů ovoce a zeleniny. BA byly proto dříve považovány za endogenní látky rostlinného původu. BA jsou vytvářeny v potravinách v důsledku mikrobiální činnosti v průběhu jejich stárnutí a skladování (Shalaby, 1996).

Tab. 3: Koncentrace BA v různých potravinách (mg/kg, mg/l) (podle Vasconcelos et al., 2021).

Matrice	PUT	KAD	TYM	HIM
Fermentované kravské mléko	2,4-3,7	1,2-7,5	13,3-23,3	-
Fermentované kozí mléko	3,0-5,3	-	16,2-26,1	-
Sýr	1,3-45,5	1,7-131	1,1-717	0,2-186
Čokoláda	1,32	1,32	0,58	-
Pivo	1,5-8,2	0,17-1,45	0,43-6,01	0,08-0,8
Červené víno	24,8-34,2	1,14	1,78-4,29	-
Bílé víno	1,85	1,49	0,38	0,76
Džus	0,43-3,4	0,12-0,64	0,15-1,5	0,11-0,62
Červené maso	1,9	0,9-2,3	0,2-33,8	1,2-20
Klobásy	1-24,6	23,8-681,2	53,5-273,9	0,87-343,9
Sardinky	-	1,67-2,21	27,9-105,9	1,12-1,99
Sójová omáčka	20-23,3	33,9-149	-	56,3-440

PUT – putrescin, KAD, kadaverin, TYM – tyramin, HIM – histamin

Existuje několik faktorů, které mohou omezit akumulaci biogenních aminů v těchto potravinách, např. dostupnost substrátu, hodnota pH, koncentrace soli a teplota mají omezující účinky na hromadění biogenních aminů, respektive na přítomnost mikroorganismů a jejich schopnost přežívání a následného rozmnožování v daném substrátu. K omezení tvorby BA v potravinách mohou být v průběhu jejich technologického zpracování použity různé přídatné látky,

jako například sorban draselný. Biogenní aminy se v některých potravinách nacházejí současně s bakteriemi odpovědnými za jejich tvorbu. Některé z nich jsou uvedeny v Tab. 4. Koncentrace biogenních aminů se značně mění nejen u různých druhů potravin, ale v rámci různého zpracování a skladování stejných druhů potravin (Shalaby, 1996). BA jsou přítomny ve fermentovaných produktech (např. sýr 5-4500 mg/kg, víno 5-130 mg/l, pivo 2,8-13 mg/l, kysané zelí 110-300 mg/kg) a v nesprávně uchovávaných potravinách (ryby 2400-5000 mg/kg, hovězí játra cca 340 mg/kg, hotová masa 10-700 mg/kg). Také mnohé zkažené potraviny jsou obvykle bohaté na BA, nejčastěji obsahují vysoké hladiny putrescinu a kadaverinu (Károvičová a Kohajdová, 2005).

Tab. 4: Bakterie a biogenní aminy nalezené a izolované z různých potravin (podle Shalaby, 1996)

Potravina	Bakteriální agens	Nalezené aminy
Ryby	<i>Morganella morganii</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Hafnia alvei</i> , <i>Proteus mirabilis</i> , <i>Proteus vulgaris</i> , <i>Clostridium perfringens</i> , <i>Klebsiella aerogenes</i> (dříve <i>Enterobacter aerogenes</i> ), <i>Bacillus</i> spp., <i>Staphylococcus xylosus</i>	histamin, tyramin, kadaverin, putrescin, agmatin, spermin, spermidin
Sýry	<i>Lentilactobacillus buchneri</i> , <i>Lactobacillus</i> sp., <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> (dříve <i>Lb. bulgaricus</i> ), <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> (dříve <i>Lb. plantarum</i> ), <i>Lactocaseibacillus casei</i> (dříve <i>Lb. casei</i> ), <i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Enterococcus faecium</i> , <i>Streptococcus mitis</i> , <i>Paenibacillus macerans</i> (dříve <i>Bacillus macerans</i> ), <i>Propionibacterium</i> spp.	histamin, kadaverin, putrescin, tyramin, β-fenylethylamin, tryptamin
Maso a masné produkty	<i>Pediococcus</i> , <i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>Micrococcus</i>	histamin, kadaverin, putrescin, tyramin, β-fenylethylamin, tryptamin
Fermentovaná zelenina	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> , <i>Pediococcus</i> spp., <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	histamin, kadaverin, putrescin, tyramin, tryptamin
Fermentované sójové produkty	<i>Rhizopus oligosporus</i> , <i>Trichosporon beiglii</i> , <i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	histamin, kadaverin, putrescin, tyramin, tryptamin

### 1. 3. 1. Ryby a rybí produkty

Je nesporné, že ryby a rybí produkty jsou často sledovány, pokud jde o obsah biogenních aminů. Rybí svalovina je bohatá na volný histidin. Ten může být přeměněn na histamin činností bakteriálních dekarboxyláz. Obecně se tvrdí, že produkce histaminu je sama o sobě bakteriálního původu, a proto tento fakt představuje jedno ze zásadních kritérií kažení nebo zhoršení kvality produktů rybolovu. U ryb se velkou měrou podílí na případech otravy histaminem zástupci čeledi *Scombridae* a *Scomberesocidae* (Biji et al., 2016). Ryby jako makrela (*Scomber scombrus*), tuňák (*Thunnini*), mahi-mahi (*Coryphaena hippurus*), sardinka (*Sardina pilchardus*) a lufara dravá (*Pomatomus saltatrix*) obsahují vysoké koncentrace histaminu díky vysokým hladinám volného histidinu (Bilgin a Gençcelep, 2015). Histamin obsažený v produktech rybolovu je produkován primárně gramnegativními bakteriemi *Morganella morganii*. Bylo zjištěno, že za vysoké koncentrace histaminu v chlazených produktech rybolovu je často zodpovědná *Photobacterium phosphoreum* (Comas-Basté et al., 2019). Přítomnost této bakterie je obtížné eliminovat kvůli její odolnosti vůči zahřívání a také nízkým teplotám (Takahashi et al., 2015). Byly zaznamenány zvýšené koncentrace některých BA v produktech rybolovu, jako jsou konzervovaná makrela, konzervovaný tuňák, konzervované sardinky a marinované ančovičky, naměřené hodnoty BA se pohybovaly v rozmezí od 26,5 do 406,5 mg/kg pro histamin a kadaverin (Bilgin a Gençcelep, 2015). Ryby, které obsahují velká množství histaminu, mohou mít normální vzhled i zápach (Arnold a Brown, 1978). Bylo provedeno několik studií, které zkoumaly účinek skladovací teploty na tvorbu biogenních aminů v rybách. Yoshida a Nakamura (1982) zjistili, že u čerstvých ryb nebyla zaznamenána přítomnost biogenních aminů, ale když byla čerstvá makrela uložena při pokojové teplotě, úroveň histaminu se zvýšila až na 28,4 mg/kg po 24 hodinách a 1540 mg/kg po 48 hodinách. Histamin byl tvořen snadněji, když byl tuňák uchovávan při mírně zvýšené teplotě, ačkoli čerstvá ryba byla histaminu zcela prostá (Frank et al., 1981). Tvorba histaminu byla optimální při teplotě 37,8 °C a byla zcela závislá na mikrobiální aktivitě. Na základě těchto skutečností bylo dokázáno, že skladování ryb při nízké teplotě snižuje rychlost tvorby biogenních aminů.

### 1. 3. 2. Maso a masné výrobky

Maso a masné výrobky obsahují velké množství bílkovin a s tím spojené riziko akumulace BA. Bylo zjištěno, že maso a masné výrobky obsahují nejčastěji tyramin, kadaverin, putrescin, spermin a spermidin (Koehler a Eitenmiller, 1978; Nakamura et al., 1979; Edwards et al., 1983; Stratton et al., 1991), méně často se pak v menších koncentracích mohou u některých masných výrobku objevit  $\beta$ -fenyletylamin a tryptamin (Glória, 2005).

Čerstvé vepřové maso používané pro výrobu masných výrobků může obsahovat větší množství sperminu, spermidinu a stopy jiných aminů. Zvyšující

se obsah BA ve vepřovém masu je závislý na teplotě uchování masa. Během skladování se obsah ostatních BA zvyšuje, zatímco koncentrace sperminu a spermidinu klesá. Vepřové maso skladované při teplotě 30 °C vykazovalo vyšší hodnoty biogenních aminů než vepřové skladované při teplotě 4 °C (Chen et al., 1994). Významné zvýšení koncentrace biogenních aminů bylo spojeno s kažením masa (Nemeth-Szerdahelyi et al., 1993). Ve vepřovém masu, které bylo vystaveno nevhodným teplotním podmínkám, byla detekována přítomnost vysokého množství enterokoků a zástupců čeledi *Enterobacteriaceae*. Přítomnost BA byla zaznamenána také v čerstvém vakuově baleném hovězím masu v průběhu skladování při teplotě 1 °C po dobu 120 dnů. Vyšší hladiny byly detekovány počínaje 20. dnem skladování. Bylo také zjištěno, že vakuově balené hovězí maso, kde byla zjištěna přítomnost BA, ale které bylo uloženo v chladu, bylo sensoricky přijatelné. Tento fakt může představovat zvýšené riziko otrav pro jedince citlivé na biogenní aminy (Smith et al., 1993). Naopak drůbeží maso je rychle se kazící produkt, který je citlivý na fyzikální, chemické a mikrobiologické změny. V důsledku této citlivosti je možné skladovat drůbeží maso při chladírenské teplotě výrazně kratší dobu než červená masa (Balamatsia et al., 2007). Hlavními ukazateli kvality a čerstvosti drůbežního masa jsou jeho organoleptické a mikrobiální vlastnosti. Vzhledem k nedostatku obecné shody, pokud jde o časné příznaky kažení drůbežního masa a nemožnosti zobecnit subjektivní smyslové vnímání, byla navržena řada chemických ukazatelů, díky kterým by bylo možné posoudit kvalitu drůbežního masa (Balamatsia et al., 2006; Savvaidis, Ruiz-Capillas, 2009). BA v kuřecím masu jsou nejčastěji produkovány zástupci čeledi *Enterobacteriaceae* (Balamatsia et al., 2006; Buňková et al., 2010). Koncentrace BA může potenciálně sloužit jako chemický indikátor kvality čerstvosti drůbežního masa, protože úroveň BA >50 mg/kg je dosaženo dříve, než se zvýší úroveň mikrobiální kontaminace svědčící o zkažení masa (bez ohledu na obal a podmínky skladování) (Fusek et al., 2022).

U některých masných výrobků je fermentace jedním z důležitých faktorů při produkci histaminu. Během prvních tří dnů zrání některých fermentovaných masných výrobků se zvyšuje koncentrace histaminu alespoň desetinásobně (Dierick et al., 1974). Zatímco se během skladování zvyšují hladiny histaminu, kadaverinu, putrescinu a tyraminu, obsah sperminu mírně klesá a koncentrace spermidinu zůstává stabilní (Ruiz-Capillas a Jiménez-Colmenero, 2004). Dlouhé doby zrání, prodloužená proteolýza, snížení pH a další podmínky zpracování fermentovaných masných výrobků podporují akumulaci BA v nich (Suzzi a Gardini, 2003). Vysoké množství bílkovin, volných AMK, proteolytická aktivita během výroby a zpracování masných výrobků tak zpřístupňuje prekursorů pro dekarboxylázovou aktivitu mikroorganismů vyskytujících se v potravinové matici (Bover-Cid et al., 2001a). Obecně platí, že množství biogenních aminů ve fermentovaných masných výrobcích je dost variabilní. Jedním z nejdůležitějších faktorů, které ovlivňují vznik a kumulaci BA v dané potravine, je kvalita a stav vstupních surovin (Pachlová et al., 2018). Výrazná

proměnlivost v koncentraci BA může být způsobena různou dobou zrání (Cantoni et al., 1974), různou úrovní dekarboxylázové aktivity mikrobioty zodpovědné za fermentaci, biosyntézou a metabolismem těchto aminů (Shalaby a Abd El-Rahman, 1995) či variabilitou ve výrobním procesu, zastoupenou především velkými rozdíly v typu a kvalitě použité suroviny (Shalaby, 1995). Jedním z důležitých faktorů, který hraje významnou roli při předcházení akumulace BA ve fermentovaných masných výrobcích, je výběr vhodných startérových kultur. Pro tento proces bývají často využívány bakterie mléčného kvašení a některé nepatogenní druhy stafylokoků (Lorenzo et al., 2017). Díky své proteolytické a lipolytické aktivitě pozitivně ovlivňuje použití různých startérových kultur chuť, vůni a strukturu výsledné potraviny. Některé BMK jsou však schopny BA produkovat, je proto tedy nutné vybírat kmeny bez dekarboxylázové aktivity (Corsetti et al., 2014).

### 1. 3. 3. Sýry a mléčné produkty

Z mléčných výrobků představují sýry největší riziko intoxikace BA. Mnoho druhů sýrů obvykle obsahuje významná množství biogenních aminů (Joosten a Stadhouders, 1987; Stratton et al., 1991), podle Pachlové et al., 2018 se v sýrech ve zvýšených koncentracích vyskytují především histamin a tyramin. Nejvyšší koncentrace BA byly naměřeny v sýru s modrou plísní v koncentraci 1585,4 mg/kg tyraminu a 2101,4 mg/kg kadaverinu. V čerstvém sýru pak byly naměřené koncentrace mnohem nižší, 0,6 mg/kg pro tyramin a 0,5 mg/kg pro kadaverin (Benkerroum, 2016). Množství BA je obecně vyšší u sýrů vyráběných z čerstvého nepasterizovaného mléka a sýrů zrajících (Linaers et al., 2011).

Přítomnost biogenních aminů byla prokázána i u tavených sýrů, které byly v průběhu výroby vystaveny vyšší teplotě (El-Sayed, 1996). Rozsáhlá studie, která monitorovala vznik BA v sýrech, uvádí, že 124 ze 129 testovaných kmenů enterokoků izolovaných z mléčných výrobků bylo schopno tvořit tyramin a tryptamin. Tvorba histaminu byla zaznamenána některými laktobacily a laktokoky. 104 izolátů z italského sýru s modrou plísní patřících do čeledi *Enterobacteriaceae* bylo schopno dekarboxylovat alespoň dvě aminokyseliny, přičemž 104 bylo schopno tvořit kadaverin, 100 putrescin, 71 tyramin a 60 histamin (Nuñez a Medina, 2011).

Během výroby a zrání sýra dochází k široké škále biochemických změn, které ovlivňují mléčné bílkoviny, lipidy a sacharidy. Primární proteolýza vede k tvorbě peptidů a sekundární proteolýza k akumulaci volných AMK. Touto cestou pak mohou být vytvořeny biogenní aminy tyramin, fenylethylamin, histamin, tryptamin, kadaverin a putrescin, v tomto pořadí, prostřednictvím mikrobiální dekarboxylace tyrosinu, fenylalaninu, histidinu, tryptofanu, lysinu a ornithinu nebo argininu prostřednictvím agmatinu (Nuñez a Medina, 2011). Za vznik BA v sýrech je obecně odpovědná kontaminující mikrobiota. Tradičně byly za hlavní původce tvorby histaminu v sýrech považovány

heterofermentativní mléčné tyčinky a enterokoky za hlavní původce tvorby tyraminu. Na tvorbě biogenních aminů se mohou ale podílet i jiné bakterie mléčného kvašení a některé gramnegativní bakterie. Nejdůležitějšími biogenními aminy, které se vyskytují v sýrech, jsou histamin, tyramin, tryptamin, putrescin, kadaverin, a  $\beta$ -fenylethylamin (Tawfik et al., 1992). V průběhu zrání sýra je kasein pomalu degradován proteolytickými enzymy, což vede ke zvýšení obsahu volných aminokyselin (Foster et al., 1958; Joosten a Olieman, 1986). Tyto AMK mohou být následně využity k dalším reakcím katalyzovaným specifickými bakteriálními dekarboxylázami a vést k tvorbě CO<sub>2</sub> a aminů. Proto se obsah biogenních aminů (zejména histaminu, putrescinu a kadaverinu) postupně zvyšuje a mění spolu s prodlužující se dobou zrání sýrů (Degheidi et al., 1992).

V jogurtech byly koncentrace BA hlášeny v rozmezí 0,27 a 0,43 mg/kg pro kadaverin a spermin, v daném pořadí (Adımcılar et al., 2018). Malá množství BA byla detekována v sušeném mléce (Voigt et al., 1974)

### 1. 3. 4. Ostatní fermentované potraviny

Fermentované produkty ze sójových bobů, jako jsou miso, sójová omáčka a tempeh, jsou v Orientu populární více než 1000 let a nadále získávají stále větší popularitu i v západních zemích. Vzhledem k tomu, že do fermentačních procesů těchto výrobků je zapojeno několik druhů kvasinek, bakterií mléčného kvašení, dalších bakterií a plísní a stejně tak syrová surovina (sojové boby, luštěniny, obiloviny), obsahují tyto potraviny značné množství bílkovin. Můžeme zde tedy také předpokládat zvýšenou tvorbu biogenních aminů (Chin a Koehler, 1983). Vysoké hladiny biogenních aminů (až 1 g/kg) byly zaznamenány v sójové omáčce z černých sójových bobů (Yen, 1986), středně vysoká koncentrace tyraminu (450 mg/kg) byla zjištěna ve fermentovaných solených černých fazolích (Mower a Bhagaván, 1989). Proměnlivost koncentrace biogenních aminů v komerčních fermentovaných sójových výrobcích lze přičíst variabilitě v poměru sóji, fazolí a jiných surovin používaných pro výrobu dané potraviny, jejímu mikrobiologickému složení a podmínkám a době fermentace (Chin a Koehler, 1983). Nout et al. (1993) ukázali, že přítomnost *Rhizopus oligosporus* v tempehu zvyšovala koncentraci hlavně tyraminu a částečně i putrescinu, kdežto přítomnost *Klebsiella pneumoniae* a *Trichosporon beiglii* vedla ke zvýšení celkové koncentrace biogenních aminů v tempehu, naopak *Lactiplantibacillus plantarum* hladinu tyraminu v tomto produktu snižoval.

Fermentovaná zelenina představuje další skupinu potravin, ve kterých byla zjištěna přítomnost biogenních aminů. Nejčastějšími biogenními aminy, které se vyskytují např. v kysaném zelí, jsou histamin, tyramin, putrescin a kadaverin, zatímco např.  $\beta$ -fenylethylamin se zde nachází pouze v menších množstvích. Ačkoli kysané zelí běžně obsahuje hladiny histaminu pod toxickou hranicí (1 g/kg) (Stratton et al., 1991), podílí se ve značné míře na otravách



histaminem v Evropě (Mower a Bhagaván, 1989), což naznačuje, že kysané zelí může obsahovat vyšší množství histaminu, než je tělu snesitelné. Studie fermentace zelí ukázala, že značné množství putrescinu (150 mg/kg) bylo vytvořeno v průběhu počáteční fáze fermentace, kdy paralelně docházelo k poklesu koncentrace argininu, zatímco histamin a tyramin byly detekovány až v závěrečné fázi fermentace (Koutsoumanis et al., 2010).

### 1. 3. 5. Alkoholické nápoje

Stejně jako jiné fermentované nápoje, i alkoholické nápoje mohou obsahovat BA jako výsledek dekarboxylace určitých AMK mikroorganismy, které se při výrobě alkoholických nápojů používají. Obsah BA byl studován v alkoholických nápojích jako jsou boza (tradiční fermentovaný turecký nápoj na bázi obilovin), pivo a cider. Nicméně nejvíce studovaným nápojem v této oblasti je však víno.

Ve víně se může vyskytovat histamin, tyramin, putrescin, kadaverin a fenylethylamin, ale histamin, tyramin a putrescin bývají ve víně zaznamenávány nejčastěji (Anli et al., 2009; Smit et al., 2013). Přítomnost biogenních aminů ve vínech je intenzivně studována od roku 1980. V důsledku kladení velkého důrazu na bezpečnost potravin a ochranu spotřebitele se však v posledních 10 letech zájem o BA ve víně ještě zvýšil. Biogenní aminy mohou být již přítomny v moštu nebo jsou tvořeny kvasinkami při alkoholovém kvašení. Druhá alternativa pro původ biogenních aminů ve víně je působení bakterií podílejících se na jablečno-mléčné fermentaci (Anli et al., 2004; Hernandez-Orte et al., 2002). Některé BA jsou normálně přítomny v hroznech v závislosti na typu a složení půdy, hnojení půdy, klimatických podmínkách během růstu, stupni zralosti, způsobu zpracování vína, růstu BMK a reziduální mikrobiální populace. V několika studiích byly BA navrženy jako indikátory nedostatečné hygieny během procesu výroby vína nebo jako indikátory související (v případě putrescinu a kadaverinu) se špatným hygienickým stavem hroznů (Prete et al., 2009). Pro vznik BA jsou důležité také podmínky fermentace vína (teplota, pH, přístup kyslíku, obsah NaCl, úprava moštu, délka kvašení, přítomnost dužniny a slupky, obsah alkoholu, koncentrace oxidu siřičitého a přidaných živin, množství a typu použitých čeridel a čerčících činidel) (Anli et al., 2009).

BA se vyskytují také ve zmíněném pivu. Stejně jako u vína je koncentrace BA v pivu ovlivněna především kvalitou vstupních surovin a možnou mikrobiální kontaminací během technologie výroby vaření piva. Slad je a zdroj agmatinu, putrescinu, spermidinu a sperminu, zatímco tyramin histamin a kadaverin vzniká během fermentace činností kontaminujících BMK (Kalač et al., 2002). Histamin byl nalezen ve vysokých koncentracích dosahujících 5, 15 a 20 mg/l ve švédském, dánském a francouzském pivu (Zee a Simard, 1981). Koncentrace putrescinu a kadaverinu bývají v pivech obecně nízké (Stratton et al., 1991). Buňka et al. (2012) ve své studii testovali přítomnost biogenních aminů tyraminu, putrescinu, kadaverinu, sperminu a spermidinu v českých pivech. V téměř 25 % testovaných

vzorků alkoholického piva (na konci období trvanlivosti) přesáhla celková koncentrace všech testovaných biogenních aminů a polyaminů hodnotu 100 mg/l.

### 1. 3. 6. Čerstvé ovoce, zelenina a další

Obsah biogenních aminů byl zjištěn nejen v potravinách živočišného původu, ale také v čerstvém ovoci a zelenině. BA byly zjištěny v nekvašené zelenině, jako je chřest, fazole, brokolice, zelí, květák, mrkev, celer, mangold, cuketa, okurka, lilek, hlávkový salát, cibule, paprika, brambory, dýně, špenát a rajčata stejně jako v několika ovocných šťávách, oříšcích nebo houbách (Sánchez-Pérez et al., 2018). U zeleniny, jako je např. čínské zelí, štěrбак, ledový salát a čekanka, bylo zjištěno, že obsahují biogenní aminy v koncentracích od 14 do 20 mg/kg, nejčastěji detekovaným BA zde byl spermidin (Simon-Sarkadi a Holzapfel, 1994). Bylo zjištěno, že obsah biogenních aminů u hub (*Volvariella volvacea*) se zvyšuje s dobou skladování při 4 °C a 25 °C, naopak snížení koncentrace BA přibližně o 80 % bylo dosaženo po 5 minutách varu (Yen, 1986). Jako alternativa mléka se v posledních letech dostávají do popředí různé zeleninové a cereální nápoje. V nedávných studiích o cereálních nápojích obsahujících obiloviny, jako jsou špalda, oves, proso, quinoa a rýže byly u těchto nápojů zjištěny zvýšené koncentrace kadaverinu v hodnotách 0,15 – 3,1 mg/l a histaminu v hodnotách 2,55 – 7,47 mg/l (Gobbi et al., 2019). Maxa a Brandes (1993) zjistili, že ve většině vzorků ovocných šťáv, včetně malinové, citronové, grapefruitové, mandarinkové, jahodové, rybízové a hroznové, převládá z biogenních aminů putrescin, jehož koncentrace v pomerančové šťávě dosahovala až 61 mg/l (Prete et al., 2016). Koncentrace histaminu byla v těchto šťávách nízká, s výjimkou vzorku citronové šťávy (0,36 mg/l). Malinová šťáva vykazovala naopak zvýšenou koncentraci tyraminu (67 mg/l).

## 1. 4. Konzervace potravin

Konzervace potravin je proces zahrnující uchování a manipulaci s potravinami, který má zastavit nebo výrazně zpomalit kažení (ztráta kvality, organoleptických vlastností nebo nutriční hodnoty) způsobené nebo urychlené činností mikroorganismů. Zachování požadovaných nutričních hodnot, textury a chuti je důležité jak z hlediska zdravotního, tak z hlediska ekonomického. Konzervace potravin má obvykle zabránit růstu bakterií, hub a dalších mikroorganismů, stejně jako zpomalit oxidaci tuků, které způsobují žluknutí. To zahrnuje také procesy používané k potlačení přirozeného stárnutí nebo barevných změn potravin, které může nastat během přípravy pokrmů, jako například enzymatické reakce způsobující zhnědnutí jablka po rozkrojení (Jean, 1994).

Různé druhy potravin vyžadují různé konzervační zákroky. Mezi běžné způsoby konzervace patří např. sušení, lyofilizace, mražení, vakuové balení nebo třeba ozařování potravin, přidání chemických konzervačních látek či ošetření inertními plyny (např. oxid uhličitý). Některé potraviny musí být uzavřeny v nádobách, aby se zabránilo jejich rekontaminaci mikroorganismy, jiné potraviny se mohou konzervovat sušením, které umožňuje uložení potravin mimo obalový materiál po delší dobu. Existují také metody, které nejen pomáhají uchování potravin, ale také jí dodávají specifickou chuť. Jedná se např. o moření, solení, uzení či konzervování v sirupu nebo alkoholu (Abdulumeen et al., 2012).

### *Sušení*

Jedná se o jednu z nejstarších konzervačních technik. Sušení snižuje vodní aktivitu prostředí a tím zpomaluje či inhibuje růst mikroorganismů. Sušení také snižuje hmotnost potravin (Abdulumeen et al., 2012).

### *Mražení a chlazení*

Mražení je jedním z nejrozšířenějších způsobů konzervace potravin. Komerčně dostupné spotřebiče (ledničky, mrazničky) se nachází téměř v každé domácnosti, což umožňuje uchovávání potravin v domácím prostředí. Nejen díky tomu se v dnešní době vyrábí potraviny ze surovin, které se ve své přirozené podobě mrazit nemohou (bramborové placky x syrové brambory) (Heldman, 1980).

### *Vakuové balení*

Vakuové balení uchovává potraviny obvykle ve vzduchotěsném vaku nebo lahvi. Prostor vaku inaktivuje, případně i ničí, bakterie, které jsou fyziologicky závislé na kyslíku. Tím se zpomalí proces kažení potravin. Vakuové balení se často používá pro uchování různých druhů ořechů s cílem snížit možnost oxidace tuků a následné ztráty chuti (Abdulumeen et al., 2012).

### *Solení*

Solení odjímá vlhkost z masa prostřednictvím procesu osmózy. Maso se následně vytvrdí solí, cukrem nebo kombinací obou (Abdulumeen et al., 2012). Ke konzervaci masa jsou také často používány dusičnany a dusitany, které přispívají k jeho charakteristické růžové barvě, stejně jako k inhibici růstu *Clostridium botulinum* (Abdulumeen et al., 2012).

### *Proslazování*

Cukr se používá nejčastěji pro konzervaci ovoce, a to buď v sirupech s ovocem jako jsou jablka, hrušky, broskve, meruňky, švestky nebo v krystalické formě, kdy je konzervovaný materiál vařen v cukru, po důkladném provaření potraviny je cukr nechán zpět vykristalizovat. Takto zpracovaná potravina vydrží v suchu po dlouho dobu. Tato metoda je častou využívána pro zachování kůry citrusového ovoce (kandovaná kůra) nebo zázvoru. Použití cukru je často

kombinováno s použitím alkoholu pro konzervaci luxusních výrobků jako třeba ovoce v brandy či jiných destilátech (Saulo, 2005).

### *Moření*

Moření je způsob konzervování potravin pomocí požitelné antimikrobiální kapaliny. Signifikantní vlastností takové kapaliny, ve které je potravina namáčena, je schopnost inhibovat či usmrcovat bakterie a jiné mikroorganismy. Typickými mořidly jsou např. silně koncentrovaný solný roztok, ocet, alkohol, rostlinný olej atd (Abdulmeen et al., 2012).

### *Uzavírání do plechovek a lahví*

Pro uchování potravin v plechovkách či lahvích je nutno vstupní potraviny nejprve tepelně upravit pro usmrcení nežádoucích mikroorganismů v potravine a asepticky plnit do připravených sterilních nádob. Takto uchovávané potraviny si dokáží po velmi dlouhou dobu udržet své nutriční a organoleptické hodnoty. Po prvním otevření nádoby a jejím opětovném zavření může nastat poměrně rychlé kažení (Abdulmeen et al., 2012).

### *Konzervace tukem*

Jedná se o tradiční britský způsob konzervování masa (zejména krevet), kdy se povařená potravina v nádobě zalije vrstvou tuku, čímž je vytvořeno anaerobní prostředí, které neumožňuje přežití mnohých mikroorganismů (Abdulmeen et al., 2012).

### *Ozařování*

Expozice potravin ionizujícím zářením má řadu pozitivních účinků na kvalitu potravin, včetně likvidace bakterií, plísní, hmyzu, zpomalení zrání a kažení ovoce, při vyšších dávkách dokáže potraviny zcela sterilizovat. Tato technologie bývá často srovnávána s pasterizací, proto se pro tuto metodu někdy užívá pojem "studená pasterizace", protože výrobek není vystaven zvýšeným teplotám. Ozařování není účinné proti prionům, nemůže eliminovat toxiny již vytvořené mikroorganismy a je vhodné pouze pro potraviny o vysoké počáteční kvalitě (WHO, 1991).

## **1. 5. Možnosti snížení obsahu biogenních aminů v potravinách**

Obsah biogenních aminů v potravinách kolísá a mění se také složení mikrobioty. Na vzniku biogenních aminů v potravinách se podílí mnoho faktorů, a to jak při výrobním procesu, tak při jejich skladování. Jednu z nejdůležitějších rolí hraje samotná kvalita a stav vstupní suroviny, u fermentovaných výrobků pak vhodný výběr přidaných startérových kultur. Dalšími neméně důležitými faktory, které ovlivňují tvorbu či redukci BA, je např. pH, koncentrace NaCl, teplota či zmíněná metabolická a biochemická aktivita přítomné mikrobioty, ta však víceméně podléhá proměnlivosti faktorů vyjmenovaných výše (Gücükoğlu a Küplülü, 2010).

### **1. 5. 1. Změna pH**

Hodnoty pH prostředí jsou důležitými faktory, které ovlivňují aktivitu bakteriálních dekarboxyláz (Linares et al., 2011). Aktivita dekarboxyláz bývá vyšší spolu s vyšší aciditou prostředí. pH optimum je v takových případech mezi 4 až 5,5 (Halász et al., 2002). Pohyb v takovém prostředí bakterie stimuluje k vyšší tvorbě dekarboxyláz, které produkují jako součást svých obranných mechanismů proti kyselému prostředí (Maijala et al., 1993). Na druhou stranu výrazné snížení či zvýšení pH inhibuje růst mikroorganismů, a tedy zamezuje tvorbě BA působením jejich dekarboxylačních enzymů (Bover-Cid et al., 2008; Fernández et al., 2007a). Navzdory tomu, že je hodnota pH jedním z klíčových faktorů, který představuje potenciální riziko akumulace BA v konečném produktu, je často obtížné změnit pH, jehož hodnoty jsou úzce spjaty s fermentačním procesem (Sanli a Senel, 2015).

### **1. 5. 2. Změna koncentrace NaCl**

Dalším důležitým faktorem, který může mít vliv na akumulaci BA v potravinách, je koncentrace soli ve fermentovaném produktu či v médiu. Tradičně se sůl používá k potlačení růstu patogenů v průběhu fermentace a kysání mléčných výrobků s dílčím cílem zabránit kažení potravin a otrav z jídla. Významným činitelem při reprodukci mikroorganismů je totiž správný poměr vody a soli během fermentace, zrání či skladování potravin. NaCl snižuje tvorbu BA mikroorganismy tím, že mění osmotický tlak buňky a snižuje vodní aktivitu prostředí. Mikroorganismy jsou poté inhibovány nedostatkem volné vody. Pokud není vodní hospodaření buňky uvedeno zpět do normálu (resp. na hranici potřebnou k přežití daného mikroorganismu), změny v buněčné struktuře jsou destruktivní a ireverzibilní. Za těchto podmínek dochází tedy k odumření mikroorganismu (Chander et al., 1989; Stratton et al., 1991). Důsledkem je snížení rychlosti či úplná inhibice růstu bakterií, včetně produkce BA. Takový postup by následně vedl k poklesu koncentrace BA i v konečném produktu (Linares et al., 2011).

### 1. 5. 3. Změna teploty

Neméně významným faktorem, který hraje důležitou roli v redukci BA, je teplota. Důležitá je nejen teplota zpracování potravin, ale i jejich uchovávání. Teplotní optimum růstu většiny bakterií s dekarboxylázovou aktivitou se pohybuje v rozmezí 20 °C až 37 °C. Jedná se tedy zpravidla o mezofilní organizmy. Vyšší teplota způsobuje nejen denaturaci proteinů a jejich inhibici, ale i následnou smrt buňky (Šmarda et al., 2005). Zvýšení teploty do blízkosti teplotního optima mikroorganismu tedy umocňuje proteolytické a dekarboxylační reakce, což má za následek hromadění volných AMK a zvýšení koncentrace aminů (Vidal-Carou, 2007). Vystavení potravin vysokým teplotám často inhibuje růst mikroorganismů produkujících histamin. Naopak při nízkých teplotách je v důsledku zpomalení či potlačení mikrobiálního růstu a snížení celkové metabolické aktivity kumulace biogenních aminů v potravine snížena (Karovičová a Kohajdová, 2005). Výsledky studie Du et al. (2002) ukazují, že tuňák žlutý skladovaný 9 dní při 0 °C a 22 °C vykazoval nárůst koncentrace histaminu o 15 mg/kg při 0 °C a 4500 mg/kg při 22 °C.

### 1. 5. 4. Změna tlaku

Vysoký tlak (HHP, high hydrostatic pressure) je netermický způsob konzervace některých potravin, který poškozují buněčné membrány mikroorganismů, což vede k jejich inaktivaci nebo na ně má subletální účinky (Rivas et al., 2008). Vysoký tlak je užitečná metoda pro rozrušení buněk, která mění propustnost buněčné membrány. Tento stav způsobuje snížení možnosti střetu s volnými AMK a díky denaturaci membránových proteinů způsobuje poškození nebo smrt buňky (Lanciotti et al., 2007). Prostřednictvím inaktivace mikroorganismů HHP prodlužuje životnost potravin při zachování původní chuti a vlastností (Patterson, 2005). Jedná se o relativně nový způsob ošetření potravin, u kterých zvýšení či snížení teploty mění jejich organoleptické vlastnosti (Ercan et al., 2013). Ošetření potravin HPP je běžné např. v USA, Japonsku a Španělsku (Patterson 2005). Je-li HHP aplikován na výchozí suroviny nebo konečné produkty fermentace, snížení počtu bakterií může inhibovat tvorbu BA. Např. při aplikaci HPP (200 MPa) na syrovou masovou hmotu pro výrobu fermentovaných masných výrobků byl inhibován růst enterobakterií a současně oddaloval akumulaci putrescinu a kadaverinu (Latorre-Moratalla et al., 2007). Inhibice tvorby biogenních aminů, závisí na úrovni použitého tlaku (Novella-Rodriguez et al., 2002). Působení nízkého tlaku (50 MPa) na zrající sýr po 72 h obsah BA zvýšil, zatímco vystavení vyššímu tlaku (400 MPa) po dobu 5 minut a následnému opětovnému snížení na 50 MPa působícího po dobu 72 hodin ukázalo mírný pokles (Novella-Rodriguez et al., 2002). Ošetření fermentovaného masného výrobku vysokým tlakem (350 MPa/15 min) snížilo množství BMK o 20,1 % a snížilo také hladiny kadaverinu (o 12,5 %), putrescinu (o 8,7 %) a tyraminu (o 17 %) během 160denního skladování ve srovnání s výrobkem

neošetřeným HHP (Ruiz-Capillas et al., 2007). Počet histamin tvořících mikroorganismů a aktivita histidindekarboxylázy u tuňáka žlutoploutvého a mahi-mahi ryby lze snížit aplikací HHP v rozmezí 300 až 400 MPa, aniž by to ovlivnilo kvalitu ryb. HHP (300 MPa při 40 °C po dobu 10 minut) aplikovaný během fermentace kysaného zelí prodloužil jeho trvanlivost díky redukci přítomných mikroorganismů (Ercan et al., 2013).

### **1. 5. 5. Vliv ionizujícího záření**

Ozařování potravin se v mnoha zemích používá pro účely inhibice klíčení, znehodnocení potravin hmyzem a parazity, oddálení fyziologického zrání, prodloužení trvanlivosti nebo zlepšení technologických vlastností potravin (Loaharanu, 1989; Radomyski et al., 1994; Thayer, 1994). Ozařování je účinné při redukci počtu životaschopných mikroorganismů a virů a je známé jako dobrá metoda pro inaktivaci patogenů v potravinářských materiálech. Kromě sanitárních účelů se technologie ozařování používá také ke snížení obsahu karcinogenních nitrosaminů a dusitanů v masných výrobcích (Ahn et al., 2002). Ahn, et al. (2002) uvádí, že ozáření může vyvolat radiolýzu karcinogenních N-nitrosaminů ve vodném modelovém systému a je účinné i pro snížení obsahu N-nitrosaminů v masných výrobcích. Všechny potraviny obsahující vodu pravděpodobně procházejí během ozařování jak oxidačními, tak redukčními reakcemi, protože radiolytické produkty vody, zejména hydroxylový radikál, jsou silná oxidační činidla a vodný elektron nebo atom vodíku je redukčním činidlem (Brewer, 2009). Ozařování jako způsob prodloužení trvanlivosti a zajištění bezpečnosti potravin bylo zavedeno v roce 1950 (Mbarki et al., 2009), zároveň se tak vyskytla možnost snížení používání chemických konzervačních látek (Loaharanu, 1989; Radomyski et al., 1994). Ozařování může snížit hodnoty BA v potravinách dvěma způsoby – přímou radiolýzou aminů v potravinách (Mbarki et al., 2009) nebo snížením počtu bakterií, které BA produkují (Kim et al., 2003). V modelovém systému byla prokázána radiolytická degradace biogenních aminů. Histamin, kadaverin, putrescin, spermidin, spermin, tryptamin, tyramin a agmatin byly rozpuštěny v destilované vodě v koncentraci 100 mg/kg a následně ozářeny 2,5; 5; 10; 20 a 25 kGy. Degradace byla pozorována v rozmezí 5 až 100 %, průměrně však bylo pozorováno 95% snížení všech BA při 20 kGy (Kim et al., 2004). Nicméně studie je založena pouze na modelovém systému, aplikace v rámci potravinového průmyslu vyžaduje další výzkum. Vysoké dávky záření mohou mít vliv na organoleptické vlastnosti potravin. Aplikace záření o 10 kGy je považována za bezpečnou u jakéhokoliv potravinářského produktu (WHO, 1994), avšak použití vyšší úrovně záření by opět vyžadovalo studie organoleptických charakteristik a bezpečnosti ošetřených potravin (Min et al., 2007). Prodloužení trvanlivosti výrobků ozařováním bylo aplikováno na mnoho druhů potravin včetně hovězího, vepřového a kuřecího masa, sójové pasty a ryb (Kim et al., 2004, Min et al., 2007, Mbarki et al., 2009). Ve studii Kim et al. (2003) byly sledovány obsahy BA po ozáření za účelem sledování radiolytických

charakteristik. Koncentrace BA v této studii byly významně sníženy v závislosti na dávce záření. Ozářením 5 kGy byly zcela rozloženy putrescin a spermin, spermidin byl pak úplně rozložen při ozáření 10 kGy a fenylethylamin a histamin ozářením 15 kGy, v daném pořadí. Kadaverin, tryptamin, tyramin a agmatin vykazovaly 95–98 % rozklad ozářením 20 kGy. Radiolýza BA gama zářením byla pozorována v modelovém vodném systému. Avšak z hlediska stejných úrovní radiolýzy by se v nevodných potravinářských systémech používaly vyšší dávky ozáření než u vodných modelových systémů kvůli odlišné fyzikální struktuře, různým úrovním obsahu vlhkosti a sloučenin. Podle předchozí práce (Kim et al., 2003) bylo gama ozařování fermentované sójové pasty účinné pro snížení obsahu BA během fermentace a skladování, ale nemohlo BA úplně radiolyzovat při dávkách nižších než 15 kGy. Výsledky měření Kim et al. (2004) ukázaly, že putrescin, spermidin a spermin byly na gama záření nejcitlivější a mohly se radiolyzovat mnohem rychleji než ostatní. Další BA vykazovaly podobnou rychlost degradace. Tryptamin, tyramin a agmatin byly v tomto modelovém systému stabilnější vůči ozáření než ostatní BA (Kim et al., 2004). Je důležité zmínit, že stále existuje určitá nedůvěra spotřebitelů v potraviny ošetřené ozařováním, mimo jiné i z důvodu změny organoleptických vlastností (Naila et al., 2010).

### **1. 5. 6. Aplikace potravinářských přídatných látek**

Koření a byliny jsou přísady, které jsou široce využívány nejen pro zvýraznění chuti nebo barvy nejrůznějších potravin, ale také pro své antimikrobiální a antioxidační účinky. Mnoho studií dokazuje, že některé druhy koření a bylin snižují produkci biogenních aminů. Přírozenou inhibiční aktivitu vykazuje kurkumin (kurkuma), kapsaicin (červená paprika) a piperin (černý pepř) (Mbarki et al., 2009). Yücel a Üren, (2008) uvedli, že složky v koření, jako je thymol, inhibují tvorbu biogenních aminů. Bylo také pozorováno, že použití kyseliny citrónové při kvašení nakládaného zelí mělo za následek mírný pokles obsahu biogenních aminů (Kurt a Zorba, 2009). Další studovanou přídatnou látkou byl dusitan sodný při fermentaci suchých klobás. Bozkurt a Erkmen (2004) zjistili, že produkce BA po jeho přidání klesla. Při použití dusitanů během výroby sucuku (suchá kořeněná klobása) bylo zjištěno, že ovlivňují tvorbu biogenních aminů kromě spermidinu a sperminu (Gençcelep et al., 2007). Dále byl studován vliv přítomnosti siřičitanu sodného na akumulaci BA během zrání fermentovaných masných výrobků. Studie uvádí, že se po jeho přidání zvýšila koncentrace tyraminu, zatímco tvorba kadaverinu byla výrazně inhibována. Snížení tvorby kadaverinu bylo pozorováno u pomalu fermentovaných masných výrobků, když byl do surovinové skladby přidán cukr (Bover-Cid et al., 2001a).



### 1. 5. 7. Použití startérových kultur

Startérové kultury jsou čisté nebo smíšené prospěšné mikroorganismy používané ve fermentovaných potravinářských výrobcích. Aplikace startérových kultur s aminoxidázovou aktivitou je důležitá kvůli inhibici tvorby biogenních aminů (Karovičová a Kohajdová, 2005). Bylo pozorováno, že rychlé snížení pH pomocí amin negativních startérových kultur může do značné míry zabránit akumulaci biogenních aminů ve fermentovaných potravinách. Použití amin negativních startérů, jako je *Latilactobacillus sakei* (dříve *Lactobacillus sakei*) nebo *Pediococcus pentosaceus*, by mohlo zabránit tvorbě biogenních aminů ve fermentovaných masných výrobcích (Maijala et al., 1995). Také startérové kultury schopné nutričně konkurovat nstartérovým mikroorganismům, zejména během procesu dozrávání a po celou dobu skladování, mohou dále zabránit nadměrné produkci biogenních aminů (Stadnik a Dolatowski, 2010). Bylo zjištěno, že přirozená mikrobiota sucuku produkovala vysoké hladiny tyraminu a putrescinu (více než 250 mg/kg), zatímco přidání smíšených startérových kultur (*L. sakei*, *P. pentosaceus*, *S. xylosus* a *S. carnosus*) zabránilo tvorbě putrescinu, ale ne tyraminu (Tosukhowong et al., 2011). *S. xylosus* byl identifikován jako účinný při inhibici tvorby BA v solených fermentovaných ančovičkách. Inokulace *L. plantarum* do kysaného zelí (Kalač et al., 2000) a Nham (thajská fermentovaná klobása) (Tosukhowong et al., 2011) účinně snížila produkci tyraminu, putrescinu a kadaverinu. Tyto výzkumy ukazují, že různé startérové kultury disponují různými metabolickými účinky. Někteří autoři zjistili, že startérové kultury nestačí k zabránění tvorbě biogenních aminů v některých fermentovaných masných výrobcích. To může souviset s nedostatečnou hygienickou kvalitou syrového masa (Gonzalez-Fernandez et al., 2003).

### 1. 5. 8. Adsorbce

Snížení koncentrace BA v potravinách pomocí adsorpce je relativně novou metodou. V oblasti výzkumu souvisejícího s potravinami jsou specifické adsorbenty pro biogenní aminy vzácné (Amghouz et al. 2014). Vlasová et al. (2011) studovali adsorpci tryptaminu a tyraminu z vodných roztoků na povrchu jemně dispergovaného oxidu křemičitého modifikovaného adsorpcí bovinního sérového albuminu. Ve své práci popisují imobilizaci těchto aminů na povrchu oxidu křemičitého v závislosti na hodnotě pH. Tameem et al. (2010) vyvinuli metodu pro extrakci různých aminů z potravy pomocí sorbentů na bázi etherů, u kterých byla pozorována dobrá účinnost u spermidinu, ale nižší účinnost vůči tryptaminu, putrescinu, histaminu a tyraminu. Tito autoři popsali adsorpční materiál na bázi hydrazonu s dobrou selektivitou pro alifatické aminy (v obou případech je pro účinnou extrakci aminů nutná destrukce vzorku, což omezuje jejich použití na oblast chemické analýzy). Amghouz et al. (2014) navrhl novou metodu ke zkoumání adsorpce BA ve víně pomocí adsorbentu obsahujícího sodnou formu komerčního fosforečnanu zirkoničitého (Na-ZrP). Tento materiál

vykazoval silnou adsorpční aktivitu na histamin a putrescin. Mechanismus adsorpce je dán iontovou výměnou s  $\text{Na}^+$ , která tvoří vodíkové vazby na povrchu Na-ZrP. Aplikace selektivního adsorpčního materiálu poskytuje další moderní metodu na snížení koncentrace BA v postfermentační fázi (Guo et al., 2015).

## 1. 6. Aminoxidázy

Aminoxidázy (AO) jsou enzymy patřící do třídy oxidativních deamináz, které jsou schopny rozkládat BA na příslušné aldehydy, amoniak a peroxid vodíku. Tato reakce lze vyjádřit rovnicí  $\text{R-CH}_2\text{NH}_2 + \text{O}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{R-CHO} + \text{NH}_3 + \text{H}_2\text{O}_2$ , kde R je aromatická nebo alifatická skupina. (Li a Lu, 2020). Tyto sloučeniny byly poprvé zmíněny v práci Yamada et al., 1965. Při studiu *Aspergillus niger* uvedli, že AO se mohou tvořit v myceliu plísní, když byly tyto kmeny kultivovány na médiu s monoaminem nebo diaminem jako jediným zdrojem dusíku. AO patří do třídy oxidoreduktáz, do níž patří monoaminoxidázy obsahující flavin (MAO), oxidázy obsahující měď (CuAOs) nebo diaminoxidázy (DAO). AO jsou široce rozšířeny u zvířat, rostlin a mikroorganismů a hrají zásadní roli v procesu oxidativní deaminace a udržování tělesné homeostázy v živých organizmech (Li a Lu, 2020). AO jsou umístěny na buněčné stěně jako antitoxin, který brání vstupu BA do buňky a udržuje acidobazickou rovnováhu uvnitř i vně buňky (Shalaby, 1996). AO však mohou být inhibovány mnoha různými látkami, jako je ethanol a acetaldehyd nebo působením některých léků (kyselina klavulanová, verapamil, acetylcystein a metoklopramid) (Sattler et al., 1988; Comas-Basté et al., 2019; Poveda, 2019). Jednou z hlavních příčin otravy BA je, že aktivity AO jsou inhibovány, což vede k silné akumulaci BA v lidském těle.

### 1. 6. 1. Aminoxidázy obsahující měď (CuAO)

Aminoxidázy obsahující měď (CuAO) oxidují primární aminy na aldehydy. Enzymy obsahují dva typy kofaktorů: 2,4,5-trihydroxyfenylalaninichinon (TPQ) a lysin tyrosylchinon (LTQ). CuAO obsahující TPQ jsou všudypřítomné, protože jsou široce rozšířeny v kvasinkách, bakteriích, houbách, zvířatech a rostlinách (Mcgrath et al., 2011). V současné době bylo provedeno mnoho studií s cílem objasnit mechanismus degradace aminů katalyzovaných CuAOs (Li a Lu, 2020). Aktivity CuAO vůči degradaci aminů byly studovány již mnoho let. CuAO byly nalezeny v mnoha mikroorganismech, jako je *Escherichia coli*, *Arthrobacter globiformis*, ale jsou distribuovány především v houbách, např. *Hansenula polymorpha* a *Pichia pastoris* (McGrath, 2011). Termostabilní CuAO izolovaná z *Arthrobacter crystallopoietes* KAIT-B-007 je schopná degradovat histamin (Sekiguchi et al., 2004). Studie Lee a Kim, 2013 popisuje možnost využití CuAO izolované z *Paenarthrobacter aurescens* (dříve *Arthrobacter aurescens*) TC-1, která byla klonována a exprimována v *E. coli*, získané rekombinantní enzymy vykazovaly degradační aktivitu pro  $\beta$ -fenylethylamin, tyramin a histamin.

### 1. 6. 2. Monoaminoxidázy obsahující flavin (MAO)

Podobně jako CuAO využívají monoaminoxidázy obsahující flavin (MAO) také molekulární kyslík jako akceptor elektronů, jedná se tedy o flavoprotein katalyzující oxidativní deaminaci BA (Alvarez a Moreno-Arribas, 2014). MAO přítomné v některých mikroorganismech jsou cennými biokatalyzátory pro oxidaci široké škály biomolekul včetně BA prostřednictvím současné redukce kyslíku na peroxid vodíku (Yagodina et al., 2002). V současnosti se studie MAO zaměřují především na identifikaci enzymu, analýzu genů kódujících tyto enzymy a hodnocení schopnosti degradace BA (Callejón et al., 2015; Hiroyuki et al., 1992, Schilling, 1995). MAO izolované z *Micrococcus luteus* byly identifikovány jako tyraminoxidázy kvůli jejich vysoké specifitě pro tyramin a jemu příbuzné sloučeniny (Okamura et al., 1976).

### 1. 6. 3. Multicopperoxidázy (MCO)

MCO jsou široce rozšířeny u zvířat, rostlin a mikroorganismů (Hoegger et al., 2006). Díky svým neškodným katalytickým produktům jsou široce využívány v mnoha oblastech života, jako je např. výroba biopaliv či v papírenském a potravinářském průmyslu (Coniglio et al., 2008; Mikolasch et al., 2002; Mikolasch et al., 2007). Bakteriální MCO mají ve srovnání s MCO izolovaných z hub širší substrátovou specifitu, jsou rezistentní k širšímu rozsahu pH a jsou odolnější vůči alkalickému prostředí (Solano et al., 2001; Callejón et al., 2016). Ačkoli jsou MCO v přírodě široce rozšířeny, aktivita MCO vůči aminům není ještě dostatečně prostudována (Li a Lu, 2020). Guarcello et al., 2016, izolovali kmeny degradující BA (*Lactocaseibacillus paracasei* subsp. *paracasei*, dříve *Lactobacillus. paracasei* subsp. *paracasei* CB9CT) ze sýrů a identifikovali MCO odpovědné za degradaci těchto aminů. V současné době Pištěková et al. (2020), hledali pomocí metody qPCR vhodné kmeny exprimující gen pro MCO u startérových nebo doplňkových kultur, sledovali také degradační schopnosti vybraných kmenů (*L. casei* CCDM 198) v mléce. Z jejich výsledků je patrné, že *L. casei* CCDM 198 vykazoval velmi dobré degradační schopnosti vůči putrescinu, histaminu, tyraminu a kadaverinu.

## 1. 7. Detekce a kvantifikace biogenních aminů

Zájem o stanovení biogenních aminů v potravinách je především z důvodu jejich potenciální toxicity. BA lze považovat i za chemické indikátory stavu suroviny, hygienických podmínek výrobních postupů a obecně kvality potravin. Sýr je komplexní matrice s vysokým obsahem tuku, bílkovin, peptidů, volných aminokyselin a anorganických kationtů, které ztěžují stanovení biogenních aminů, na rozdíl od jiných potravinových matric. Analytická účinnost může být ovlivněna vysokou variabilitou koncentrace BA v důsledku typu a původu sýra, podmínek výroby a zrání, mikrobioty a enzymatických aktivit přítomných v sýru (Nuñez a Medina, 2011).

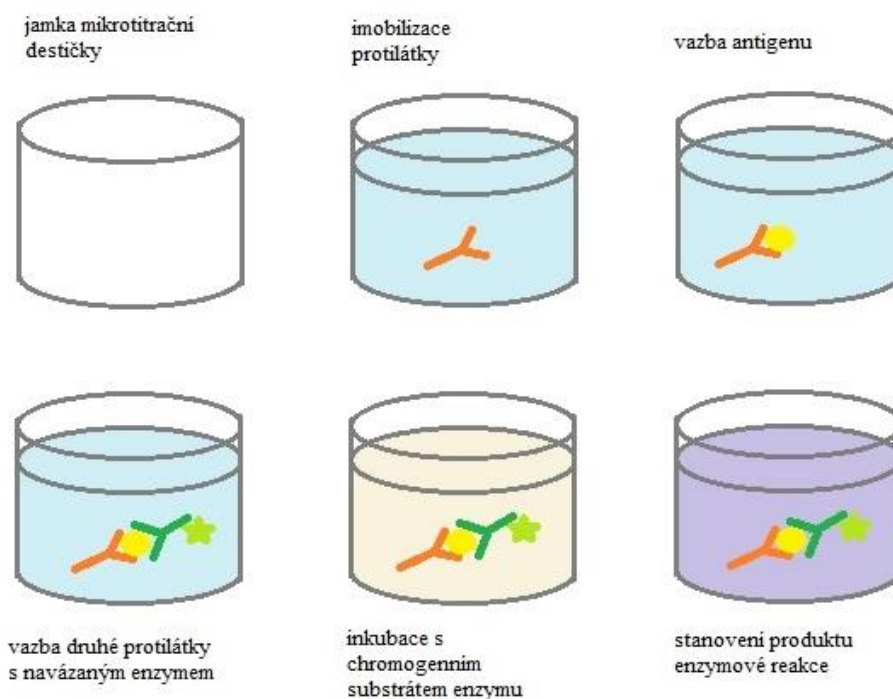
Extrakce BA z potravinářských matric je zásadním krokem v analytických postupech. Při extrakci biogenních aminů ze sýra bývají používána různá rozpouštědla a roztoky (kyselina chlorovodíková, trichloroctová, chloristá, sulfosalicylová a octová, borátový pufr, methanol a ethanol). Analytické techniky používané pro separaci a kvantifikaci biogenních aminů v sýrech jsou především chromatografické metody, které zahrnují tenkovrstvou chromatografií (TLC), plynovou chromatografií (GC), kapilární elektroforézu (CE) a vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií (HPLC) (Latorre-Mortalla et al., 2009; García-Moruno et al., 2005). Stanovení obsahu biogenních aminů těmito technikami vyžaduje předúpravu vzorku a relativně dlouhé doby analýzy (Nuñez a Medina, 2011).

Pro separaci a kvantifikaci biogenních aminů byla vyvinuta řada HPLC technik. Většina metod vyžaduje derivatizaci aminů před detekcí pomocí UV-VIS absorpce nebo fluorescence (Ordóñez et al., 2016; Ahmad et al., 2020). Pro derivatizaci jsou používána různá chemická činidla, zejména dansylchlorid, dabsylchlorid a o-ftaldehyd (OPA) s předkolonovou, kolonovou nebo postkolonovou derivatizací. Nedávno vyvinuté metody ultra-HPLC (U-HPLC) zvyšují rychlost, rozlišení a citlivost použitím částic menších než 2  $\mu\text{m}$ , kratších kolon a vyšších průtoků. Rychlá metoda U-HPLC spojená s on-line OPA postkolonovou derivatizací a fluorescenční detekcí umožnila stanovení 12 biogenních aminů v sýru za méně než 7 minut chromatografické eluce. U různých druhů sýrů U-HPLC s předkolonovou derivatizací s 6-aminochinolyln-hydroxy-sukcinmydilkarbamátem (AQC) oddělila 20 primárních a sekundárních biogenních aminů během 9 minut, zatímco pro HPLC separaci bylo zapotřebí 24 minut (Mayer et al., 2010; Nuñez a Medina, 2011). Autoři uvádějí limity detekce od 0,4 do 16,2 mg/kg a limity kvantifikace mezi 1,6 a 60,9 mg/kg. Byla vyvinuta také rychlá metoda nukleární magnetické rezonance s limitem detekce 0,6-1 mg/kg pro histamin (Schievano et al., 2009).

Molekulárně-biologické metody pro časnou a rychlou detekci bakterií produkujících BA se stávají alternativou k tradičním kultivačním metodám. Metody PCR zacílené na geny kódující dekarboxylační enzymy jsou rychlé a citlivé a umožňují identifikaci mikroorganismů produkujících BA v potravinách ještě před tím, než je sloučenina produkována. Multiplex PCR testy byly vyvinuty

pro detekci potenciálních producentů histaminu, tyraminu, putrescinu a kadaverinu širokou škálou Gram-positivních a Gram-negativních bakterií (Fernandez et al., 2006).

Enzymatické metody jsou ve stanovení BA stejně důležité jako metody chromatografické a molekulárně-biologické. ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) je založena na vazbě specifického antigenu na protilátku. Tato reakce je detekována změnou barvy za použití vázaného enzymu konjugovaného se substrátem (Obr. 5) (Nuñez a 2011). Enzymatické imunotesty slouží k identifikaci a stanovení koncentrace různých látek v biologických tekutinách. Použití reakcí antigen-protilátka činí tuto metodu selektivní, protože je specifická pro každou molekulu, konkrétně proteiny, hormony, vitaminy nebo léky (Aydin, 2015). Metody založené na ELISA již byly aplikovány i u stanovení BA jako slibná méně časově náročná a snadnější analytická technika (Sadeghi et al., 2019). Komerční kompetitivní přímá imunoanalýza ELISA (CD-ELISA) se ukázala jako specifická pro detekci histaminu a jako taková byla Jakšić et al. (2017) aplikována v rybích konzervách. Tato metoda byla porovnána s HPLC a prokázala dobrou korelaci ( $r = 0,977$ ) mezi oběma metodami s rozsahem koncentrací 16,95–216 mg/kg. Výsledky stanovení histaminu ukázaly, že CD-ELISA poskytuje spolehlivé a přesné hodnoty i při vyšších koncentracích. To lze považovat za důležitý výsledek, protože hlavním problémem jsou alternativy k drahým a časově náročným metodám. Test ELISA lze využít jako důležitý nástroj pro stanovení histaminu v produktech rybolovu (Nuñez a 2011).



Obr. 5: Princip ELISA (podle Kodíček et al., 2004)

## 1. 8. Mikroorganismy degradující biogenní aminy

Existuje mnoho strategií, jak předejít akumulaci BA v potravinách. Jednou ze známých metod, jak odstranit BA, které se v potravinách už nachází, je jejich přímé odstranění pomocí mikroorganismů, které jsou schopny BA degradovat a/nebo přidavek aminoxidáz (Ercan et al., 2013). Možnost odstranění BA z potravin touto cestou je založena na skutečnosti, že MAO, která je zodpovědná za detoxikaci BA přijímaných v potravě (Pištěková et al., 2020; Sun et al., 2022; Wang et al., 2022), je produkována i některými mikroorganismy, včetně plísní (např. z rodu *Aspergillus*, *Penicillium*, *Phoma* atd.) (Alvarez a Moreno-Arribas, 2014; Leuschner et al., 1998).

Stručný přehled mikroorganismů využívaných v potravinářském průmyslu, které jsou schopny redukovat množství biogenních aminů, je shrnut v Tab. 5.

Tab. 5: Mikroorganismy degradující BA (podle Alvarez a Moreno-Arribas, 2014).

Amin	Mikroorganismus	Matrice
Histamin, tyramin	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> , <i>Latilactobacillus sakei</i> , <i>Lactiplantibacillus pentosus</i> (dříve <i>Lactobacillus pentosus</i> ), <i>Pediococcus acidilactici</i> , <i>Rhodococcus</i> sp., <i>Arthrobacter</i> sp., <i>Micrococcus</i> sp., <i>Brevibacterium linens</i> , <i>Geotrichum candidum</i>	<i>in vitro</i>
Histamin, tyramin	<i>Brevibacterium linens</i>	munsterský sýr
Histamin	<i>Latilactobacillus sakei</i>	ryby
Histamin	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> , <i>Staphylococcus carnosus</i>	<i>in vitro</i>
Putrescin, kadaverin	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Staphylococcus intermedius</i>	<i>in vitro</i>
Histamin	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> , <i>Staphylococcus carnosus</i>	fermentovaná rybí omáčka
Histamin	<i>Staphylococcus xylosum</i>	<i>in vitro</i>
Tyramin	<i>Lacticaseibacillus casei</i> , <i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	<i>in vitro</i>
Histamin, tyramin	<i>Lacticaseibacillus casei</i>	modelový sýr
Histamin, tyramin, putrescin	<i>Lacticaseibacillus casei</i> , <i>Lacticaseibacillus hilgardii</i> , <i>Pediococcus parvulus</i> , <i>Oenococcus oeni</i> , <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> , <i>Pediococcus pentosaceus</i>	kultivační médium
Histamin, tyramin, putrescin	<i>Lacticaseibacillus casei</i>	víno
Tyramin, putrescin	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	<i>in vitro</i>
Histamin, tyramin, putrescin	<i>Penicillium citrinum</i> , <i>Alternaria</i> sp., <i>Phoma</i> sp., <i>Ulocladium chartarum</i> , <i>Epicoccum nigrum</i>	<i>in vitro</i> /víno

Všeobecně přijímaným faktem je, že schopnost mikroorganismů degradovat BA je kmenově specifická (Zaman et al., 2014). Použití takových kmenů se jeví jako vhodná strategie ke snížení hodnot BA ve fermentovaných potravinách, kde je velmi obtížné zabránit akumulaci BA z důvodu přítomnosti BA-produkujících BMK, které jsou součástí obvyklé mikrobioty dané potraviny, v důsledku čehož jsou BA přítomny ve finálních fázích výrobního procesu (Fadda et al., 2001). Použití startérových kultur, které jsou schopny degradovat biogenní aminy a zároveň jsou dekarboxyláza-negativní je považováno za jednu z nejslibnějších biotechnologických strategií prevence hromadění BA v hotových potravinách. Takový způsob ošetření surovin způsobuje minimální nebo žádné změny organoleptických vlastností výsledné potraviny.

Ve studii Leuschner et al. (1998) byla prokázána schopnost některých mikroorganismů izolovaných z potravin degradovat BA *in vitro*. U druhů *Lactiplantibacillus plantarum*, *Latilactobacillus sakei*, *Lactiplantibacillus pentosus* (dříve *Lactobacillus pentosus*), *Pediococcus acidilactici*, *Rhodococcus* sp., *Arthrobacter* sp., *Micrococcus* sp., *Brevibacterium linens* a *Geotrichum candidum* byla zaznamenána schopnost rozkladu tyraminu a histaminu *in vitro*. Stejná skupina studovala potenciál kmenů *B. linens* rozkládat histamin a tyramin v průběhu povrchového zrání munsterského sýru, kdy poprvé naznačují možnost použití BA-degradujících mikroorganismů ke snížení obsahu BA v potravinách (Leuschner a Hammes, 1998).

O pár let později byla zkoumána schopnost čtyř kmenů *Lb. sakei* degradovat histamin v modelovém systému, tyto kmeny byly izolovány z přirozeně fermentované rybí paštiky. Autoři došli k závěru, že použitím tohoto kmene pro výrobky z ryb by mohli úspěšně snížit riziko zvýšené koncentrace tohoto aminu (Dapkevicius et al., 2000). Ve studiích prováděných na rybách a fermentovaných masných výrobcích (suchých klobásách) byla zjištěna přítomnost určitých bakteriálních kmenů, které byly schopny snižovat obsah BA, i když přesný mechanismus, díky kterému k bakteriální degradaci BA dochází, není dosud znám (Dapkevicius et al., 2000; Fadda et al., 2001; Gardini et al., 2002). García-Ruiz et al. (2011) ve své studii sledovali skupinu BMK asociovaných s výrobou vína. Studovali jejich schopnost rozkládat BA a bylo ověřeno, že jeden kmen *Lb. casei*, *Lentilactobacillus hilgardii* (dříve *Lactobacillus hilgardii*), *Pediococcus parvulus*, *Oenococcus oeni*, dva kmeny *L. plantarum* a tři kmeny *Pediococcus pentosaceus* významně snižují koncentraci histaminu, tyraminu a putrescinu v kultivačním médiu. Dále bylo ověřeno, že jsou tyto kmeny schopny růstu ve vínu podobném médiu a vykazují užitečnou schopnost rozkládat kyselinu jablečnou. Capozzi et al. (2012) analyzovali 26 kmenů *Lactiplantibacillus plantarum* pro jejich schopnost odbourávat biogenní aminy běžně vyskytující se při fermentaci vína. Vybrali dva kmeny *L. plantarum* kvůli jejich schopnosti degradovat putrescin a tyramin. V jejich práci byla hodnocena degradace BA *in vitro*. U těchto dvou kmenů *L. plantarum* bylo zjištěno, že fungují synergicky. Cueva et al. (2012) izolovali 44 révových

a vinohradnických půdních hub ze čtyř různých oblastí ve Španělsku a ve své práci studovali degradaci BA *in vitro* v mikrofermentačním systému. Všechny houby byly schopny degradovat alespoň dva různé primární aminy. U druhů *Penicillium citrinum*, *Alternaria* sp., *Phoma* sp., *Ulocladium chartarum* a *Epicoccum nigrum* bylo zjištěno, že vykazují nejvyšší kapacitu pro degradaci BA (Alvarez a Moreno-Arribas, 2014). Společně tato zjištění ukazují, že přidavek degradujících mikrobiálních kmenů schopných snížit obsah BA může být použit při výrobě sýrů a dalších fermentovaných potravin (Herrero-Fresno et al., 2012). Mezi takové mikroorganismy patří např. BMK *Companilactobacillus farciminis* (dříve *Lactobacillus farciminis*), *Lactiplantibacillus plantarum* nebo *Pediococcus acidilactici* (Lee et al., 2021). Voigt a Eitenmiller (1978) analyzovali bakterie izolované z mléčných výrobků a dospěli k závěru, že tyto bakterie obvykle postrádají aminoxidázy. Navíc těchto několik bakterií, u kterých nebyla zjištěna přítomnost aminoxidázy, vykazovalo vysokou aktivitu tyrosin- nebo histidin-dekarboxylázy, a proto jsou potenciálními producenty BA. Vzorky z různých sýrů byly testovány na přítomnost BA-degradujících bakterií mléčného kvašení a bylo zachyceno 17 izolátů, které byly schopny rozkládat tyramin a histamin, tyto kmeny byly identifikovány pomocí sekvenování genu pro 16S rRNA (Herrero-Fresno et al., 2012).

Některé kmeny *Bacillus amyloliquefaciens* a *Staphylococcus carnosus* schopné rozkládat histamin a *Staphylococcus intermedius* a *Bacillus subtilis* degradující putrescin a kadaverin byly izolovány z malajské rybí omáčky (Tepkasikul et al., 2023; Zaman et al., 2014). Bylo také zjištěno, že *B. amyloliquefaciens* a *S. carnosus* jsou schopné snížit hladiny histaminu v rybí omáčce v průběhu fermentace (Zaman et al., 2011). Martuscelli et al. (2000) ve své práci uvádějí, že některé kmeny jiných druhů rodu *Staphylococcus*, např. *Staphylococcus xylosum*, izolované z italských fermentovaných salámů, jsou schopny degradovat histamin. Použití jednoho z těchto kmenů jako startérové kultury u sušených klobás mírně snížilo obsah BA (Gardini et al., 2002). Studie také ukázaly, že hladiny histaminu jsou významně sníženy, když se do fermentovaných masných výrobků přidá směs startérových kultur (*Lacticaseibacillus casei* a *Staphylococcus xylosum*). Použití *L. casei* jako startérové kultury může vyvolat rychlé okyselení, inhibovat růst mikrobů a poškodit buněčnou membránu, což má za následek snížení aktivity mikrobiální dekarboxylace a tím snížení tvorby biogenních aminů (Zeng et al., 2021). U *Companilactobacillus farciminis* (*Lactobacillus farciminis*) bylo zjištěno, že by mohl odbourávat histamin, tyramin a putrescin v červeném víně (Callejon et al., 2014). Ming et al. (2019) použili *S. xylosum* a *L. plantarum* k fermentaci paprikové klobásy a výsledky ukazují, že mohou významně zlepšit její zdravotní nezávadnost a kvalitu. Kmeny *Lacticaseibacillus casei* a *Lb. plantarum* izolované z fermentovaných masných výrobků vyráběných v Argentině byly schopny snížit hladiny tyraminu, i když s různou účinností (Fadda, et al., 2001). Qiang a Zhenjiang (2021) testovali pět kmenů bakterií BMK s vysokou účinností



degradace BA, mezi nimiž měl nejlepší schopnost odbourávat biogenní aminy kmen *Lactiplantibacillus plantarum* 30. *L. plantarum* 30 byl schopen redukovat histamin o 74 % a tyramin o 90 %. Tento kmen dobře rostl v prostředí s obsahem soli 0-9 % a při pH 4,5-8,5. Daný kmen nevykazoval žádnou dekarboxylační aktivitu, proto se jeví jako ideální startérová kultura (Zeng et al., 2021). Některé kmeny *Kocuria varians* (dříve *Micrococcus varians*) jsou také schopny rozkládat tyramin, ale zároveň jsou označovány jako producenti tyraminu a/nebo histaminu. Kmeny *Lb. casei* izolované z různých zdrojů byly také schopny degradovat BA. Je pozoruhodné, že klidové buňky jednoho kmene *Lb. casei* byly schopny degradovat 98 hmotnostních procent 2,5 mM roztoku tyraminu za 96 hodin. Naočkování kmene *Lb. casei* z komerčního preparátu může snížit koncentraci BA v různých rostlinných silážích (Nishino et al., 2007), i když autoři tvrdí, že se zde může jednat o specifický antagonismus *Lb. casei* proti BA-produkujícím mikroorganismům.

Použití bakterií s aminoxidační aktivitou, popř. oxidačních enzymů bylo popsáno v několika studiích. Naila et al. (2012) studovali míru degradace histaminu diaminoxidázou v modelovém (pufr) a skutečném systému (tuňáková polévka z rybí pasty). Pomocí enzymu diaminoxidázy byli schopni redukovat obsah histaminu v obou systémech z 500 mg/l na nedetekovatelné hladiny (<0,5 mg/kg). Bylo také zjištěno, že histamin může být degradován při vysokých koncentracích soli (12 %) a pH 6,7, ale také se v tomto stavu mohou lišit požadované organoleptické vlastnosti produktu. Dapkevicius et al. (2000) také zkoumali degradaci histaminu diaminoxidázou u ryb a rybích produktů s použitím 2 % NaCl, 12 % sacharózy a 0,05 % cysteinu a zjistili, že aminoxidáza byla při degradaci histaminu účinná pouze v přítomnosti cysteinu. Použití diaminoxidázy může být potenciální metodou pro degradaci histaminu, ale budou třeba další studie, které by zkoumaly její účinky na degradaci dalších biogenních aminů a také na vlastnosti daných potravin.

## 2. CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE

Cílem disertační práce je izolovat a identifikovat mikroorganismy zodpovědné za degradaci biogenních aminů v potravinách. U izolovaných mikroorganismů bude srovnávána schopnost degradace biogenních aminů v definovaných podmínkách *in vitro*. Dílčí cíle práce jsou postaveny následovně:

1. Provedení skríningu mikroorganismů izolovaných z potravin na schopnost degradovat biogenní aminy.
2. Zjištění ideálních podmínek pro růst námi izolovaných mikroorganismů.
3. Identifikace mikroorganismů, u kterých byla zjištěna schopnost degradace biogenních aminů.
4. Stanovení míry degradace vybraných BA v závislosti na vnějších podmínkách:
  - doba a způsob a kultivace
  - teplota
  - hodnota pH
  - koncentrace NaCl
5. Vyvození doporučení a návrhů dalších směrů výzkumu v oblasti degradace biogenních aminů mikroorganismy.

### 3. MATERIÁL A METODIKA

Experimenty se zabývaly detekcí mikroorganismů schopných degradovat biogenní aminy v komerčně dostupných potravinách, jejich identifikací, stanovením základních biochemických charakteristik a následným studiem kinetiky rozkladu biogenních aminů za stanovených podmínek *in vitro* pomocí metody HPLC.

#### 3. 1. Materiál

##### 3. 1. 1. Použité mikroorganismy

Testované a identifikované kmeny byly získány z komerčně dostupných potravin a dále z produktů vyrobených v potravinářských laboratořích FT UTB (viz kapitola 3.2.1.). Pro následně prováděné experimenty byly vybrány následující kultury:

**Kultura *Bacillus altitudinis* IB84** – izolována z taveného sýru zakoupeného v obchodní síti v ČR

**Kultura *Bacillus pumilus* IB26** – izolována ze sýru typu gouda poskytnutého potravinářskými laboratořemi FT UTB

**Kultura *Bacillus safensis* IB731** – izolována ze sušeného mléka zakoupeného v obchodní síti v ČR

**Kultura *Bacillus subtilis* IB23** – izolována ze sýru typu gouda poskytnutého potravinářskými laboratořemi FT UTB

**Kultura *Acinetobacter pittii* IB5** – izolována z kefirového mléka zakoupeného v obchodní síti v ČR

**Kultura *Micrococcus luteus* IB16** – izolována z trvanlivé smetany do kávy zakoupené v obchodní síti v ČR

**Kultura *Enterobacter cloacae* IB62** – izolována z bílého krémového jogurtu zakoupeného v obchodní síti v ČR

**Kultura *Serratia marcescens* IB11** – izolována z měkkého sýru zakoupeného v obchodní síti v ČR

**Kultura *Pseudomonas koreensis* IB431** – izolována z měkkého sýru poskytnutého potravinářskými laboratořemi FT UTB

**Kultura *Pseudomonas fulva* IB266** – izolována z měkkého sýru poskytnutého potravinářskými laboratořemi FT UTB

**Kultura *Serratia ureilytica* IB1** – izolována ze sýru typu ementál zakoupeného v obchodní síti v ČR

**Kultura *Agrobacterium radiobacter* (dříve *Agrobacterium tumefaciens*, *Rhizobium radiobacter*) IB102** – izolována z hrušky z vlastní produkce

### 3. 1. 2. Kultivační média, chemikálie a roztoky

#### Chemikálie

Chlorid sodný (Lach-Ner, ČR)  
Destilovaná voda  
Ethanol 96% (Merck, Německo)  
Glycerol 30% (Merck, Německo)  
Hydroxid sodný (Merck, Německo)  
Kyselina chlorovodíková (Merck, Německo)

#### Fyziologický roztok

8,5 g NaCl bylo rozpuštěno v 1000 ml destilované vody, sterilizováno v autoklávu 20 minut při 120 °C

#### Roztok biogenních aminů

2 g histaminu, kadaverinu, putrescinu, tryptaminu, tyraminu a β-fenylethylaminu (vše Merck, Německo) bylo rozpuštěno v 1000 ml destilované vody. Pomocí 1M HCl bylo upraveno pH roztoku na 6,8. Roztok byl poté sterilizován filtrací pomocí filtru o porozitě 0,22 μm.

#### Složení minerálního média MM1

Roztok biogenních aminů.....	100 ml
Roztok KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pufry (pufry A).....	20 ml
Roztok Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .12H <sub>2</sub> O pufry (pufry B).....	80 ml
Roztok stopových prvků.....	2 ml
Roztok CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O.....	10 ml
Roztok Fe(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O.....	10 ml
Roztok Mg(SO <sub>4</sub> ).7H <sub>2</sub> O.....	10 ml
Roztok NaCl.....	10 ml

Doplněno destilovanou vodou na 1000 ml. pH pro jednotlivé experimenty bylo upraveno přidáním 1,2 M HCl. Kultivační médium bylo poté po 5 ml rozděleno do zkumavek a 20 minut při 120 °C sterilizováno v autoklávu.

Tuhé MM1 bylo připraveno přidáním 12 g agaru (HiMedia, Indie) do 1000 ml tekutého MM1. Kultivační médium bylo poté 20 minut při 120 °C sterilizováno v autoklávu a následně rozlito do Petriho misek.

### **Roztok pufru A**

9,07 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Merck, Německo) bylo rozpuštěno v 1000 ml destilované vody

### **Roztok pufru B**

23,9 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  (Merck, Německo) bylo rozpuštěno v 1000 ml destilované vody

### **Roztok stopových prvků**

0,043 g .....  $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (Merck, Německo)

0,057 g .....  $\text{H}_3\text{BO}_3$  (Merck, Německo)

0,043 g .....  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (Merck, Německo)

0,037 g .....  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (Merck, Německo)

0,025 g .....  $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (Merck, Německo)

0,04 g .....  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (Merck, Německo)

Doplněno destilovanou vodou na 1000 ml.

Roztok byl poté 20 minut při 120 °C sterilizován v autoklávu.

### **Roztok $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$**

1 g  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (Merck, Německo) bylo rozpuštěno v 1000 ml destilované vody

### **Roztok $\text{Mg}(\text{SO}_4) \cdot 7\text{H}_2\text{O}$**

10 g  $\text{Mg}(\text{SO}_4) \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (Merck, Německo) bylo rozpuštěno v 1000 ml destilované vody

### **Roztok $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$**

3 g  $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (Merck, Německo) bylo rozpuštěno v 1000 ml destilované vody

### **Roztok NaCl**

50 g NaCl bylo rozpuštěno v 1000 ml destilované vody

### **Složení M17 broth**

42,5 g M17 broth (Merck, Německo) bylo rozpuštěno v 1000 ml destilované vody. Kultivační médium bylo poté po 5 ml rozděleno do zkumavek a 20 minut při 120 °C sterilizováno v autoklávu.

### **Složení M17 agaru**

52,2 g M17 broth (Merck, Německo) a 12 g agaru bylo rozpuštěno v 1000 ml destilované vody. Kultivační médium bylo 20 minut při 120 °C sterilizováno v autoklávu a následně rozlito do Petriho misek.

### **Složení Nutrient broth (NB) s biogenními aminy**

25 g NB (HiMedia, Indie) bylo doplněno destilovanou vodou do 1000 ml a 20 minut při 120 °C sterilizováno v autoklávu. Ke kultivačnímu médiu bylo poté přidáno 100 ml roztoku BA (sterilizován filtrací) a po 5 ml za aseptických podmínek rozděleno do zkumavek.

### **Složení Nutrient broth (NB) s biogenními aminy a přídatkem NaCl**

2 g NaCl bylo přidáno k NB (HiMedia, Indie) o objemu 1000 ml. Další postup byl shodný s přípravou NB s biogenními aminy.

### **Roztok HClO<sub>4</sub>**

51,1 ml HClO<sub>4</sub> (Merck, Německo) přidáno do 500 ml destilované vody (1,2 M HClO<sub>4</sub>)

### **Roztok dansylchloridu**

5 g dansylchloridu bylo rozpuštěno v 1000 ml acetonu

### **Karbonátový pufr**

K 50 ml pufru A bylo přidáno takové množství pufru B, aby výsledná směs pufrů měla hodnotu pH 9,2. K takto vzniklé směsi bylo přidáno 16,65 g uhličitanu draselného (Merck, Německo), aby výsledná hodnota pH karbonátového pufru byla v rozmezí 11,0–11,1.

- **pufr A**

42 g NaHCO<sub>3</sub> (Merck, Německo) bylo rozpuštěno v 1000 ml destilované vody

- **pufr B**

53 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (Merck, Německo) bylo rozpuštěno v 1000 ml destilované vody

### **Agarózový gel**

1% agarózový gel (SeaKem LE Agarose, Lonza, Švýcarsko) s přídatkem 3-8 kapek ethidiumbromidu o koncentraci 10 mg/ml (SERVA Electrophoresis GmbH, Německo)

### **Komerční směsi pro metody PCR**

100 bp Plus DNA Ladder (Malamité, ČR)

FastStart Universal SYBR Green Master (Merck, Německo)

GoTaq® G2 Hot Start Green Master Mix (ROCHE, Německo)

### **Sady pro izolaci DNA a purifikaci templátu**

High Pure PCR Template Preparation Kit, (ROCHE, Německo)

High Pure PCR Product Purification Kit, (ROCHE, Německo)

NucleoSpin Gel and PCR Clean-up, (Macherey - Nagel, Německo)

NucleoSpin Genomic DNA from tissue (Macherey - Nagel, Německo)  
UltraClean Microbial DNA Isolation Kit (Qiagen, Německo)

### **3. 1. 3. Laboratorní přístroje a pomůcky**

Analytické váhy Denver Instrument SI-64A (USA)  
Aseptický laminární box Telstar Bio II-A (Španělsko)  
Automatické mikropipety Eppendorf Research (Německo)  
Bio Vortex V1 Biotech (Česká republika)  
Centrifuga Jouan MR23i (USA)  
Centrifuga Hettich Rotanta 460 R (Německo)  
Elektroforetická aparatura Scie-Plas HU10 Mini-Plus (Velká Británie)  
Filtry Millex GS Filter Unit 0,22 µm (Merck, Německo)  
Chromatografický systém Dionex HPLC UltiMate 3000, Thermo Fischer Scientific, (Massachusetts, USA)  
Kombinovaná chladnička Beko (Turecko)  
Laboratorní sterilizátor Wolf SANOclav (Německo)  
Laboratorní třepačky GLF (Německo)  
Laboratorní váhy 440-47N KERN (Německo)  
Mikroskop Olympus CX 41 (Japonsko)  
Mikrovlnná trouba Electrolux (ČR)  
pH metr inoLab pH/ION 735 se skleněnou elektrodou SenTix 81 (Německo)  
Stomacher Seward (Velká Británie)  
Termoblok Dry Block Heating Thermostat BioSan Bio TDB-100 (Lotyšsko)  
Termocykler PIKO, Finnzymes, Thermo Fisher Scientific (USA)  
Termostat BT 120 – Laboratorní přístroje Praha (Česká republika)  
UV transluminátor SynGene Imaging In Genius (Velká Británie)

Při práci byly také používány běžné laboratorní pomůcky jako stojany, dávkovače, pipety, špičky, mikrobiologické kličky, mikrozkuhavky a laboratorní sklo jako vzorkovnice, zkuhavky, vialky, odměrné nádoby atd.

### **3. 2. Zvolená metodika a postup zpracování**

V prvním experimentu byl proveden skrining potravin na přítomnost bakterií, které jsou schopny biogenní aminy degradovat. Tyto mikroorganismy byly následně identifikovány pomocí několika metod (MALDI-TOF MS), včetně molekulárně-biologických (PCR s následnou sekvenací genu pro 16S rRNA). U všech vyizolovaných a identifikovaných kmenů byly stanoveny základní biochemické charakteristiky a sledována jejich schopnost redukce následujících 6 biogenních aminů: kadaverinu (KAD), histaminu (HIM), β-fenylethylaminu (PEA), putrescinu (PUT), tyraminu (TYM), tryptaminu (TRY) metodou HPLC.

Vybrané kmeny bakterií pozitivní na schopnost degradace biogenních aminů (jednoho nebo více) byly ve dvou následujících experimentech podrobeny dalším analýzám.

### 3. 2. 1. Skríníng a izolace

V experimentu I byl proveden skríníng mikroorganismů degradujících BA. Tento skríníng byl prováděn v 895 vzorcích potravin rostlinného i živočišného původu a nápojů (Tab. 6). Ze získaných vzorků potravin bylo sterilně odebráno 5 g materiálu, který byl zředěn v poměru 1:9 ve sterilním fyziologickém roztoku a následně zhomogenizován ve stomacheru. Inokulum bylo následně připraveno vždy ve 3 opakováních. Do 5 ml tekutého MM1 s přídavkem BA bylo zaočkováno 100 µl testované suspenze dané potraviny. V případě nápojů bylo do MM1 rovnou očkováno 100 µl testovaného nápoje. Schopnost růstu v minerálním médiu byla srovnávána s kontrolním vzorkem, kde byla sledována schopnost růstu bakterií v MM1 bez přítomnosti BA (substrátu organického původu).

*Tab. 6: Seznam potravin a nápojů, u nichž se prováděl skríníng na přítomnost mikroorganismů degradujících biogenní aminy*

<b>Matrice</b>	<b>Počet vzorků</b>
Masné výrobky	471
Sýry	144
Ostatní mléčné výrobky	128
Ovoce a zelenina	45
Víno	39
Pivo	16
Čokoláda	13
Čaj a káva	12
Ostatní	27

Tyto vzorky byly v dalším kroku kultivovány při teplotě 30 °C po dobu 24, 48, 72 hodin a jednoho týdne. V těchto časových intervalech byl sledován růst dané bakteriální kultury. Při pozitivním záchytu byla kultura následně přeočkována na tuhé MM1 s přídavkem BA a dále kultivována po dobu 24 a 48 hodin při 30 °C. Jednotlivé kolonie byly poté izolovány a identifikovány. Následující analýzy každého kmene byly zhotoveny vždy ve 3 opakováních.

Při pozitivním záchytu byly jednotlivé vzorky z MM1 agaru přeneseny na NB agar, kde bylo zaočkováno 100 µl bakteriální suspenze a ty byly 24 hod. kultivovány při 30 °C. Z jednotlivých kolonií byly připraveny křížové roztěry všech izolátů, které byly následně kultivovány 24 hodin při 30 °C. Z izolovaných čistých kolonií byly vytvořeny zásobní kultury tak, že se kultura z misky přenesla kličkou do bujónu, kde se nechala 24 hod při 30 °C pomnožit. Poté bylo 600 µl suspenze smícháno se 600 µl sterilního 30% glycerolu. Takto připravené zásobní kultury byly zamrazeny při -70 °C.



### 3. 2. 2. Stanovení biochemických charakteristik jednotlivých kmenů

Získané vzorky byly podrobeny taky základním biochemickým testům.

- Gramovo barvení, KOH test
- U G+ mikroorganismů katalázový test
- U G– mikroorganismů oxidázový test

### 3. 2. 3. Metoda hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF

Identifikace mikroorganismů, které se podařilo izolovat, byla provedena pomocí metody MALDI-TOF MS (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight mass spectrometry – hmotnostní spektrometrie s laserovou desorpcí a ionizací za účasti matrice s průletovým analyzátozem). Z důvodu časové i finanční náročnosti a vysokých požadavků na vybavenost laboratoří byl tento krok proveden ve Výskumném centru AgroBioTech na Slovenské poľnohospodárske univerzite v Nitře, Fakultě záhradnictva a krajinného inžinierstva za asistence prof. Ing. Miroslavy Kačániové, Ph.D. Před odesláním na MALDI identifikaci byly kultury nejdříve oživeny. Ze zásobních kultur byly provedeny křížové roztěry na NB agar, které byly následně kultivovány 24 hod. při 30 °C. Po uplynulé době kultivace byla bakteriální kultura klíčkovou převedena do mikrozkušavky typu Eppendorf se 150 µl sterilní destilované vody a 450 µl 96% etanolu. Takto zpracované vzorky byly následně odeslány na analýzu.

### 3. 2. 4. Sekvenování kmenů schopných degradovat biogenní aminy

Další metodou identifikace vybraných izolovaných kmenů byla sekvenční analýza genu pro 16S rRNA. Před samotnou izolací DNA byly kultury nejdříve oživeny. Ze zásobních kultur byly provedeny křížové roztěry na NB agar, které byly následně kultivovány 24 hodin při 30 °C. Izolace DNA byla provedena odebráním jedné bakteriální kolonie a jejím resuspendováním v 50 µl deionizované vody. Suspenze bakteriálních buněk byla povařena v termobloku po dobu 5 minut při teplotě 98 °C. Bakteriální lyzát byl centrifugován 3 minuty při 4500 RPM. Pro PCR bylo odebráno 1 µl supernatantu. Metodologie této části práce vychází z publikací Christensen a Bisgaard, 2010; Simmon et al., 2006.

Pro následnou amplifikaci byl použit forward primer 341F (5'-CCTACGGGAGGCAGCAG-3') a reverse primer 907R (5'-CCGTCAATT CCTTTGAGTTT-3'), oba o koncentraci 0,4 µmol/l (Zhao et al., 2008). PCR byla provedena pomocí G2 Hot Start Green Master Mix (ROCHE, Germany). Reakční směs byla složena z 10 µl směsi master mixu komerčního kitu, 1 µl forward, 1 µl reverse primeru, 1 µl templátové DNA a 7 µl deionizované vody. Negativní kontrola byla složena ze stejného objemu vzorku bez DNA templátu, jehož objem byl nahrazen sterilní destilovanou vodou. Podmínky PCR byly upraveny podle pokynů dodavatele, viz Tab. 7.

Amplifikované produkty byly analyzovány na 1% (w/v) agarózovém gelu s přísadkou ethidiumbromidu. Analýza probíhala při 90 V, 400 mA po dobu

25 minut. Jako velikostní standard byl použit 100 bp Plus DNA Ladder, (Malamité, ČR). Detekce produktů byla provedena pomocí UV transluminátoru.

Pro následnou sekvenaci bylo 5 µl amplifikované a purifikované DNA smícháno s 5 µl primeru (5 µM) 907R. Samotné sekvenování bylo prováděno externí firmou SEQme s.r.o. (SEQme, Dobříš). Získané sekvence byly upraveny v programu GATC Viewer a výsledky sekvenování byly zpracovány a vyhodnoceny pomocí algoritmu BLAST (volně dostupný prohledávací algoritmus „The Basic Local Alignment Search Tool“). Tento algoritmus pro analýzu výsledků sekvenovaných genů využívá databázi MicroSeq, GenBank nebo SmartGeneIDN (Simmon et al., 2006).

Tab. 7: Podmínky PCR

Krok	Teplota (°C)	Čas (min)	Počet cyklů
Denaturace	94	5	1
	95	1	
Amplifikace	56	1	35
	72	1,5	
Extenze	72	10	1

### 3. 2. 5. Sledování kinetiky degradace biogenních aminů

Vliv vnějších podmínek na míru degradace biogenních aminů byl studován v rámci kultivace jednotlivých kmenů za různě definovaných podmínek a jejich kombinací.

Kultivace vybraných kmenů probíhala aerobně i anaerobně v médiu o různých hodnotách pH (5,0; 6,0; 7,0; 8,0), různých koncentrací NaCl (0 %, 1 %, 2 %, 3 % w/v) a za různých teplot (8 °C, 10 °C, 23 °C a 30 °C).

Pro sledování vlivu jednotlivých faktorů na míru degradace byly vybrány kmeny *Bacillus subtilis* IB23 a *Bacillus pumilus* IB26.

### Sledování všeobecné schopnosti degradace

V experimentu II bylo z 98 získaných a identifikovaných MO ze vzorků potravin vybráno 13 kmenů, u kterých byla sledována celková schopnost degradace kadaverinu, histaminu, β-fenylethylamin, putrescinu, tyraminu, tryptaminu.

Izolované zásobní kultury byly oživeny přenesením inokula do NB bujónu, kde byly kultivovány 24 hodin při 30 °C. Po nárůstu kultury bylo 100 µl bakteriální suspenze zaočkováno do 5 ml MM1 s BA. Jako kontrola pro stanovení výchozího obsahu BA v bujónu sloužily 3 vzorky MM1 s BA, které nebyly zaočkovány MO a byly odebrány k analýze v čase, kdy byly ostatní zkumavky s bujónem zaočkovány. Každý vzorek byl zaočkován do 2 paralelních zkumavek pro jednotlivé odběrové časy (celkem tedy 10 paralelních vzorků pro každý testovaný kmen). Takto připravené vzorky byly opět kultivovány 12 hod.

při 30 °C. Po kultivaci byla živná média centrifugována (4500 RPM, 10 minut). Do mikrozkušavky Eppendorf bylo odebráno 650 µl supernatantu a následně přidáno 650 µl kyseliny chloristé v koncentraci 1,2 mol/l. Následující analýzy každého vzorku byly zhotoveny vždy ve 3 opakováních. Takto připravené vzorky byly zamrazeny a přichystány na derivatizaci. Stejným způsobem byly odebrány vzorky v časech 24, 36, 48 a 72 hod. u kmenů *Bacillus subtilis* IB23, *Bacillus pumilus* IB26, *Acinetobacter pittii* IB5, *Micrococcus luteus* IB16, *Enterobacter cloacae* IB62, *Bacillus safensis* IB731, *Bacillus altitudinis* IB84 *Agrobacterium radiobacter* IB102, *Serratia ureilytica* IB1, *Serratia marcescens* IB11, *Pseudomonas koreensis* IB431, *Klebsiella pneumoniae* IB148, *Pseudomonas fulva* IB266.

### Schopnost degradace biogenních aminů kmeny *Bacillus subtilis* IB23 a *Bacillus pumilus* IB26 v závislosti na vnějších podmínkách

V experimentu III byla sledována míra degradace BA za různých teplot, při různém pH a způsobu kultivace u kmene *B. subtilis* IB23.

Pro práci s kmenem *B. subtilis* IB23 byly připraveny 4 varianty MM1 s BA, kdy bylo jeho pH postupně pomocí HCl a NaOH upraveno na 5,0; 6,0; 7,0 a 8,0±0,1. Do 5 ml takto připraveného média bylo zaočkováno 100 µl 24 hod. pomnožené kultury. Všechna zaočkováná média o různých variantách pH byla kultivována aerobně i anaerobně při různých teplotách, pro které byly stanoveny odběrové časy v závislosti na kultivační teplotě (Tab. 8)

Tab. 8: Odběrové časy pro jednotlivé teploty kultivace kmene *B. subtilis* IB23

Teplota (°C)	Čas (h)				
8±1	12	24	48	72	96
23±1	6	12	24	48	72
30±1	6	12	24	36	48

V experimentu IV byla sledována další degradace BA, pro tento experiment byly zvoleny kmeny *Bacillus subtilis* IB23 a *Bacillus pumilus* IB26. U těchto kmenů byla sledována schopnost degradace při rozdílných teplotách, hodnotách pH (5,0; 7,0; 8,0±0,1) a obsahu NaCl (0, 1, 2, 3 % w/v) v MM1 a NB. Pro jednotlivé teploty byly stanoveny různé odběrové časy (Tab. 9). Experiment s NB probíhal v menším rozsahu, jelikož zde byl důvodný předpoklad, že v nutričně bohatším médiu budou *Bacillus subtilis* IB23 i *Bacillus pumilus* IB26 degradovat BA v menší míře. Rozdílné parametry kultivace jsou uvedeny v Tab. 10. Další postup byl shodný s postupem přechodného experimentu.

Tab. 9: Odběrové časy pro jednotlivé teploty kultivace kmenů *B. subtilis* IB23 a *B. pumilus* IB26

Teplota (°C)	Čas (h)					
10±1	12	24	36	48	72	96
23±1	6	12	24	36	48	72
30±1	4	8	12	24	36	48

Tab. 10: Sledované vnější faktory při kultivaci kmenů *B. subtilis* IB23 a *B. pumilus* IB26

	MM1	NB
pH	5	
	7	7
	8	
NaCl (%)	0	0
	1	
	2	
	3	2

Po ukončení kultivace byly vzorky dle již zmíněného postupu připraveny na následnou derivatizaci.

### 3. 2. 6. Detekce biogenních aminů metodou HPLC

Koncentrace daných biogenních aminů v jednotlivých experimentech byla stanovena metodou HPLC (Fernández et al., 2007b).

#### Derivatizace

Okyselená směs BA byla podrobena předkolonové derivatizaci dle standardizovaného postupu laboratoře podle Dadáková et al. (2009a).

1. Ke vzorkům bylo přidáno 100 µl vnitřního standardu (1,7-heptandiaminu (500 mg/l). Z této směsi byl odebrán 1 ml do derivatizační nádoby.
2. Do vzorků v derivatizačních nádobkách bylo přidáno 1,5 ml karbonátového pufru o pH 11 a 2 ml čerstvě připraveného roztoku dansylchloridu v acetonu (5 g/l). Derivatizační nádoby byly dobře uzavřeny a 20 hodin byly v temnu protřepávány.
3. Následně bylo do každého vzorku přidáno 200 µl roztoku prolinu a vzorky byly další hodinu protřepávány. K takto upravené směsi bylo přidáno 3 ml heptanu a vzorky byly 3 minuty ručně protřepávány.
4. V dalším kroku byl z derivatizačních nádobek odebrán 1 ml heptanové vrstvy do vialek.
5. Obsah vialek se nechal při teplotě 60 °C odpařit pod proudem dusíku.

- Suchý odparek byl zředěn 1,5 ml acetonitrilu a takto zpracované vzorky byly uchovány při teplotě -18 °C do doby analýzy.

### Chromatografické stanovení biogenních aminů

Derivatizované vzorky byly filtrovány přes stříkačkový filtr s porozitou 0,22 µm a dávkovány na kolonu (Agilent Eclipse Plus C18 RRHD, 50 x 3,0 mm, velikost částic 1,8 µm) chromatografického systému (termostat kolon Agilent 1260 Infinity; autosampler LabAlliance, USA; binární pumpa LabAlliance, USA; UV/VIS DAD detektor Agilent Technologies). Separace dansylderivátu biogenních aminů probíhala gradientovou elucí, jejíž program je znázorněn v Tab. 11. Detekce dansylderivátu BA bude probíhat spektrofotometricky UV zářením o vlnové délce 254 nm (DAD detektor Agilent Technologies 1260 Infinity). Podmínky separace a detekce sledovaných biogenních aminů byly nastaveny dle standardizovaných postupů laboratoře podle práce Purevdorj et al. (2021).

Tab. 11: Gradientový eluční program pro HPLC

Čas (min)	10% acetonitril (%)	100% acetonitril (%)
0,1	41	59
1,9	37	63
3,5	18	82
4,0	0	100
9,5	0	100
11,5	41	59
15,5	41	59

Podle Smělá et al., 2004

### 3. 2. 7. Statistické metody

Pro vyhodnocení dat získaných z HPLC byl využit Kruskal-Walisův test ke srovnání středních hodnot více než dvou nezávislých souborů, popř. Wilcoxonův test pro srovnání středních hodnot dvou nezávislých souborů. Data byla vyhodnocována pomocí softwaru Unistat® 6.5 (software Unistat, London, UK) na hladině významnosti 0,05.

Wilcoxonův test se používá se pro hodnocení párových pokusů, kdy sledovaná veličina neodpovídá Gaussovu normálnímu rozdělení. Porovnává dvě měření provedená u jednoho výběrového souboru. Testuje hypotézu rovnosti distribučních funkcí na základě ověření symetrického rozložení sledované náhodné veličiny. Kruskal-Wallisův test je rozšířením Wilcoxonova testu pro porovnání mediánů více než dvou náhodných výběrů (Blatná, 1996). Stejný přístup byl použit například v práci Purevdorj (2021).

## **4. VÝSLEDKY**

### **4. 1. Experiment I - Skrining mikroorganismů na schopnost degradace biogenních aminů**

V této experimentální části práce byly z různých potravinových matric izolovány mikroorganismy, které jsou schopny degradovat biogenní aminy. Z 895 vzorků potravin bylo izolováno 114 mikroorganismů schopných degradovat BA. Minerální médium, ve kterém byla jediným zdrojem uhlíku a dusíku směs biogenních aminů, bylo zaočkováno homogenátem z dané potravinové matrice. Tento základní skrining byl vyhotoven ve 3 opakováních pro každé inokulum připravené z dané potraviny. Pro kontrolu růstu autotrofní mikrobioty bylo stejným vzorkem zaočkováno minerální médium bez přídavku biogenních aminů. Pozitivní výsledky byly odečítány pozorováním zákalu živného média. Jako pozitivní byl brán takový vzorek, kde byl zákal pozorován ve všech 3 opakováních. Přestože tento základní pokus probíhal po dobu 7 dní, kdy byly každých 24 hodin odečítány výsledky, všech 114 získaných kmenů, které byly schopny biogenní aminy rozkládat, bylo detekováno již po prvních 24 hodinách probíhajícího pokusu. V následujících odběrových časech nebyly další nové záchyty zaznamenány. Z těchto výsledků je patrné, že všechny získané izoláty byly schopny významně redukovat biogenní aminy již v prvních 24 h kultivace.

#### **4. 1. 1. Identifikace pomocí MALDI-TOF**

Izoláty pozitivní na degradaci BA byly identifikovány na Slovenské poľnohospodárskej univerzite v Nižnej pomoci MALDI-TOF MS. Výsledky identifikace jsou shrnuty v Tab. 12. Citlivost a přesnost provedené identifikace je vyjádřena pomocí skóre, které se pohybuje v rozmezí 3-2,3 pro vysoce pravděpodobnou identifikaci na úrovni druhu (v Tab. 12 označeny šedě); 2,29-2 pro bezpečnou identifikaci na úrovni rodu a pravděpodobnou identifikaci na úrovni druhu; 1,99-1,7 pro pravděpodobnou identifikaci na úrovni rodu. Ze všech testovaných potravin bylo získáno 22 různých druhů mikroorganismů. 16 izolátů se zvolenou metodou nepodařilo identifikovat. Tyto vzorky vykazovaly skóre nižší než 1,7. Důvodem pro nemožnost identifikace mohla být směsná kultura mikroorganismů, jejich příliš nízká koncentrace nebo absence daného hmotnostního spektra v použitých knihovnách, které jsou dodavatelem sestavovány především k identifikaci klinických izolátů. Degradéři byli izolováni zejména z mléčných výrobků. Pro další experimenty byly vybrány právě izoláty z těchto potravin a jeden izolát nalezený v ovoci. Z množství mikroorganismů byly pro další experimenty zvoleny ty, které pro daný druh vykazovaly nejlepší identifikační skóre.

Tab. 12: Výsledky identifikace izolovaných mikroorganismů získané metodou MALDI-TOF MS

Mikroorganismus	Kmen	Skóre	Mikroorganismus	Kmen	Skóre
* <i>Acinetobacter pittii</i>	IB5	2.516	<i>Latilactobacillus curvatus</i>	IB521	1.833
<i>Acinetobacter pittii</i>	IB235	2.502	<i>Latilactobacillus curvatus</i>	IB347	1.824
<i>Acinetobacter pittii</i>	IB415	2.401	<i>Latilactobacillus curvatus</i>	IB270	1.764
<i>Acinetobacter pittii</i>	IB682	2.397	<i>Latilactobacillus curvatus</i>	IB88	1.752
<i>Acinetobacter pittii</i>	IB27	2.373	<i>Latilactobacillus curvatus</i>	IB96	1.701
<i>Acinetobacter pittii</i>	IB310	2.372	<i>Latilactobacillus curvatus</i>	IB304	2.227
<i>Acinetobacter pittii</i>	IB69	2.356	<i>Latilactobacillus sakei</i>	IB431	2.234
<i>Acinetobacter pittii</i>	IB174	2.319	<i>Latilactobacillus sakei</i>	IB438	1.862
<i>Acinetobacter pittii</i>	IB248	2.271	<i>Latilactobacillus sakei</i>	IB603	1.843
<i>Acinetobacter pittii</i>	IB804	2.251	* <i>Micrococcus luteus</i>	IB16	2.431
<i>Acinetobacter pittii</i>	IB521	1.957	<i>Micrococcus luteus</i>	IB116	2.158
<i>Acinetobacter radioresistens</i>	IB182	2.365	<i>Micrococcus luteus</i>	IB320	2.037
* <i>Agrobacterium radiobacter</i>	IB102	2.375	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	IB541	2.328
* <i>Bacillus altitudinis</i>	IB84	2.414	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	IB301	2.247
* <i>Bacillus pumilus</i>	IB26	2.724	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	IB358	2.124
<i>Bacillus pumilus</i>	IB418	2.135	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	IB629	2.036
<i>Bacillus pumilus</i>	IB630	2.093	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	IB138	2.035
<i>Bacillus pumilus</i>	IB581	1.775	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	IB203	2.016
* <i>Bacillus safensis</i>	IB731	2.417	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	IB482	1.976
* <i>Bacillus subtilis</i>	IB23	2.831	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	IB197	1.972
<i>Bacillus subtilis</i>	IB38	2.263	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	IB836	1.961
<i>Bacillus subtilis</i>	IB493	2.024	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	IB522	1.954
<i>Bacillus subtilis</i>	IB658	1.935	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	IB485	1.927
<i>Bacillus subtilis</i>	IB311	1.928	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	IB398	1.913
<i>Bacillus subtilis</i>	IB87	1.818	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	IB742	1.893
* <i>Enterobacter cloacae</i>	IB62	2.384	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	IB647	1.877
<i>Enterococcus faecalis</i>	IB129	2.395	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	IB303	1.875
<i>Fructilactobacillus fructivorans</i>	IB360	1.834	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	IB371	1.872
* <i>Klebsiella pneumoniae</i>	IB148	2.395	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	IB299	1.858
<i>Latilactobacillus curvatus</i>	IB521	2.223	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	IB58	1.833
<i>Latilactobacillus curvatus</i>	IB367	2.215	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	IB39	1.823
<i>Latilactobacillus curvatus</i>	IB608	2.189	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	IB596	1.736
<i>Latilactobacillus curvatus</i>	IB18	2.185	* <i>Pseudomonas fulva</i>	IB266	2.344
<i>Latilactobacillus curvatus</i>	IB96	2.179	* <i>Pseudomonas koreensis</i>	IB431	2.313
<i>Latilactobacillus curvatus</i>	IB253	2.176	<i>Pseudomonas oryzihabitans</i>	IB438	2.244
<i>Latilactobacillus curvatus</i>	IB347	2.156	* <i>Serratia marcescens</i>	IB11	2.531
<i>Latilactobacillus curvatus</i>	IB731	2.148	<i>Serratia marcescens</i>	IB39	2.035
<i>Latilactobacillus curvatus</i>	IB621	2.146	* <i>Serratia ureylitica</i>	IB1	2.635
<i>Latilactobacillus curvatus</i>	IB806	2.137	<i>Staphylococcus carnosus</i>	IB87	2.215
<i>Latilactobacillus curvatus</i>	IB380	2.121	<i>Staphylococcus carnosus</i>	IB174	2.17

Mikroorganismus	Kmen	Skóre	Mikroorganismus	Kmen	Skóre
<i>Latilactobacillus curvatus</i>	IB114	2.077	<i>Staphylococcus carnosus</i>	IB559	1.869
<i>Latilactobacillus curvatus</i>	IB864	2.072	<i>Staphylococcus carnosus</i>	IB47	1.86
<i>Latilactobacillus curvatus</i>	IB230	2.046	<i>Staphylococcus carnosus</i>	IB41	1.85
<i>Latilactobacillus curvatus</i>	IB382	2.009	<i>Staphylococcus carnosus</i>	IB166	1.848
<i>Latilactobacillus curvatus</i>	IB557	2	<i>Staphylococcus carnosus</i>	IB655	1.799
<i>Latilactobacillus curvatus</i>	IB203	1.992	<i>Staphylococcus carnosus</i>	IB724	1.747
<i>Latilactobacillus curvatus</i>	IB716	1.891	<i>Staphylococcus hominis</i>	IB693	1.902

\* - kmeny použité pro další experimenty

Pro následné experimenty bylo vybráno 13 různých mikroorganismů, u kterých byly zjištěny základní biochemické charakteristiky

#### 4. 1. 2. Identifikace pomocí sekvenace genů pro 16S rRNA

Identifikace 13 mikroorganismů, které byly vybrány pro další práci, byla ověřena pomocí PCR a následným sekvenováním části genu pro 16S rRNA firmou SEQme s.r.o. Identifikace všech izolátů vybraných na základě analýzy MALDI-TOF MS se shodovala s výsledky sekvenování PCR produktů na úrovni druhu. Kmeny zvolené pro další pokusy byly pomocí databáze GeneBank identifikovány jako *Acinetobacter pittii*, *Agrobacterium radiobacter*, *Bacillus altitudinis*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus safensis*, *Bacillus subtilis*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Micrococcus luteus*, *Pseudomonas koreensis*, *Pseudomonas fulva*, *Serratia marcescens*, *Serratia ureylitica*. Kmeny *Bacillus subtilis* IB23 a *Bacillus pumilus* IB26 byly identifikovány se 100% shodou.

#### 4. 2. Experiment II - Míra degradace biogenních aminů

U kmenů získaných a identifikovaných v předchozím experimentu byl stanoven úbytek jednotlivých BA v časech 0-72 hodin. Pro tento pokus bylo vybráno 13 kmenů pozitivních na degradaci biogenních aminů. Průběh degradace v jednotlivých časech byl sledován pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie a je shrnut v Tab. 13. Všechny zvolené kmeny byly schopny degradovat všechny testované BA aspoň o 8,5 % za 72 h. Kmen *Acinetobacter pittii* IB5 vykazoval po 72 hodinách nejnižší míru degradace u TRY, a to jen o 8,5 %, naopak byl schopen degradovat KAD o čtvrtinu. Podobnou schopnost degradace TRY vykazoval kmen *Agrobacterium radiobacter* IB102, který po 72 hodinách dokázal snížit jeho koncentraci o 9,65 %. Koncentrace TYM po 72 h kultivace klesla téměř o polovinu. Jednalo se o nejvyšší úbytek ze všech BA v tomto čase. Koncentrace všech BA degradovaných kmenem *Bacillus altitudinis* IB84 pozvolna klesala v rozmezí 13-36 %. Nejvyšší míru degradace vykazoval *B. altitudinis* u TRY. Stejně jako u dvou předchozích kmenů byl největší úbytek zaznamenán u TYM. Velice podobnou míru degradační aktivity



jako *B. altitudinis* vykazoval v čase 72 h i *B. pumilus* IB26. Shodně degradoval TYM o 36 %. *Bacillus safensis* IB731 po 72 h kultivace dokázal nejvíce snížit hladinu PUT, a to téměř o polovinu, obdobně jako v předchozích měřeních degradoval nejméně TRY, v tomto případě však téměř o čtvrtinu. Vůbec nejvyšší snížení koncentrace BA byla zaznamenána u *B. subtilis* IB23. Tento kmen byl schopen výrazně snížit obsahy všech BA, nejméně byl po 72 h opět degradován TRY o 22,68 %, PEA o bezmála 35 %. Nejvyšší snížení koncentrace bylo pozorováno u PUT, kdy se po 72 h kultivace dostal k téměř nulovým hodnotám, podobně úspěšně byly degradovány i KAD a HIM o 92,4 resp. 97 %. Z námi zachycených degradérů se právě *B. subtilis* IB23 ukázal jako nejúspěšnější kmen. *Enterobacter cloacae* IB62 vykazoval po 72 h nejvyšší míru degradace u PUT o téměř 44 %, nejnižší podobně jako v předchozích případech u tryptaminu. Zde se jeho obsah za 72 h snížil o 15,46 %. Vysokou efektivitu degradace BA vykazovaly také kmeny *Klebsiella pneumoniae* IB148 a *Micrococcus luteus* IB16, kdy oba kmeny byly schopné po 72 h degradovat PUT o více než 90 % a TRY a PEA o více než 60 %, ale pouze o 9 % byla snížena koncentrace HIM kmenem *M. luteus* IB16. Oba testované kmeny *Pseudomonas* byly schopny snížit hladinu PUT o více než 90 %, o více než polovinu dokázaly snížit obsahy TRY, PEA i TYM. U obou kmenů byl po 72 h detekován nejnižší úbytek histaminu. Obdobně jako u kmenů *Pseudomonas* i u testovaných izolátů *Serratia* byl zaznamenán úbytek PUT o více než 90 %, nejmenší snížení koncentrace u kmene *Serratia marcescens* IB11 po 72 h bylo detekováno u HIM a KAD shodně o necelých 34 %, u kmene *Serratia ureilytica* IB1 u HIM a PEA, kdy hladiny těchto aminů klesly 66 a 65 %.

Tab. 13: Relativní pokles koncentrace biogenních aminů (rel. %) v čase u vybraných testovaných mikroorganismů

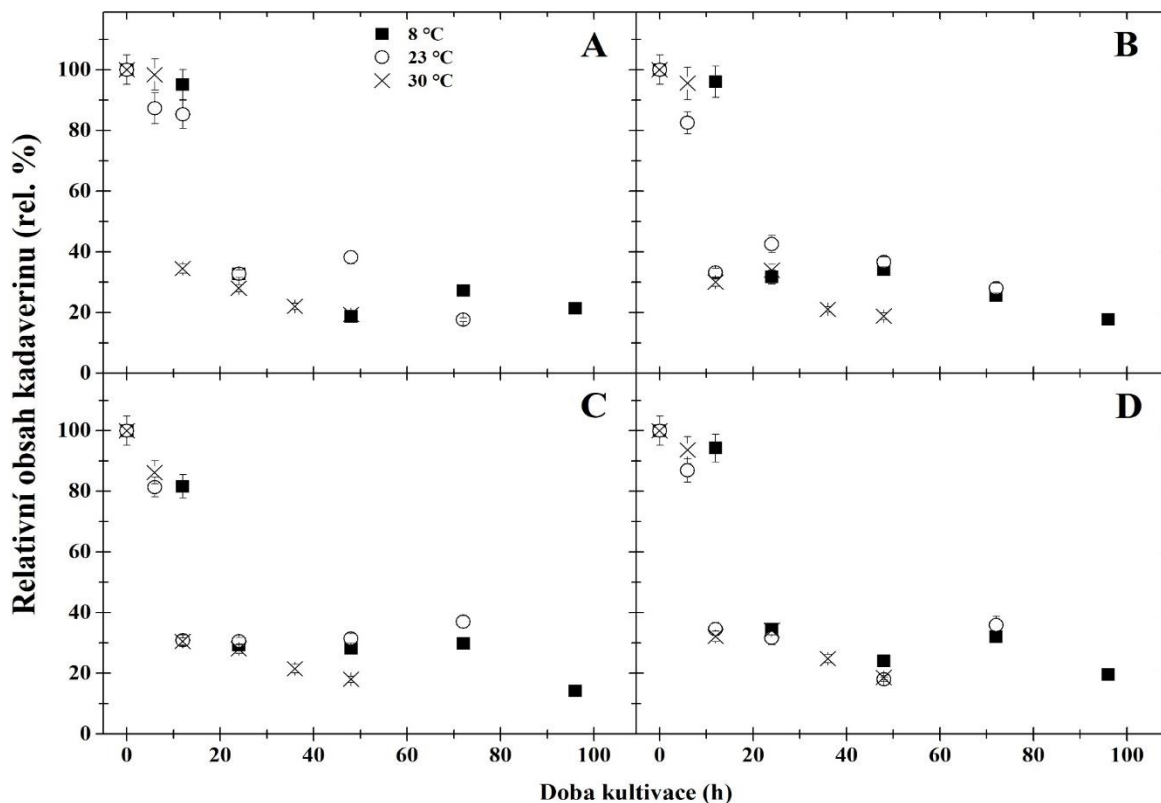
Kmen/BA	Doba kultivace (h)				
	12	24	36	48	72
<b><i>Acinetobacter pitii</i> IB5</b>					
Tryptamin	3,47	4,47	6,31	7,37	8,25
Fenylethylamin	32,62	1,99	13,50	10,29	23,77
Putrescin	20,07	13,99	30,70	20,26	21,85
Kadaverin	0,64	1,19	1,68	5,95	25,04
Histamin	41,78	54,12	58,41	11,83	16,36
Tyramin	33,83	32,55	15,70	13,38	37,42
<b><i>Agrobacterium radiobacter</i> IB102</b>					
Tryptamin	2,02	3,02	5,46	6,42	9,65
Fenylethylamin	15,76	16,18	26,51	38,86	43,31
Putrescin	27,66	18,63	14,28	27,33	25,14
Kadaverin	11,51	14,73	18,01	27,03	28,30
Histamin	2,13	8,53	17,24	14,52	20,43
Tyramin	32,44	31,39	38,93	43,36	49,75

Kmen/BA	Doba kultivace (h)				
	12	24	36	48	72
<b><i>Bacillus altitudinis</i> IB84</b>					
Tryptamin	1,19	2,01	6,62	10,71	12,74
Fenylehtylamin	20,42	25,74	27,25	29,57	30,36
Putrescin	16,60	17,16	22,47	22,80	25,84
Kadaverin	16,36	17,05	19,78	21,85	24,57
Histamin	11,60	13,36	20,23	22,85	28,18
Tyramin	23,79	28,77	30,95	35,14	36,50
<b><i>Bacillus pumilus</i> IB26</b>					
Tryptamin	2,78	4,39	4,45	6,61	8,55
Fenylehtylamin	5,09	7,51	8,19	11,29	27,70
Putrescin	7,99	14,80	25,30	27,14	28,57
Kadaverin	3,51	6,47	17,50	20,08	28,68
Histamin	3,06	13,64	23,32	29,00	30,55
Tyramin	10,20	10,53	12,68	15,53	36,23
<b><i>Bacillus safensis</i> IB731</b>					
Tryptamin	5,48	8,09	12,07	22,90	24,43
Fenylehtylamin	0,64	2,46	9,90	22,65	30,84
Putrescin	15,63	18,04	32,01	45,76	49,36
Kadaverin	1,71	7,87	16,03	25,50	32,95
Histamin	0,24	11,16	15,41	21,08	30,38
Tyramin	30,64	32,24	34,13	39,54	44,33
<b><i>Bacillus subtilis</i> IB23</b>					
Tryptamin	3,00	4,85	8,27	16,11	22,68
Fenylehtylamin	24,37	28,37	31,87	33,78	34,97
Putrescin	33,48	43,59	50,62	95,97	99,77
Kadaverin	15,94	44,91	62,06	82,23	92,40
Histamin	30,95	49,26	58,63	77,29	96,95
Tyramin	27,89	31,12	37,37	41,65	48,45
<b><i>Enterobacter cloacae</i> IB62</b>					
Tryptamin	1,06	1,48	7,62	6,24	15,46
Fenylehtylamin	4,56	11,36	16,40	17,05	19,57
Putrescin	12,80	20,16	20,99	35,89	43,96
Kadaverin	13,72	19,71	22,14	21,99	24,05
Histamin	21,37	21,62	24,54	24,49	28,80
Tyramin	20,50	25,55	30,78	34,30	39,49
<b><i>Klebsiella pneumoniae</i> IB148</b>					
Tryptamin	42,79	57,78	60,33	64,98	62,78
Fenylehtylamin	32,48	53,32	58,37	58,97	66,61
Putrescin	28,39	58,63	72,03	91,56	92,12
Kadaverin	11,77	13,92	20,91	22,41	30,63
Histamin	43,76	53,40	51,67	57,10	61,10
Tyramin	47,67	66,70	52,63	58,25	69,41

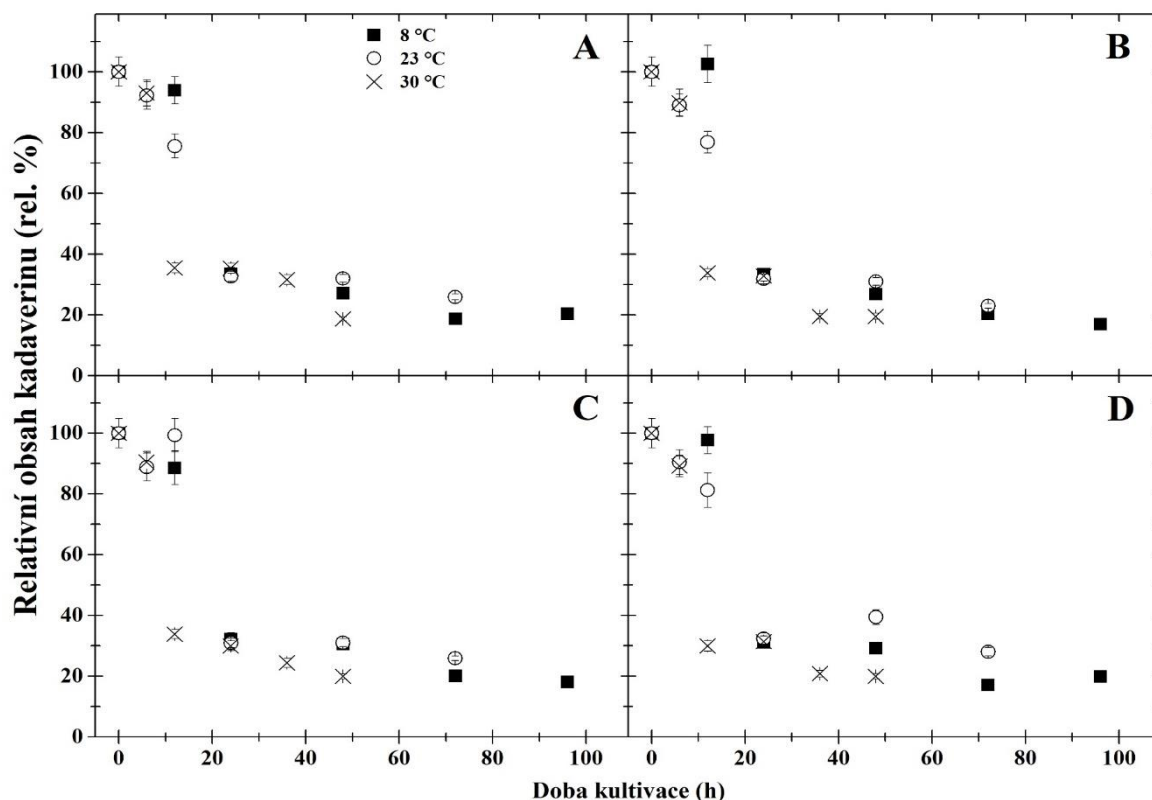
Kmen/BA	Doba kultivace (h)				
	12	24	36	48	72
<b><i>Micrococcus luteus</i> IB16</b>					
Tryptamin	3,32	12,25	37,60	68,71	76,21
Fenylehtylamin	6,62	10,05	48,66	65,21	75,15
Putrescin	16,35	20,71	73,33	88,05	90,87
Kadaverin	1,13	9,44	17,62	18,92	17,13
Histamin	1,77	3,55	5,78	6,87	8,99
Tyramin	6,73	13,25	25,63	38,70	55,78
<b><i>Pseudomonas fulva</i> IB266</b>					
Tryptamin	10,18	14,83	42,80	64,82	65,40
Fenylehtylamin	2,15	3,11	37,50	61,30	64,85
Putrescin	0,98	7,19	61,50	91,01	92,55
Kadaverin	7,65	13,22	15,93	17,56	18,99
Histamin	1,30	2,44	6,34	11,43	16,23
Tyramin	18,36	26,21	45,75	58,18	67,86
<b><i>Pseudomonas koreensis</i> IB431</b>					
Tryptamin	37,80	57,88	59,00	62,31	67,51
Fenylehtylamin	28,34	52,58	58,37	61,17	62,58
Putrescin	41,67	58,78	77,37	92,47	92,34
Kadaverin	10,64	52,61	55,51	61,42	63,19
Histamin	1,76	4,83	12,48	18,99	23,59
Tyramin	31,75	67,01	42,67	53,73	61,39
<b><i>Serratia marcescens</i> IB11</b>					
Tryptamin	8,74	17,51	20,97	27,38	66,15
Fenylehtylamin	6,81	10,07	16,08	25,67	64,08
Putrescin	11,74	14,24	37,97	58,61	92,26
Kadaverin	5,15	10,07	17,15	25,83	33,76
Histamin	3,15	15,60	21,45	28,72	33,93
Tyramin	21,94	35,43	40,45	46,52	70,35
<b><i>Serratia ureilytica</i> IB1</b>					
Tryptamin	22,97	56,11	60,45	65,10	67,50
Fenylehtylamin	25,70	46,17	52,64	60,85	64,98
Putrescin	38,68	60,23	72,19	91,76	91,92
Kadaverin	18,48	49,71	58,48	74,20	79,86
Histamin	25,48	52,61	61,79	63,30	66,43
Tyramin	31,15	56,94	60,74	64,69	72,04

### 4. 3. Experiment III - Degradace biogenních aminů kmenem *Bacillus subtilis* IB23 v závislosti na vnějších podmínkách

V experimentu II byla sledována všeobecná schopnost degradace BA 13 různými kmeny mikroorganismů. Na základě výsledků získaných z předchozího experimentu byl pro tuto sadu pokusů vybrán kmen *Bacillus subtilis* IB23. Nejen, že byl identifikován s velmi vysokou přesností, ale také vykazoval nejlepší degradační schopnosti pro všechny testované aminy. V tomto experimentu byla pozorována schopnost degradace 5 vybraných biogenních aminů (fenylethylaminu, putrescinu, kadaverinu, histaminu a tyraminu) v minerálním médiu v závislosti na vnějších podmínkách kultivace. Konkrétně byl studován vliv teploty, pH kultivačního média a způsob kultivace (aerobní-AE/anaerobní-AN). Výsledky pozorování jsou shrnuty na obrázcích 6-15. Ve čtyřpólových grafech byl srovnáván relativní obsah jednotlivých aminů zvlášť pro každé iniciační pH. Pro každou teplotu byly zvoleny různé odběrové časy (viz Tab. 8) na základě předpokladu rychlejšího růstu bakterií se zvyšující se teplotou. Během experimentu byl pozorován výrazný úbytek všech biogenních aminů o více než 52 % u všech sledovaných parametrů.



Obr. 6: Degradace kadaverinu kmenem *B. subtilis* IB23 v minerálním médiu za aerobních podmínek; A – pH 5, B – pH 6, C – pH 7, D – pH 8

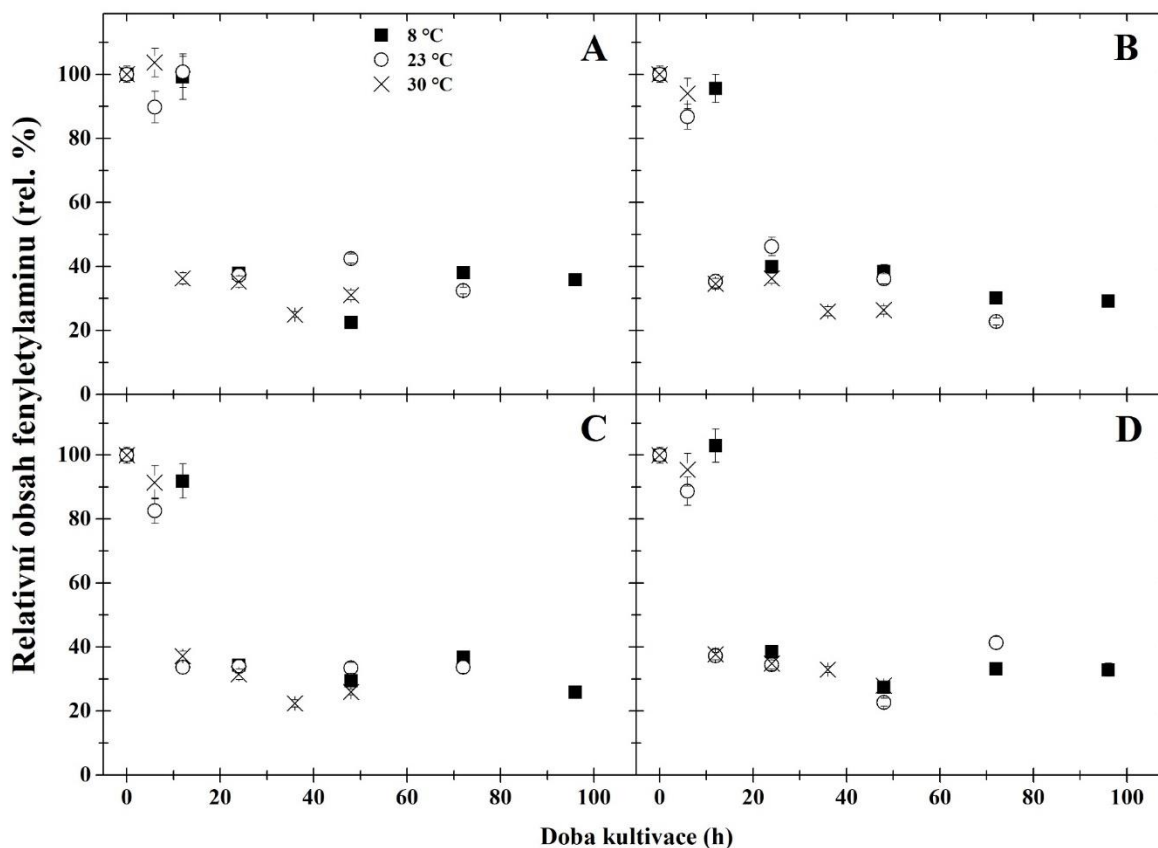


Obr. 7: Degradace kadaverinu kmenem *B. subtilis* IB23 v minerálním médiu za anaerobních podmínek; A – pH 5, B – pH 6, C – pH 7, D – pH 8

Na Obr. 6 a 7 je znázorněn průběh degradace kadaverinu v aerobním (AE) a anaerobním (AN) prostředí. K výraznému úbytku kadaverinu docházelo za všech teplot a při všech hodnotách pH. Po 12 h kultivace při 30 °C došlo ke skokovému snížení obsahu kadaverinu o 65-70 % jak při aerobní, tak při anaerobní kultivaci. Vliv anaerobiózy byl nejvíce patrný během kultivace při nejnižší teplotě (8 °C), ve srovnání s kultivací v aerobním prostředí byl KAD degradován o 5-12 % méně. Jak se dalo předpokládat, nejvyšší míru degradace vykazoval kadaverin při kultivaci v médiu o neutrálním pH, kdy jeho koncentrace po 48 h kultivace klesla při 30 °C na 18 % a po 96 h kultivace při 8 °C na 15 %. Výsledky naznačují, že delší doba kultivace při teplotě 30 °C by přispěla k dalšímu snižování obsahu KAD. S posunem pH ke kyselějším či zásaditějším hodnotám, spolu se snižující se teplotou, byl výsledný úbytek kadaverinu nižší. Po 24 h kultivace byl kadaverin degradován nejméně v médiu s iniciačním pH 6 při teplotě 23 °C.

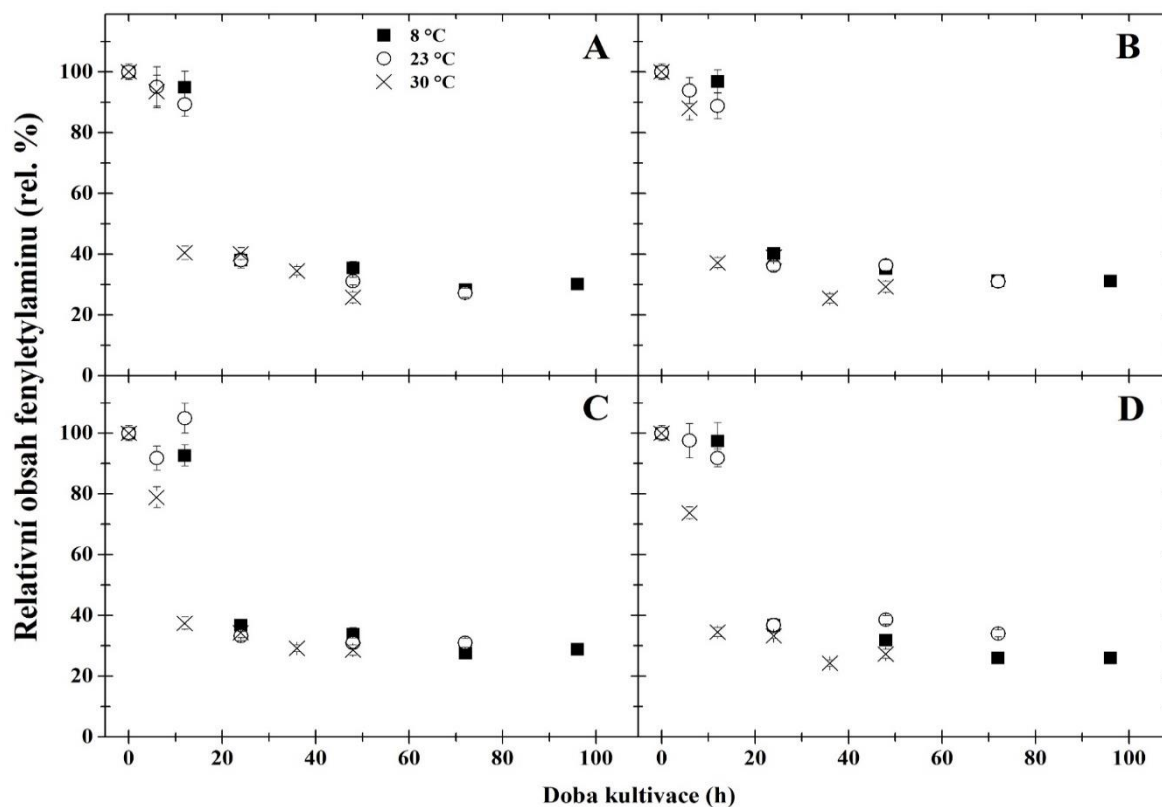
Dalším sledovaným aminem byl fenylethylamin. PEA byl ve srovnání s KAD při teplotě 8 °C po 72 h kultivace degradován méně (Obr. 8). Jeho množství kleslo v průměru na 29 % v médiu s iniciačním pH 6 a 7, v médiích o pH 5 a 8 byl na konci kultivace jeho obsah o 7 % vyšší. Po 24 h byl opět pozorován skokový úbytek BA u všech pozorovaných teplot a zároveň u všech médií s různým pH. Největší rozdíly v degradaci PEA u sledovaných teplot můžeme zaznamenat v médiu o pH 5, kdy při teplotě 23 °C po 24 h klesla jeho hladina na 45 %, při 30 °C na 40 % a při 30 °C na 35 %. Nejvyšší celkový

úbytek byl po 48hodinové kultivaci pozorován při teplotě 8 °C v médiu o iniciačním pH 5.



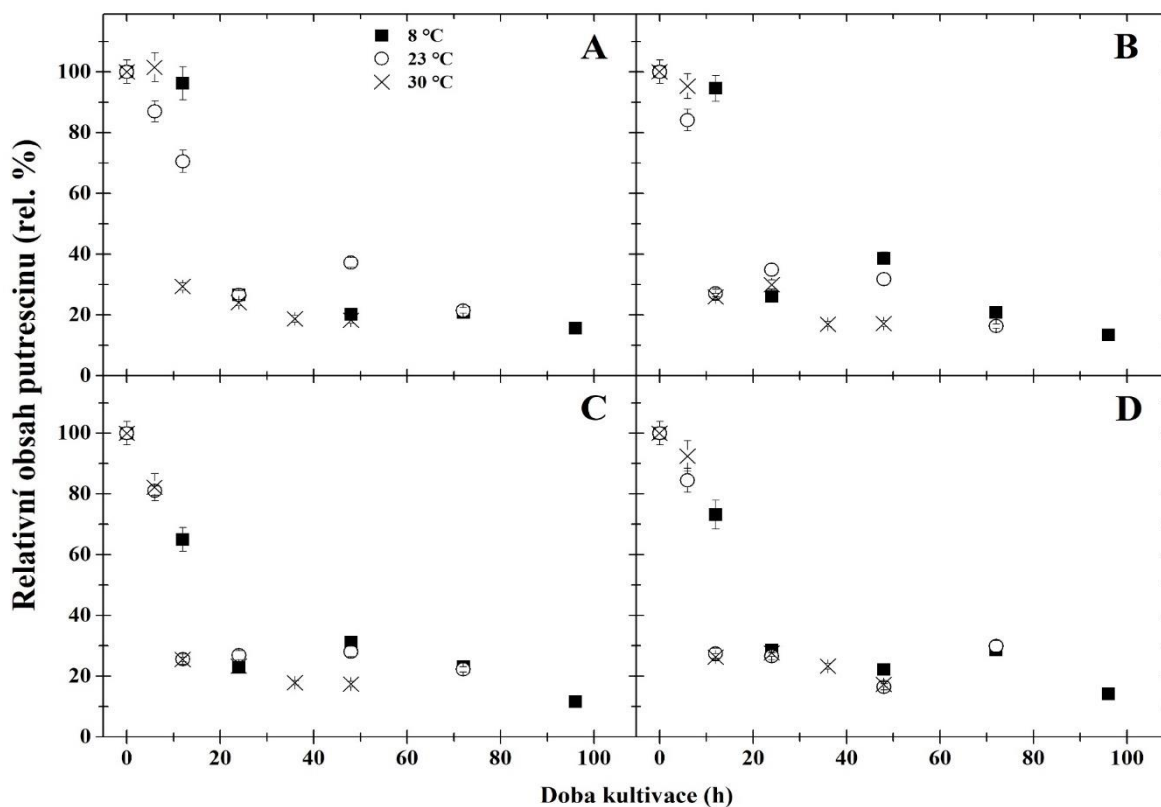
Obr. 8: Degradace fenylethylaminu kmenem *B. subtilis* IB23 v minerálním médiu za aerobních podmínek; A – pH 5, B – pH 6, C – pH 7, D – pH 8

Při anaerobní kultivaci byl u PEA (Obr. 9) po 96 h kultivace při 8 °C zaznamenán nejvyšší úbytek v médiu o pH 8, kdy jeho koncentrace klesla asi o tři čtvrtiny. Během aerobní i anaerobní kultivace klesala při teplotách 8 a 23 °C jeho koncentrace v průběhu prvních 12 h jen velmi pozvolna ve všech kultivačních médiích testovaných hodnot pH. Při kultivaci v prostředí o pH 5 a 6 při teplotě 30 °C klesal obsah PEA pomaleji, v prostředí s pH 7 a 8 byl naopak pozorován úbytek o 23 %, resp. 28 %.

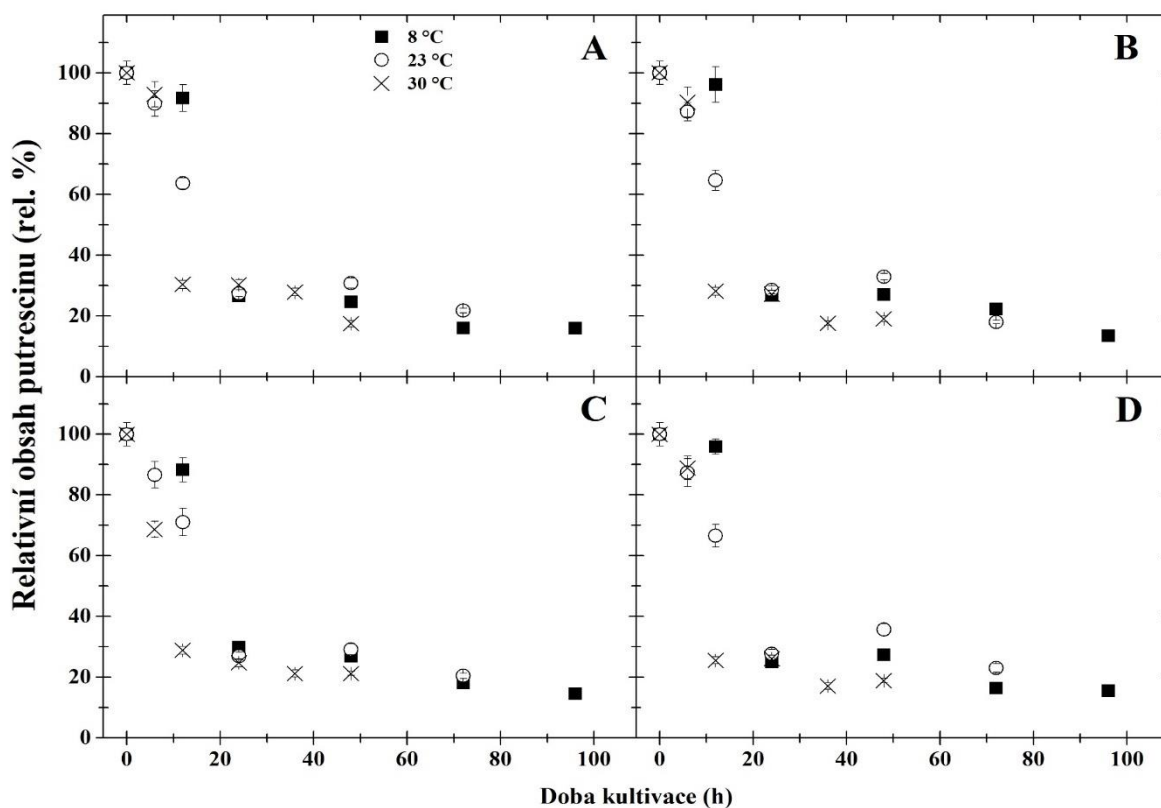


Obr. 9: Degradace fenylethylaminu kmenem *B. subtilis* IB23 v minerálním médiu za anaerobních podmínek; A – pH 5, B – pH 6, C – pH 7, D – pH 8

Nejvíce ze všech testovaných BA byl po 96 h při kultivační teplotě 8 °C redukován obsah putrescinu, a to až na 12 % během kultivace v médiu o pH 7 (Obr. 10). Na rozdíl od kultivací v médiích o pH 7 a 8, kde bylo opět patrné výrazné snížení množství PUT již během prvních 12 h kultivace (pokles o 36 %), v kyslejší prostředí se koncentrace pohybovala na 95 % původního obsahu. Během dalších 12 h bylo pozorováno zrychlení rozkladu putrescinu, kdy se jeho koncentrace ve všech typech médií a za všech teplot pohybovala v rozmezí od 22 do 34 %. Během prvních 12 h kultivace byl PUT nejpomaleji rozkládán v médiu o pH 5 při teplotě 8 °C (pokles o 4 %) a 23 °C (pokles o 30 %). V AN prostředí byl pozorován opačný trend (Obr. 11), kdy byl během prvních 12 h kultivace putrescin při pH 5 a teplotě 23 °C degradován nejvíce. Při teplotě 30 °C byl PUT po 48 h degradován nejméně při pH 7 (na 21 %), nejvíce naopak při nejnižším testovaném pH, kdy byl degradován na 17 % původního obsahu.



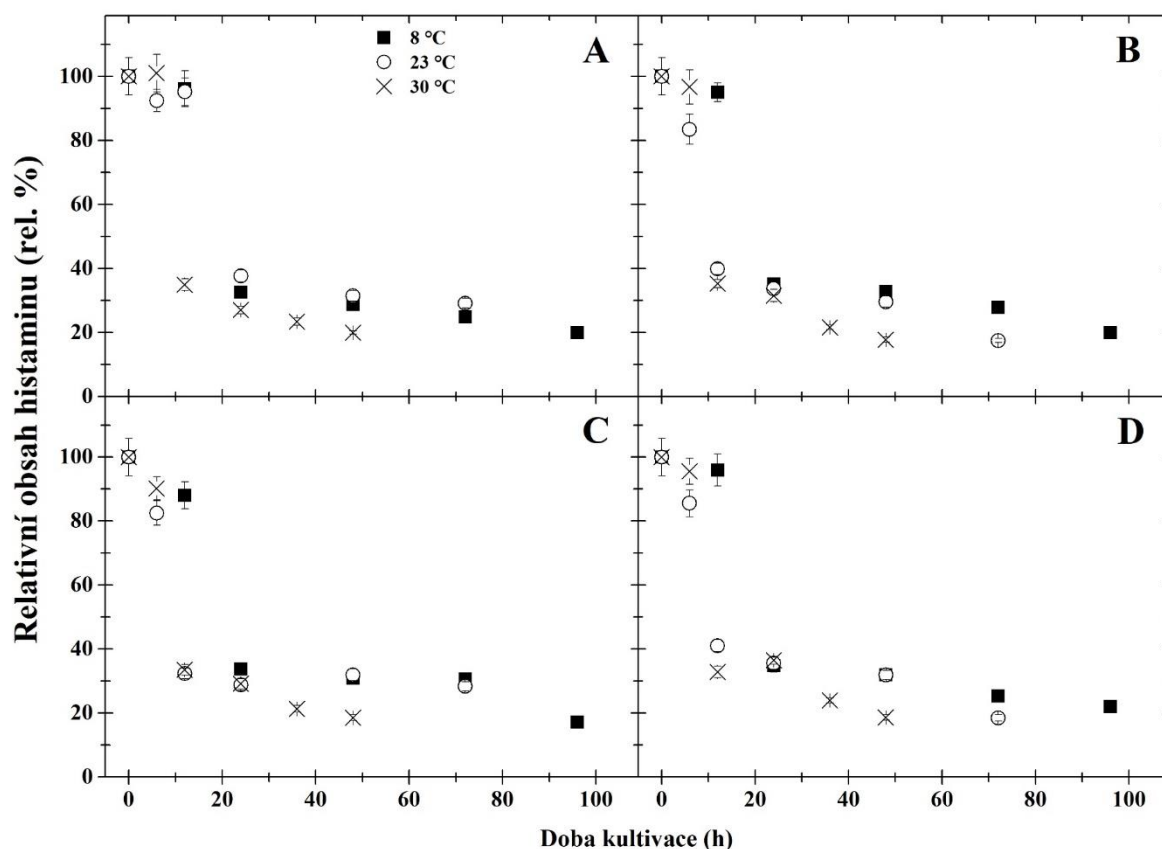
Obr. 10: Degradace putrescinu kmenem *B. subtilis* IB23 v minerálním médiu za aerobních podmínek; A – pH 5, B – pH 6, C – pH 7, D – pH 8



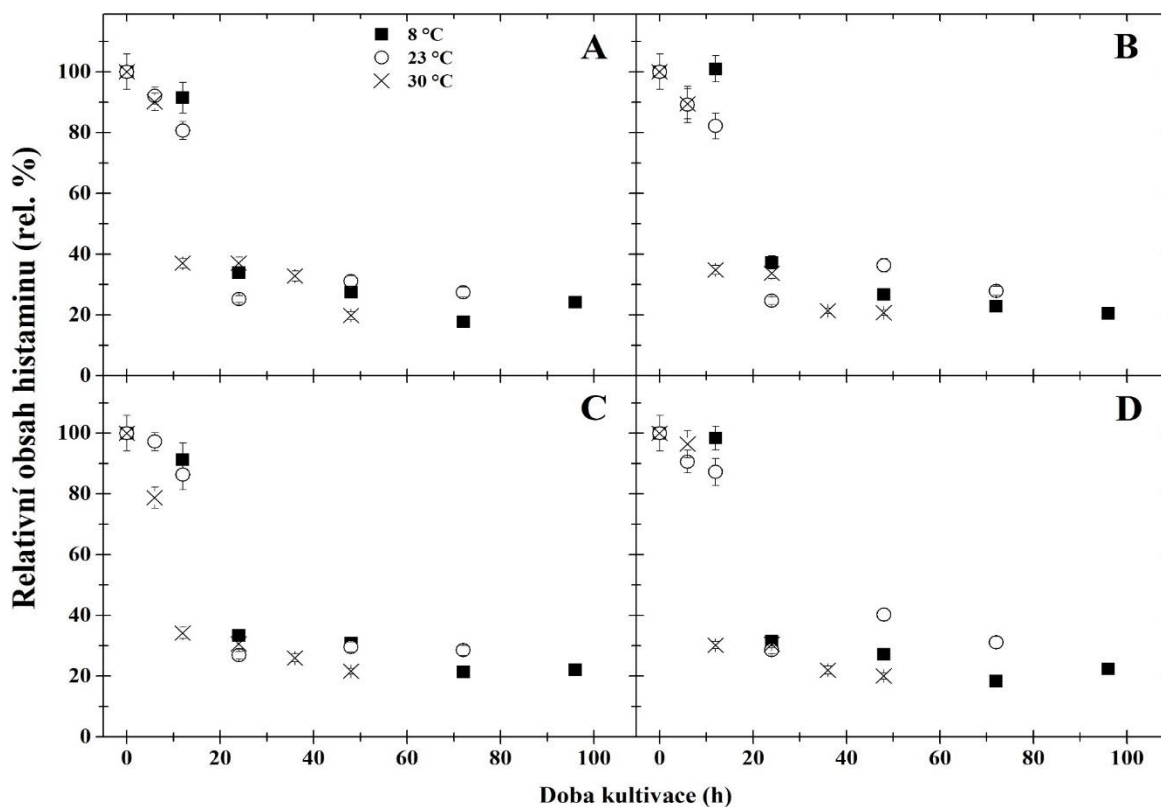
Obr. 11: Degradace putrescinu kmenem *B. subtilis* IB23 v minerálním médiu za anaerobních podmínek; A – pH 5, B – pH 6, C – pH 7, D – pH 8



V případě dalšího testovaného aminu histaminu byl pozorován rozklad 60 % dané látky během 24 h aerobní kultivace, a to jak u všech teplot, tak u všech sledovaných hodnot pH (Obr. 12). Stejná rychlost degradace během prvního dne kultivace byla pozorována i v anaerobním prostředí. Během inkubace při 8 °C po 96 h kultivace byl pozorován největší úbytek HIM v médiu o pH 7, kdy jeho množství kleslo o 83 %, nejméně pak jeho koncentrace klesla v médiu s nejvyšším pH, kdy byl pozorován pokles o 78 %. V průběhu prvních 12 h kultivace při 23 a 30 °C klesal obsah HIM pomaleji, nicméně po 24 h od inokulace byl opět zaznamenán skokový pokles koncentrace na méně než jednu třetinu původního obsahu, stejně tak tomu bylo i v AN prostředí. Největší úbytek byl zaznamenán v prostředí o pH 7, kdy počáteční koncentrace klesla o 10 %. Po 48 h aerobní kultivace při 30 °C se výsledný obsah HIM pohyboval u všech typů médií mezi 18 a 20 %. Při anaerobní kultivaci byl výsledný obsah HIM nepatrně vyšší. Jeho koncentrace se po 48 h pohybovala v rozmezí 20-21 % (Obr. 13). Podobně jako u všech předchozích aminů byl po 48 h od inokulace nejrychlejší rozklad HIM pozorován při 30 °C u všech typů médií, jedinou výjimku tvořil HIM v médiu s pH 8, kdy degradace probíhala nejrychleji při 23 °C. Nejnižší míru degradace HIM v anaerobním prostředí vykazoval *B. subtilis* IB23 v prostředí o pH 8 při teplotě 23 °C.

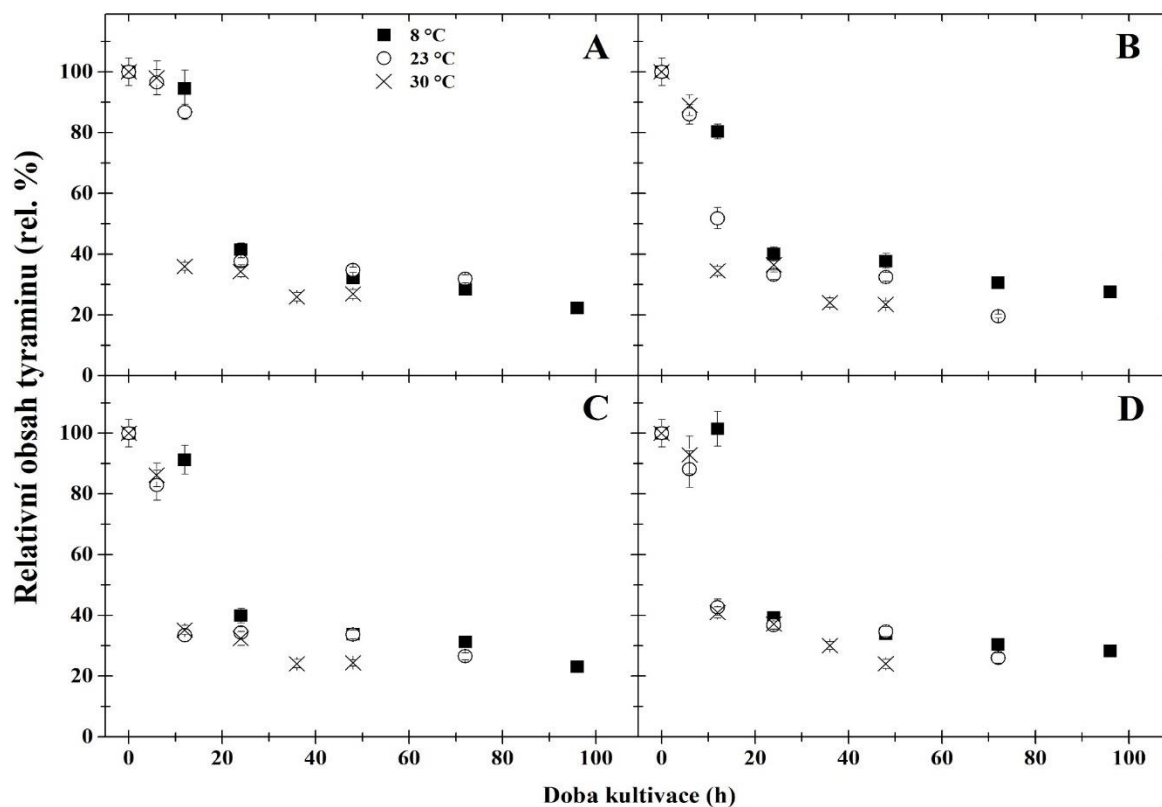


Obr. 12: Degradace histaminu kmenem *B. subtilis* IB23 v minerálním médiu za aerobních podmínek; A – pH 5, B – pH 6, C – pH 7, D – pH 8

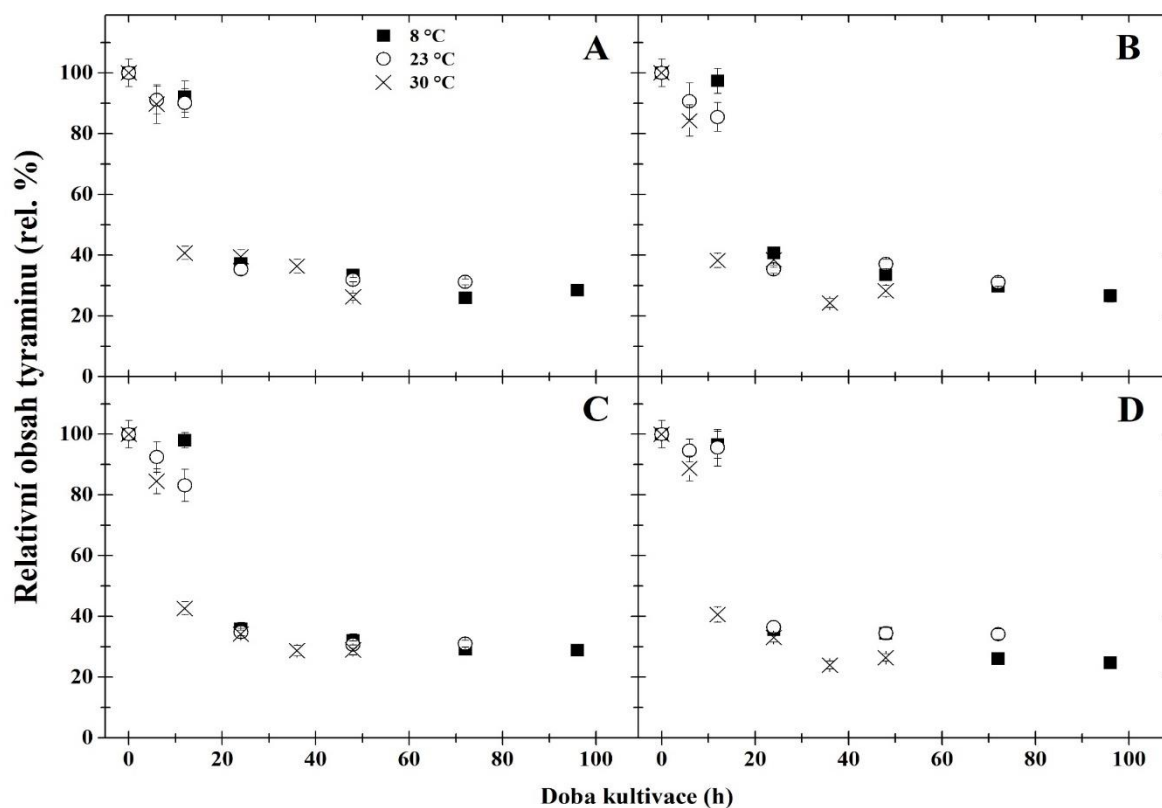


Obr. 13: Degradace histaminu kmenem *B. subtilis* IB23 v minerálním médiu za anaerobních podmínek; A – pH 5, B – pH 6, C – pH 7, D – pH 8

V případě tyraminu byl nejvyšší úbytek po 96 h kultivace při 8 °C zaznamenán v médiích o pH 5 a 7, a to téměř shodně o 77 %, po 12 h od zaočkování byl největší pokles zaznamenán v prostředí o pH 6, kdy koncentrace TYM klesla o 20 %, zatímco v médiích o dalších testovaných hodnotách pH se pokles pohyboval mezi 7 a 10 % (Obr. 14). Podle očekávání i v tomto případě klesala koncentrace TYM nejpomaleji během inkubace při 8 °C v AE prostředí s výjimkou prostředí o pH 6, kdy byl TYM nejpomaleji rozkládán při 23 °C, v anaerobióze klesalo množství TYM nejpomaleji při 23 °C u všech testovaných hodnot pH médií. Při 23 °C *B. subtilis* IB23 nejlépe degradoval v médiu o pH 6, kdy byla koncentrace TYM po 72 h snížena o 80 %, nejhůře pak při dané teplotě degradoval v nejkyseljším testovaném prostředí, kdy byl po 72 h obsah TYM redukován o 70 %. Stejně jako u předchozích aminů i zde došlo k rapidnímu snížení obsahu TYM během prvních 24 h od inokulace, kdy u všech testovaných teplot a pH médií došlo k redukci množství TYM o 60 %. V anaerobním prostředí byla koncentrace v průměru o dalších 5 % nižší (Obr. 15).



Obr. 14: Degradace tyraminu kmenem *B. subtilis* IB23 v minerálním médiu za aerobních podmínek; A – pH 5, B – pH 6, C – pH 7, D – pH 8



Obr. 15: Degradace tyraminu kmenem *B. subtilis* IB 23 v minerálním médiu za anaerobních podmínek; A – pH 5, B – pH 6, C – pH 7, D – pH 8

Vzhledem k teplotnímu optimu pro růst *B. subtilis* (30-37 °C) nebylo překvapením, že jeho schopnost redukovat biogenní aminy *in vitro* v minerálním médiu byla nejpatrnější právě při kultivační teplotě 30 °C. Velmi dobré výsledky byly zaznamenány i při nižších teplotách, kdy byl rovněž schopen významně snížit obsah všech sledovaných biogenních aminů. Díky své životaschopnosti v rozmezí pH 5-9 byl schopen rozkládat BA v uvedeném testovaném rozsahu. Přestože byl u jednotlivých aminů pozorován statisticky významný vliv hodnot pH média na jejich degradaci, nelze jednoznačně určit, která hodnota pH by vykazovala všeobecné inhibiční či naopak posilující účinky pro degradaci daným kmenem. Pro příklad je možné uvést kultivaci v anaerobním prostředí při 23 °C, v médiích o iniciačním pH 5 a 6, kde byl obsah tyraminu po 72 hodinách redukován o 70 % a dále se jeho množství spolu s rostoucím pH mírně zvyšovalo (při pH 7 na 32 % a při pH 8 na 36 %). Naopak při kultivaci v aerobním prostředí při 8 °C byla koncentrace např. putrescinu v průběhu 96 h kultivace v médiu o pH 5 snížena až na 16 % a se zvyšujícím se pH jeho koncentrace dále klesala až k 12 %. Ze získaných experimentálních a statistických výsledků lze ale obecně usoudit, že ze sledovaných faktorů měly na průběh degradace statisticky významný vliv teplota a hodnota pH média ( $P \leq 0,05$ ), rozdíl ve způsobu kultivace (aerobní a anaerobní) se ukázal jako statisticky nevýznamný ( $P > 0,05$ ).

#### **4. 4. Experiment IV - Srovnání degradace biogenních aminů kmeny *Bacillus subtilis* IB23 a *Bacillus pumilus* IB26 v závislosti na vnějších podmínkách**

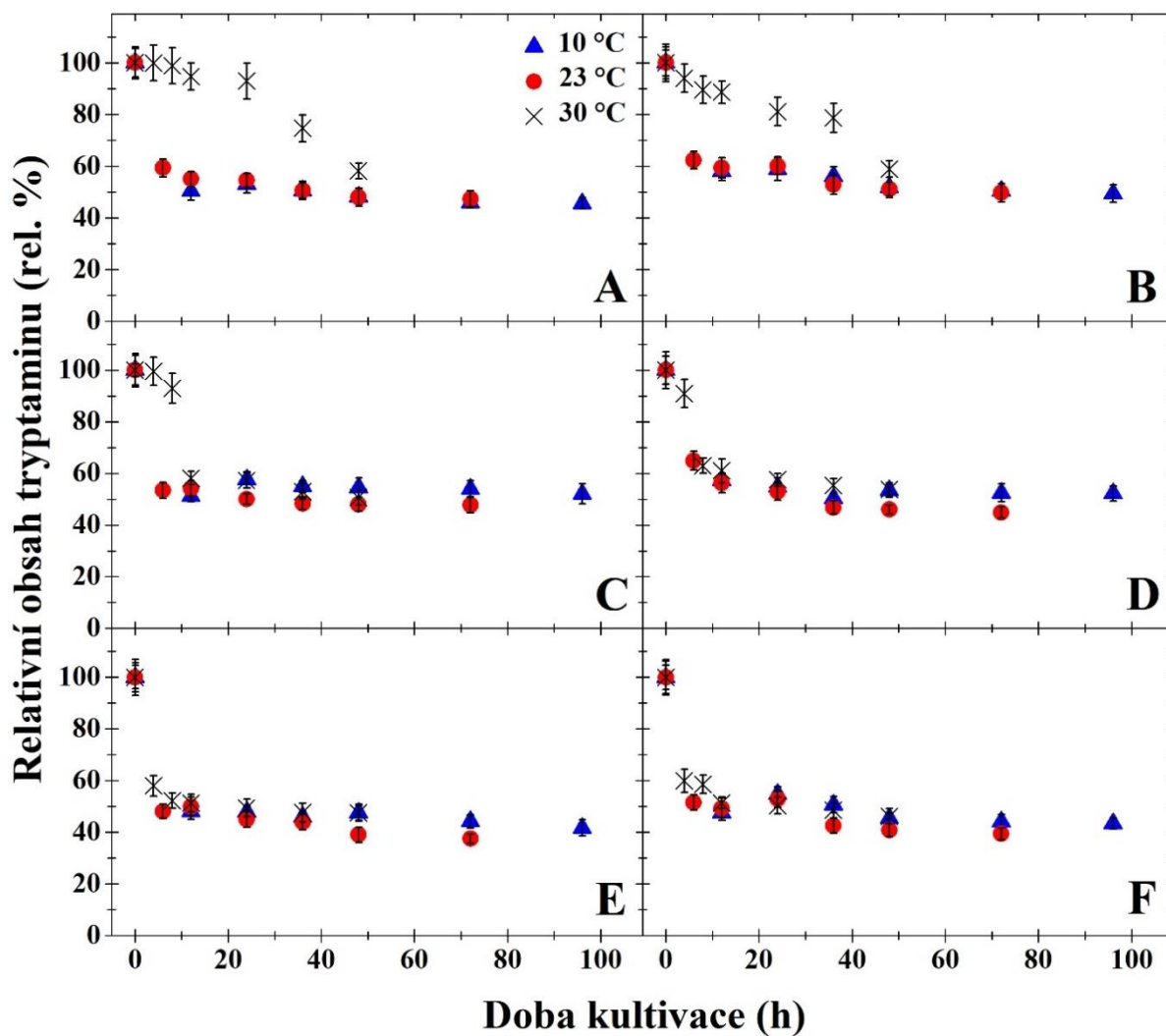
V experimentu IV byla srovnávána schopnost degradace biogenních aminů u 2 kmenů získaných a identifikovaných v experimentech I a II. Na základě výsledků získaných z předchozích experimentů byly pro tento pokus vybrány kmeny rodu *Bacillus*, konkrétně *Bacillus subtilis* IB23 a *Bacillus pumilus* IB26. V tomto experimentu byla srovnávána schopnost degradace 6 vybraných biogenních aminů (tryptaminu, fenylethylaminu, kadaverinu, putrescinu, histaminu a tyraminu) v závislosti na vnějších podmínkách kultivace. V této sérii pokusů byl studován vliv teploty, pH, koncentrace NaCl a typu kultivačního média, kdy byla srovnávána schopnost redukce BA v minerálním médiu MM1, kde jsou jedinými zdroji uhlíku a dusíku opět jen biogenní aminy, s nutričně bohatším médiem NB. Výsledky měření jsou shrnuty na obrázcích 16-51. Vzhledem k množství testovaných parametrů byly výsledky zpracovány v šestipólových grafech pro MM1 a dvoupólových pro NB (z důvodu menšího množství parametrů), kde byl opět srovnáván relativní obsah jednotlivých aminů zvlášť pro každé iniciační pH a každou koncentraci NaCl. Pro každou teplotu byly zvoleny různé odběrové časy (viz Tab. 9) kvůli předpokladu rychlejšího růstu bakterií spolu se zvyšující se teplotou. Vzhledem k nevýznamným statistickým

rozdílům v degradaci jednotlivých aminů za aerobních a anaerobních podmínek v experimentu III byly oba kmeny kultivovány pouze aerobně.

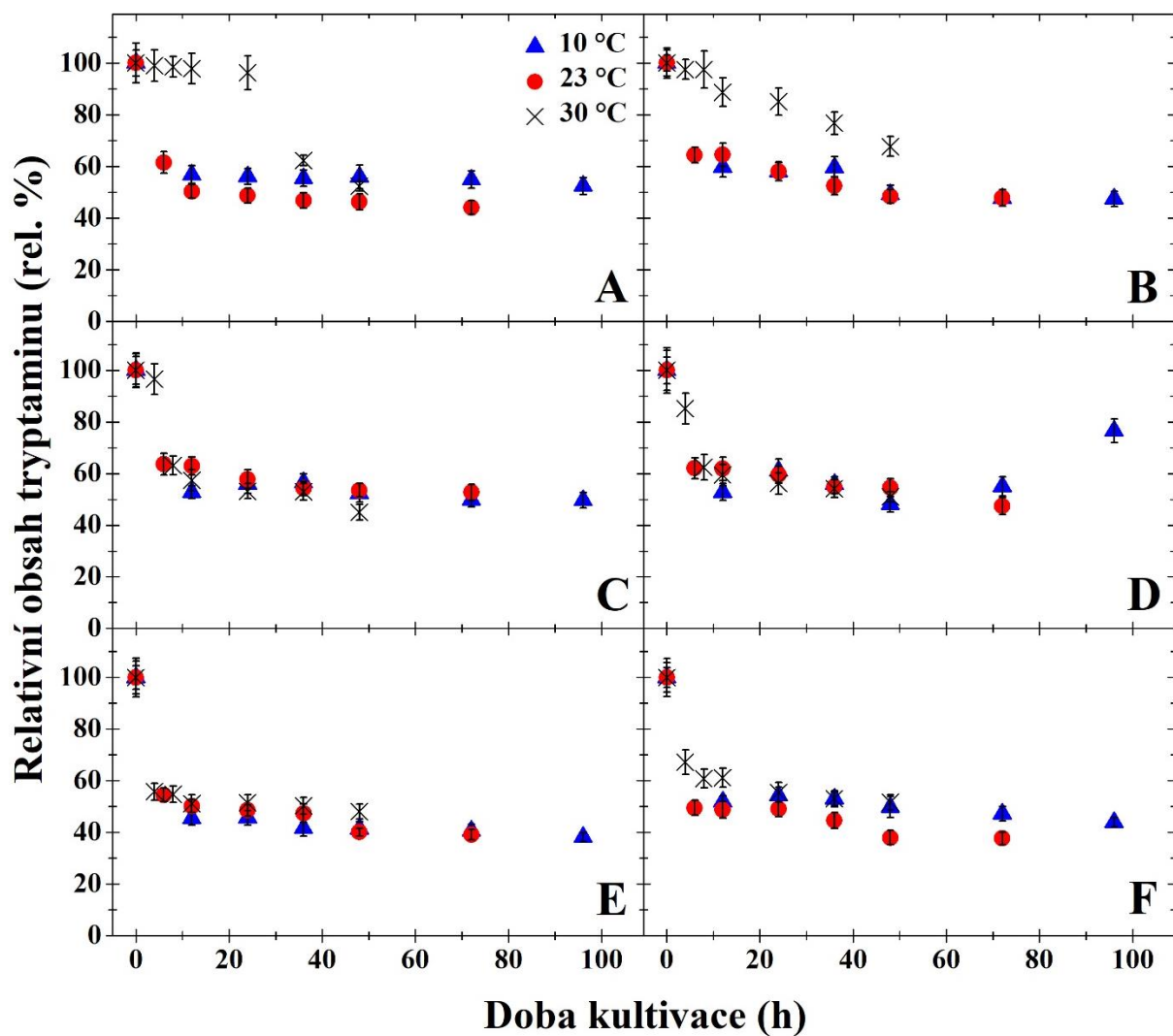
#### 4. 4. 1. Kinetika degradace biogenních aminů kmenem *Bacillus subtilis* IB23

Schopnost degradace tryptaminu kmenem *B. subtilis* IB23 v minerálním médiu byla patrná u všech testovaných koncentrací soli. V prostředí o pH 5 a bez přídavku NaCl při teplotě 30 °C docházelo k nejpomalejšímu úbytku TRY během prvních 48 h kultivace. Po 48 h od inokulace jeho obsah klesl na 58 %, zatímco v médiích s iniciačním pH 7 a 8 došlo po 48 h k poklesu na 50 %. Se zvyšující se koncentrací NaCl byl rozklad tryptaminu ještě pomalejší. V médiu s iniciačním pH 5 s přídavkem 1 % NaCl bylo pozorováno snížení koncentrace na 60 %, při pH 7 na 59 % a při pH 8 na 58 % (Obr. 16). V médiu o pH 5 s přídavkem 2 a 3 % NaCl docházelo k dalšímu zpomalování degradace a poklesu množství TRY. Po 48 h kleslo jeho množství v médiu se 2 % NaCl na 63, se 3 % NaCl na 69 %. Se zvyšujícím se pH byl pozorován i vyšší pokles TRY na 46 % v prostředí se 2 % NaCl a na 50 % se 3 % NaCl. S dalším zvýšením pH na 8 začala degradace opět mírně zpomalovat a po 48 h kultivace byl zaznamenán úbytek tryptaminu o 52 % v prostředí s 2 % NaCl a o 49 % s 3% koncentrací NaCl (Obr. 17). Během kultivace při 23 °C byl pozorován skokový úbytek TRY už po prvních 6 h od inokulace. U všech typů médií se koncentrace TRY snížila aspoň o 35 %. K nejvyššímu úbytku docházelo v médiu o pH 7 bez přídavku soli, a to o 45 % po 6 h kultivace. Výsledná koncentrace tryptaminu byla po 72 h kultivace nejvyšší v médiu o pH 5 a koncentracích soli 1 a 3 %. Na konci měření bylo přítomno 49 % původního obsahu tryptaminu. Nejnižší koncentrace byla po 72 hodinách inkubace pozorována v médiu o pH 8 bez přídavku soli, výsledný obsah tryptaminu byl za těchto podmínek 39 %. Během prvních 12 h kultivace při 23 °C koncentrace tryptaminu výrazně klesla ve všech případech minimálně o 40 % a dále klesala jen velmi zvolna. Degradace tryptaminu kmenem *B. subtilis* IB23 při 10 °C probíhala nejpomaleji opět v médiu o pH 5, tentokrát s 1% NaCl. Po 72 h kultivace klesl obsah tohoto aminu jen o 49 %, nejvyšší míra degradace byla pozorována v kultivačním médiu o pH 8 s 3% koncentrací NaCl, kdy se výsledná koncentrace TRY zastavila na hranici 38 %. Ze získaných výsledků můžeme odvodit, že v případě tryptaminu byla míra degradace za daných podmínek ovlivněna hodnotou pH kultivačního prostředí, kdy spolu s růstem těchto hodnot rostla i míra degradace, a to jak při 23 i 30 °C.

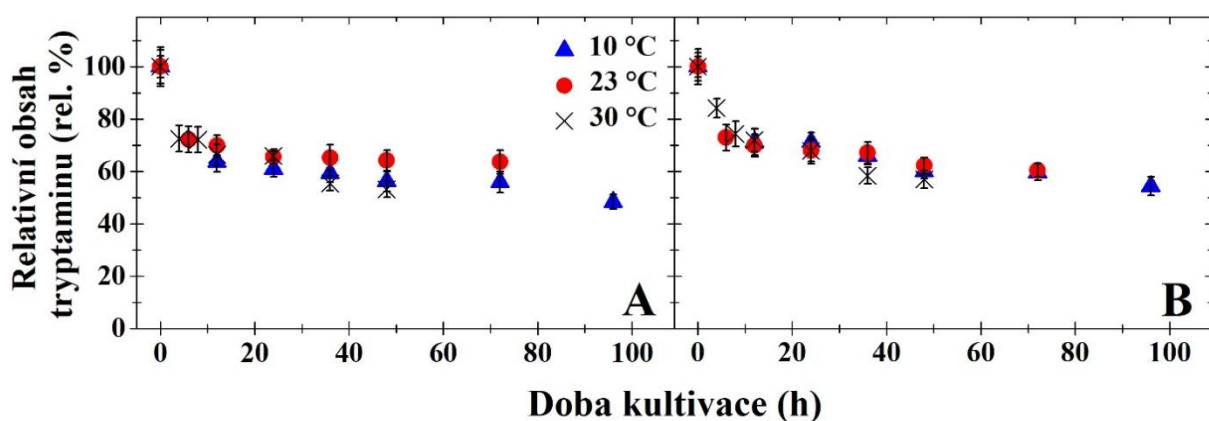
Paralelně probíhající sledování míry degradace tryptaminu v nutričně bohatém médiu NB při 10 °C ukázalo rozdíly v degradaci zmiňovaného aminu v MM1 a NB, kdy v NB bez přídavku NaCl při 10 °C klesl po 72 h obsah TRY na 59 %, zatímco v MM1 se stejným pH se jeho množství snížilo na 55 %. Podobné výsledky byly pozorovány i v prostředí s 2 % NaCl, kdy byl v NB po 72 h TRY degradován o 40 %, v médiu MM1 pak o 55 %. V nutričně bohatém médiu byl TRY nejrychleji degradován při 10 °C bez přídavku soli (Obr. 18).



Obr. 16: Degradace tryptaminu kmenem *B. subtilis* IB23 v minerálním médiu bez přidavku soli a s 1 % NaCl; A, B – pH 5; C, D – pH 7; E, F – pH 8; A, C, E – 0 % NaCl; B, D, F – 1 % NaCl

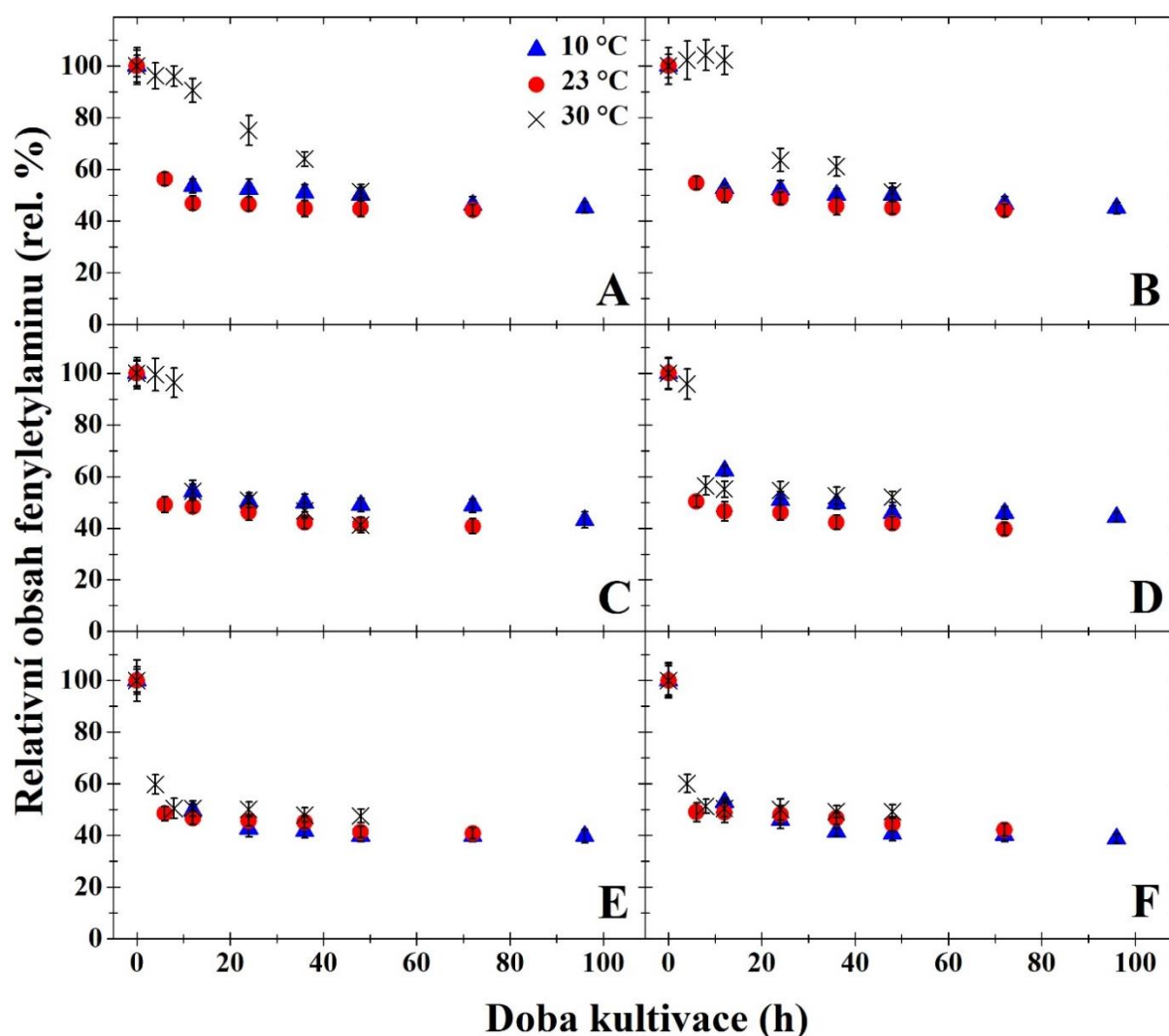


Obr. 17: Degradace tryptaminu kmenem *B. subtilis* IB23 v minerálním médiu s 2 a 3 % NaCl; A, B – pH 5; C, D – pH 7; E, F – pH 8; A, C, E – 2 % NaCl; B, D, F – 3 % NaCl



Obr. 18: Degradace tryptaminu kmenem *B. subtilis* IB23 v nutrient broth; A – 0 % NaCl, B – 2 % NaCl

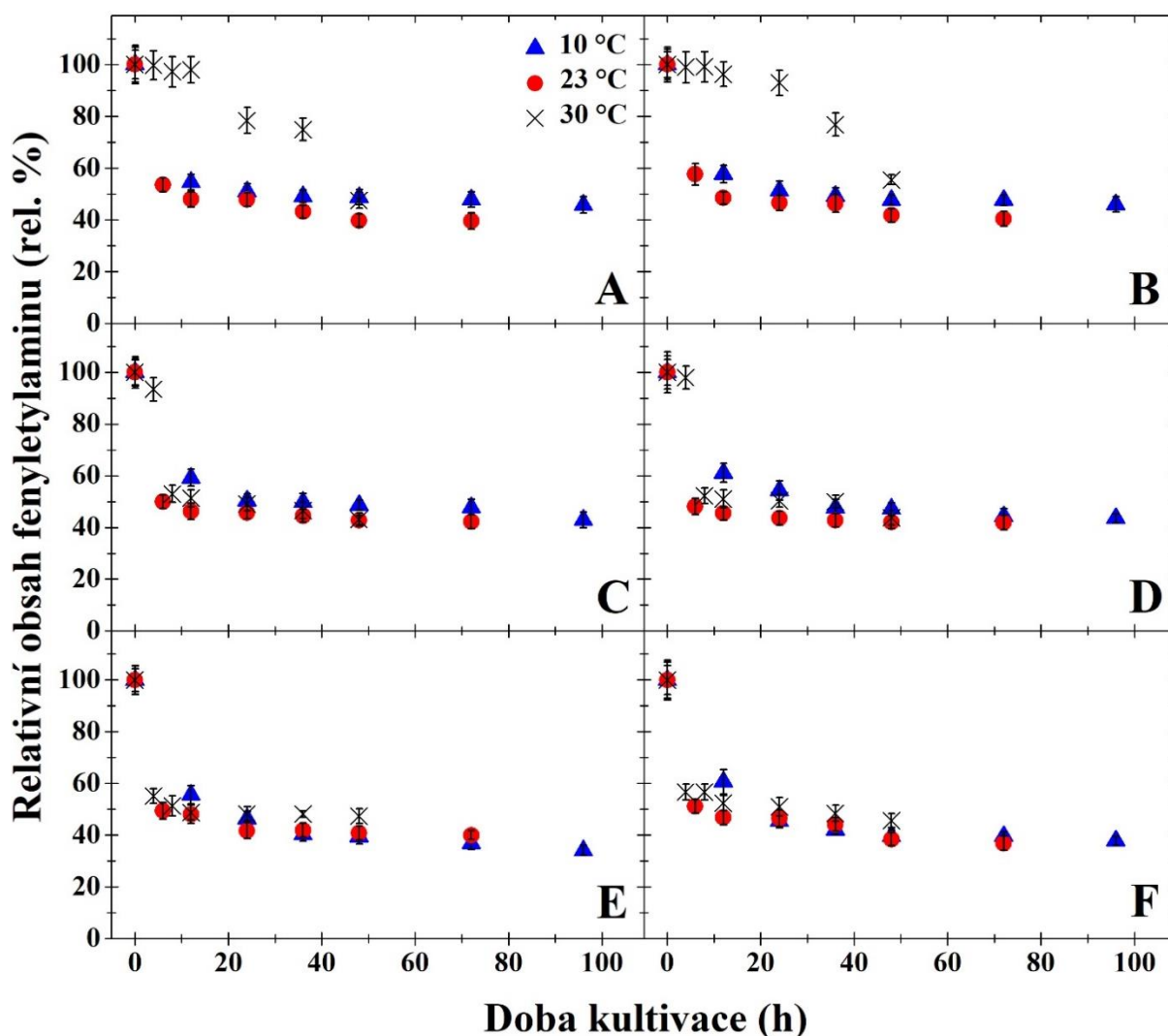
V případě fenylethylaminu probíhala degradace nejrychleji při 23 °C při všech koncentracích solí v médiích o pH 5 a 7. Při této teplotě došlo k výraznému úbytku PEA již během prvních 8 hodin kultivace, kdy se jeho koncentrace pohybovala mezi 57-49 %, přičemž nejvyšší koncentrace (57 %) byla pozorována v médiu o pH 5 s 1 % NaCl, nejnižší koncentrace (49 %) byla naměřena v médiu o pH 8 bez přítomnosti soli (Obr. 19). Na konci 72 h kultivace byla nejnižší hodnota PEA naměřena v médiu o pH 8 s 1 % NaCl, kdy jeho koncentrace činila 37 %. Nejvyšší koncentrace za dané teploty byla na konci kultivace shodně 45 % zjištěna v médiu o pH 5 bez přidavku soli a s její 1% koncentrací. Při teplotě 10 °C probíhala degradace PEA nejpomaleji v neutrálním prostředí u všech sledovaných koncentrací soli. Podobně jako u teploty 23 °C byl obsah PEA snížen výrazně už během prvních 12 h kultivace, kdy došlo k jeho úbytku minimálně o 51 % u všech testovaných parametrů (Obr. 20).



Obr. 19: Degradace fenylethylaminu kmenem *B. subtilis* IB23 v minerálním médiu bez přidavku soli a s 1 % NaCl; A, B – pH 5; C, D – pH 7; E, F – pH 8; A, C, E – 0 % NaCl; B, D, F – 1 % NaCl

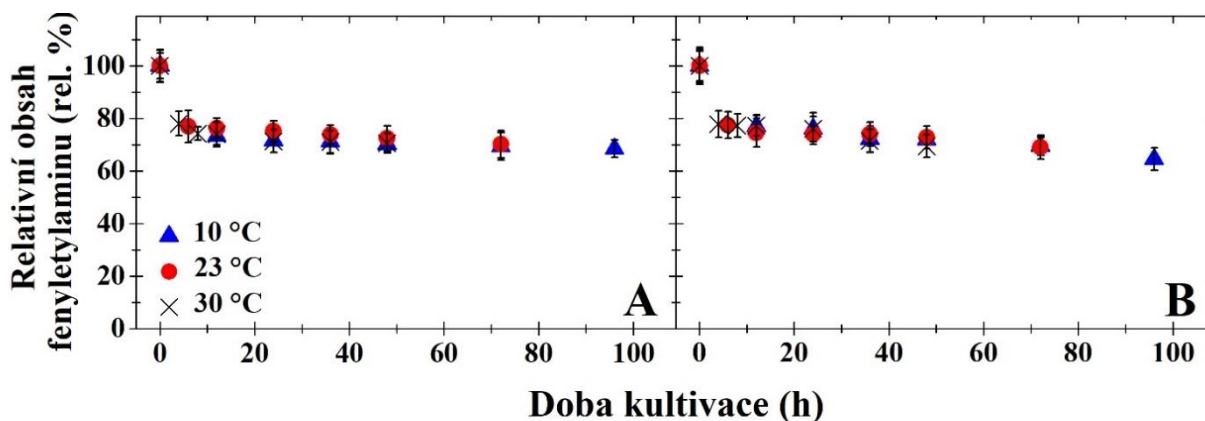


Nejvyšší pokles koncentrace (o 66 %) PEA po 96 h kultivace byl zjištěn během kultivace při teplotě 10 °C v médiu o pH 8 s přidavkem 2 % NaCl. Spolu se zvyšujícím se pH byla degradace fenylethylaminu účinnější. Při kultivační teplotě 30 °C v médiu o pH 5 probíhala degradace prvních 12 hodin, vzhledem k předchozím teplotám, velmi pomalu. Po 12 h kultivace poklesla koncentrace PEA nejvíce v médiu s 1 % soli, jeho obsah klesl o 5 %. Během další doby kultivace můžeme u všech koncentrací soli pozorovat podobný trend, kdy hladiny PEA klesaly pomaleji než během inkubace při 10 °C a 23 °C, v čase 48 h se ale míra degradace víceméně vyrovnala a u všech teplot se úbytek fenylethylaminu pohyboval v rozmezí 45-60 %. Při 30 °C byl po 48 h PEA nejvíce degradován v prostředí o pH 7 s 1 % NaCl, kdy jeho obsah dosahoval 40 % jeho původní koncentrace. I v případě PEA je patrné, že degradace probíhala nejhůře v prostředí o pH 5 bez ohledu na koncentraci soli a nejúčinněji v prostředí o pH 8.



Obr. 20: Degradace fenylethylaminu kmenem *B. subtilis* IB23 v minerálním médiu s 2 a 3 % NaCl; A, B – pH 5; C, D – pH 7; E, F – pH 8; A, C, E – 2 % NaCl; B, D, F – 3 % NaCl

V médiu NB probíhala degradace velmi podobně v prostředí bez soli i v prostředí s 2 % NaCl (Obr. 21). Po 96 h kultivace při 10 °C dosahovala koncentrace PEA v prostředí bez soli 69 %, v médiu s 2 % NaCl 67 %. Obdobných koncentrací dosahoval fenylethylamin i při 23 °C po 72 hodinách kultivace, kdy v médiu bez přídavku NaCl dosahoval 70 % svojí původní koncentrace a v médiu s přídavkem soli 69 %. Ve srovnání s minerálním médiem byla úroveň degradace nižší u všech měřených hodnot.

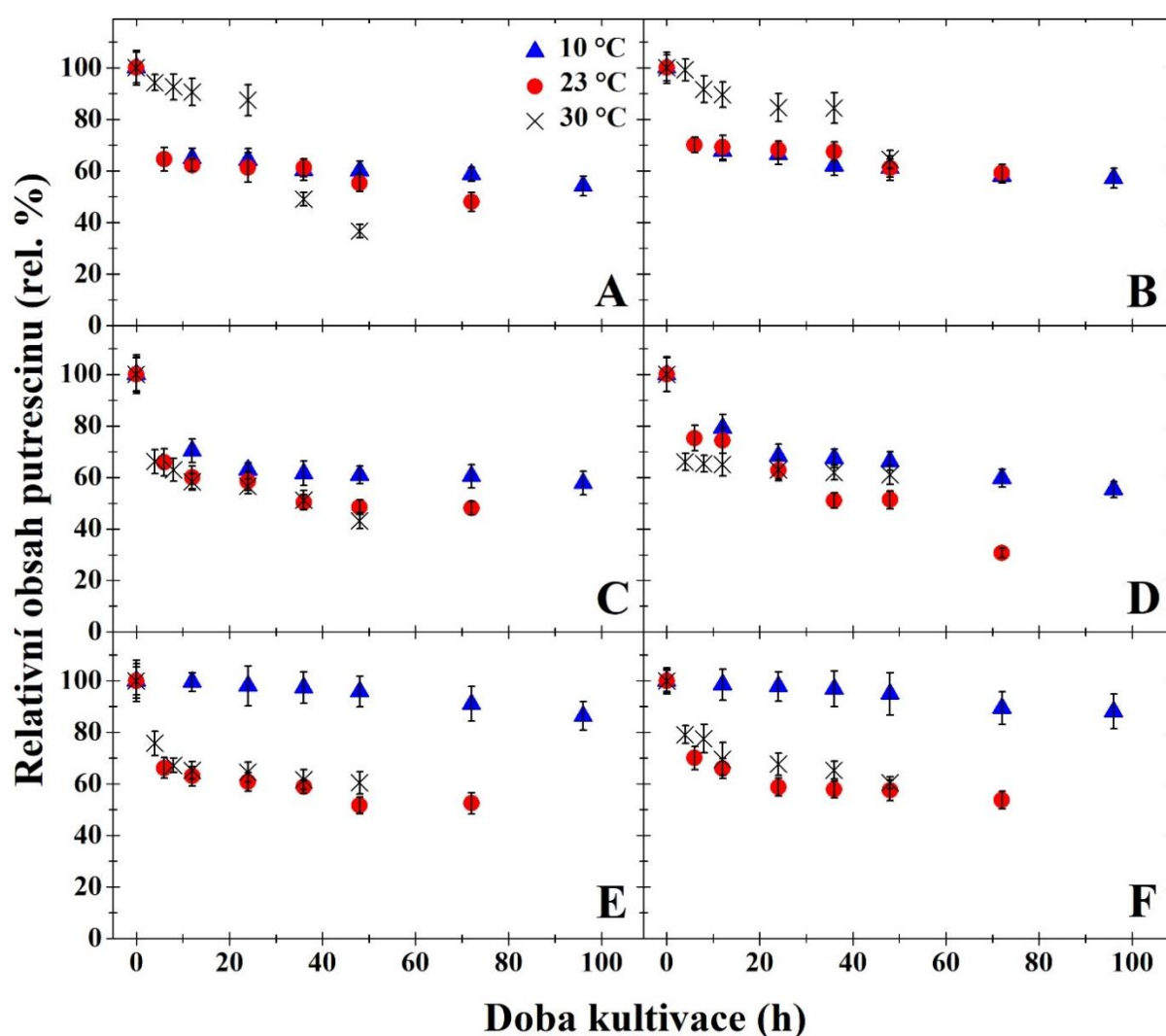


Obr. 21: Degradace fenylethylaminu kmenem *B. subtilis* IB23 v nutrient broth; A – 0 % NaCl, B – 2 % NaCl

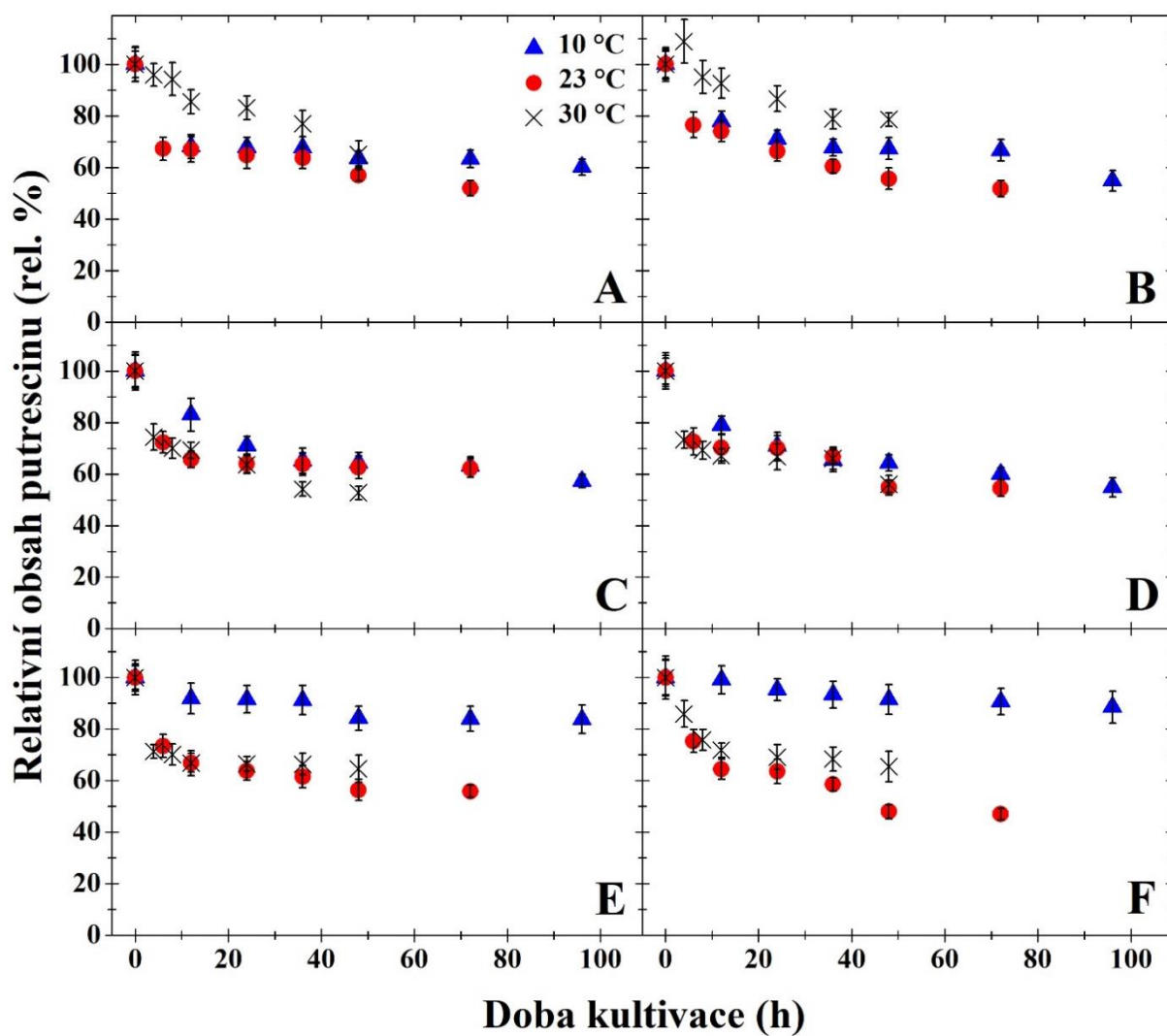
Bakteriální rozklad putrescinu se lišil od předchozích degradací tryptaminu a fenylethylaminu. Zásadním rozdílem byla rychlost a míra degradace při 10 °C. V předchozích případech probíhala degradace za všech sledovaných teplot nejméně v médiu o pH 5. V tomto případě ale můžeme při teplotě 10 °C pozorovat nejmenší úbytek PUT v prostředí o pH 8, a to u všech sledovaných koncentrací soli (Obr. 22, Obr. 23). Během prvních 12 h kultivace zde rozklad putrescinu téměř neprobíhal nebo probíhal jen minimálně. Během této doby byl maximální úbytek putrescinu pozorován v médiu se 2 % NaCl a to pouhých 7 %, v médiu s 1 % soli byl pozorován pouze minimální úbytek (1 %), ve zbylých 2 případech degradace prvních 12 h vůbec neprobíhala. Po 96 h od zaočkování byla výsledná koncentrace PUT v médiu bez soli 86 %, s 1% NaCl 87 %, se 2 % NaCl 85 % a v médiu se 3 % NaCl 89 %. Nejrychleji v prostředí o pH 8 degradoval PUT při teplotě 23 °C ve všech typech médií. Po 72 h kultivace degradoval v médiu s 3 % NaCl *B. subtilis* IB23 52 % původního obsahu putrescinu. Tato hodnota představovala nejvyšší úbytek za dané teploty a zároveň se jednalo o nejvyšší úbytek putrescinu ve všech variantách minerálního média. Nejnižší úbytek (48 %) byl pozorován v médiu bez přídavku soli. V prostředí o pH 5 byl putrescin prvních 48 h degrádován nejpomaleji při 30 °C ve všech médiích s přítomností soli. Během prvních 24 h probíhala kultivace v médiu o pH 7 velmi podobně při 23 °C a při 30 °C. V čase 24 h se nejvíce lišily hodnoty v médiu s 3 % NaCl, kdy se obsah putrescinu lišil o 3 %. V ostatních případech byl rozdíl v obsahu při daných teplotách menší než 1 %. Největší pokles putrescinu po 48 h při teplotě 30 °C byl zjištěn právě v médiu o pH 7 bez přídavku soli. Zároveň se jedná

o nejvyšší pokles obsahu PUT ve všech typech média. V tomto případě koncentrace klesla o 45 %. Na základě předložených výsledků se jeví míra rozkladu putrescinu závislá na koncentraci přítomné soli. Spolu s rostoucí koncentrací klesá míra jeho degradace.

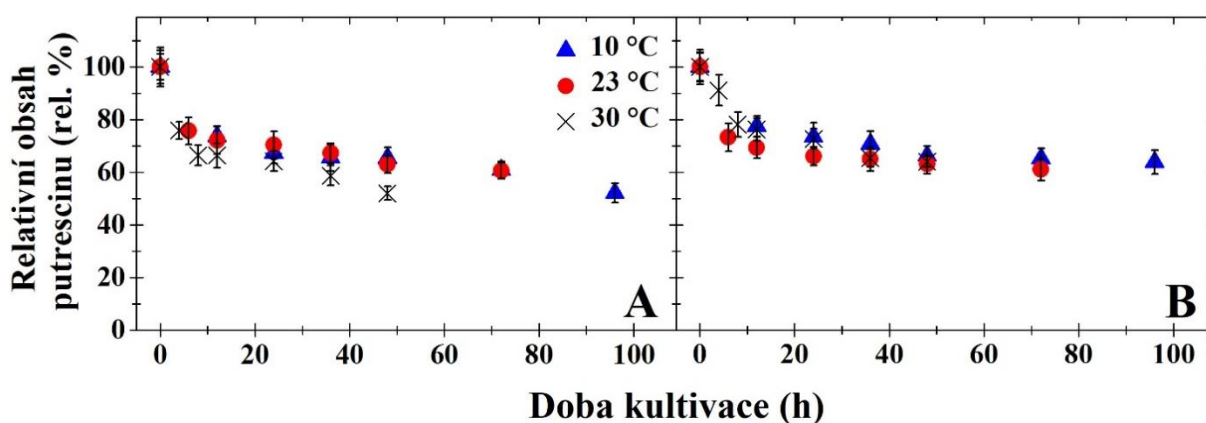
V prostředí NB bez přídavku soli probíhala degradace putrescinu při 10 °C efektivněji než v MM1 (Obr. 24). Po 96 h kultivace klesl jeho obsah o 48 %, což je o 4 % více než v minerálním médiu. Během kultivace v médiu bez přídavku NaCl při 23 °C klesl obsah putrescinu o 40 %, což je o 12 % více než v minerálním médiu se stejnými parametry. Během kultivace při 30 °C byl sledován pokles PUT o 50 %, tedy degradoval o 5 % méně než v MM1. V médiu s obsahem soli probíhala degradace opět v menší míře. Během kultivace při 10 °C bylo v čase 96 h rozloženo pouze třetinové množství PUT. Po 48 h při 30 °C bylo zbytkové množství PUT 62 %.



Obr. 22: Degradace putrescinu kmenem *B. subtilis* IB23 v minerálním médiu bez přídavku soli a s 1 % NaCl; A, B – pH 5; C, D – pH 7; E, F – pH 8; A, C, E – 0 % NaCl; B, D, F – 1 % NaCl

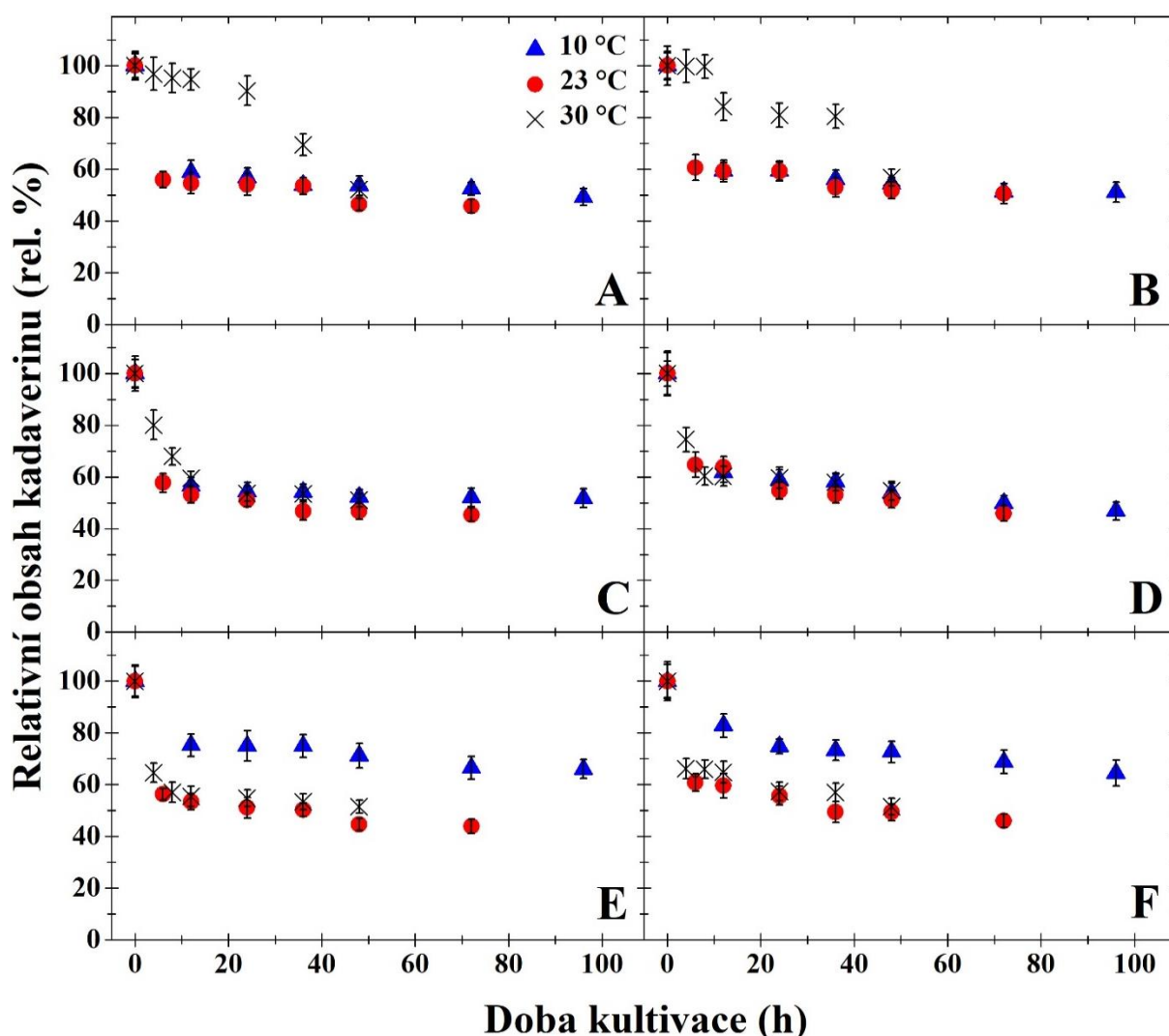


Obr. 23: Degradace putrescinu kmenem *B. subtilis* IB23 v minerálním médiu s 2 a 3 % NaCl; A, B – pH 5; C, D – pH 7; E, F – pH 8; A, C, E – 2 % NaCl; B, D, F – 3 % NaCl



Obr. 24: Degradace putrescinu kmenem *B. subtilis* IB23 v nutrient broth; A – 0 % NaCl, B – 2 % NaCl

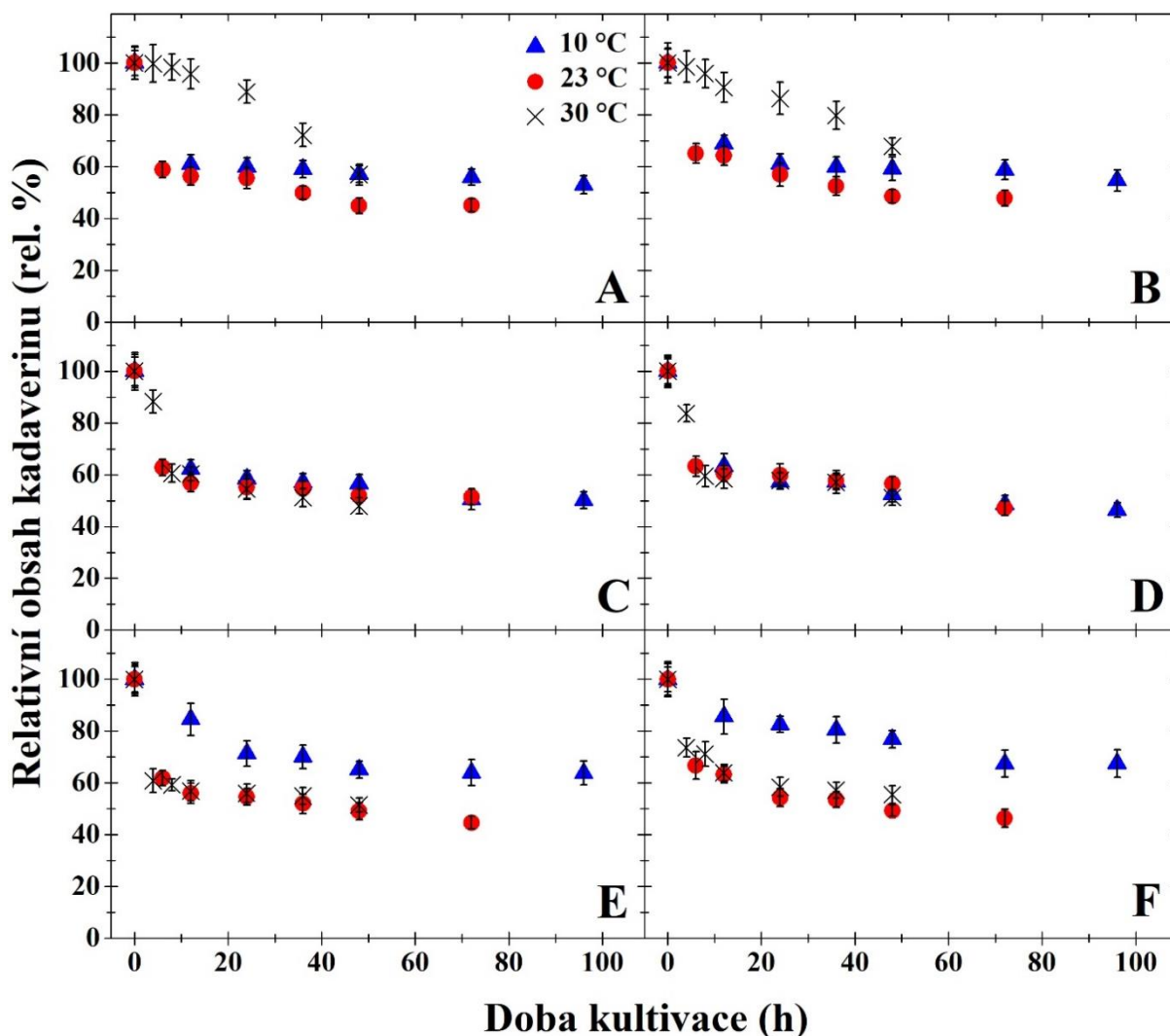
U degradace kadaverinu můžeme pozorovat podobný trend jako u rozkladu putrescinu, kdy byl během kultivace při 10 °C nejméně degradován v médiu o pH 8. Patrný rozdíl jsme však mohli vidět v míře degradace obou aminů. Zatímco putrescin byl v daném prostředí rozkládán jen málo, úbytek kadaverinu je zde mnohem výraznější. U všech variant médií klesl obsah KAD po 96 h od inokulace v rozmezí 33-40 %. Nejvyšší úbytek (33 %) byl, podobně jako v předchozích případech, zaznamenán v médiu bez přídavku NaCl (Obr. 25). Naopak degradace při 23 °C probíhala v médiu o pH 8 nejrychleji ze všech sledovaných variant pH. Po 48 h klesla koncentrace KAD v médiu bez přídavku soli na 43 %. Spolu se zvyšující se koncentrací soli klesala úroveň degradace. Nejmenší efektivita rozkladu KAD v prvních 48 h kultivace byla pozorována v médiu o iniciačním pH 5. Během této doby pozvolna klesla koncentrace kadaverinu v médiu bez přídavku soli o jednu čtvrtinu. Nejvíce byla jeho koncentrace snížena v prostředí s přídavkem 2 % NaCl, kdy po 48 h klesla na 55 % (Obr. 26).



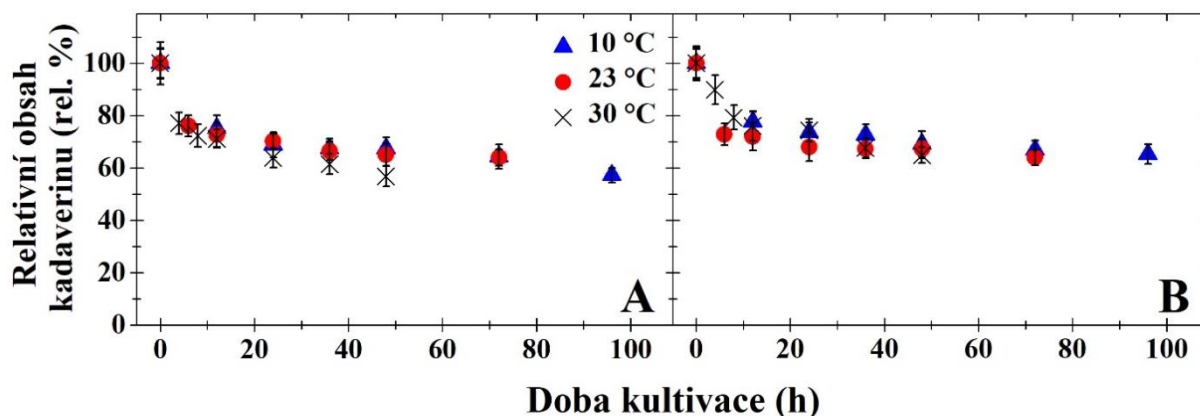
Obr. 25: Degradace kadaverinu kmenem *B. subtilis* IB23 v minerálním médiu bez přídavku soli a s 1 % NaCl; A, B – pH 5; C, D – pH 7; E, F – pH 8; A, C, E – 0 % NaCl; B, D, F – 1 % NaCl

V prostředí o pH 7 probíhala degradace velmi podobně za všech testovaných teplot a ve všech variantách médií. Po 48 h kultivace klesl obsah kadaverinu v rozmezí 40-62 % u všech teplot a všech typů médií a nadále byl pozorován stejný trend, kde koncentrace NaCl za daného pH degradaci téměř neovlivňovala. Např. při teplotě 10 °C byla při pH 7 po 96 h kultivace výsledná koncentrace kadaverinu 51 % v médiu bez obsahu soli, 47 % v médiu s 1 % NaCl, 50 % v médiu s 2 % NaCl a 47 % v médiu s 3 % NaCl. Obdobně probíhal rozklad při 23 °C, kdy se výsledné koncentrace po 72 h pohybovaly mezi 46 a 51 % (Obr. 26). Větší rozdíly v míře degradace byly patrné v médiu o pH 5. I v médiu o tomto pH byl kadaverin degradován nejvíce při teplotě 23 °C.

V NB probíhala degradace podle předpokladů opět méně (Obr. 27). Nejvyšší pokles obsahu KAD byl po 48 h zaznamenán při teplotě 30 °C v médiu bez obsahu soli, kdy klesl na 58 %, což je o 9 % méně než v případě MM1. V NB s přidavkem soli se míra degradace dále snížila a při 30 °C kleslo množství KAD na 68 %.



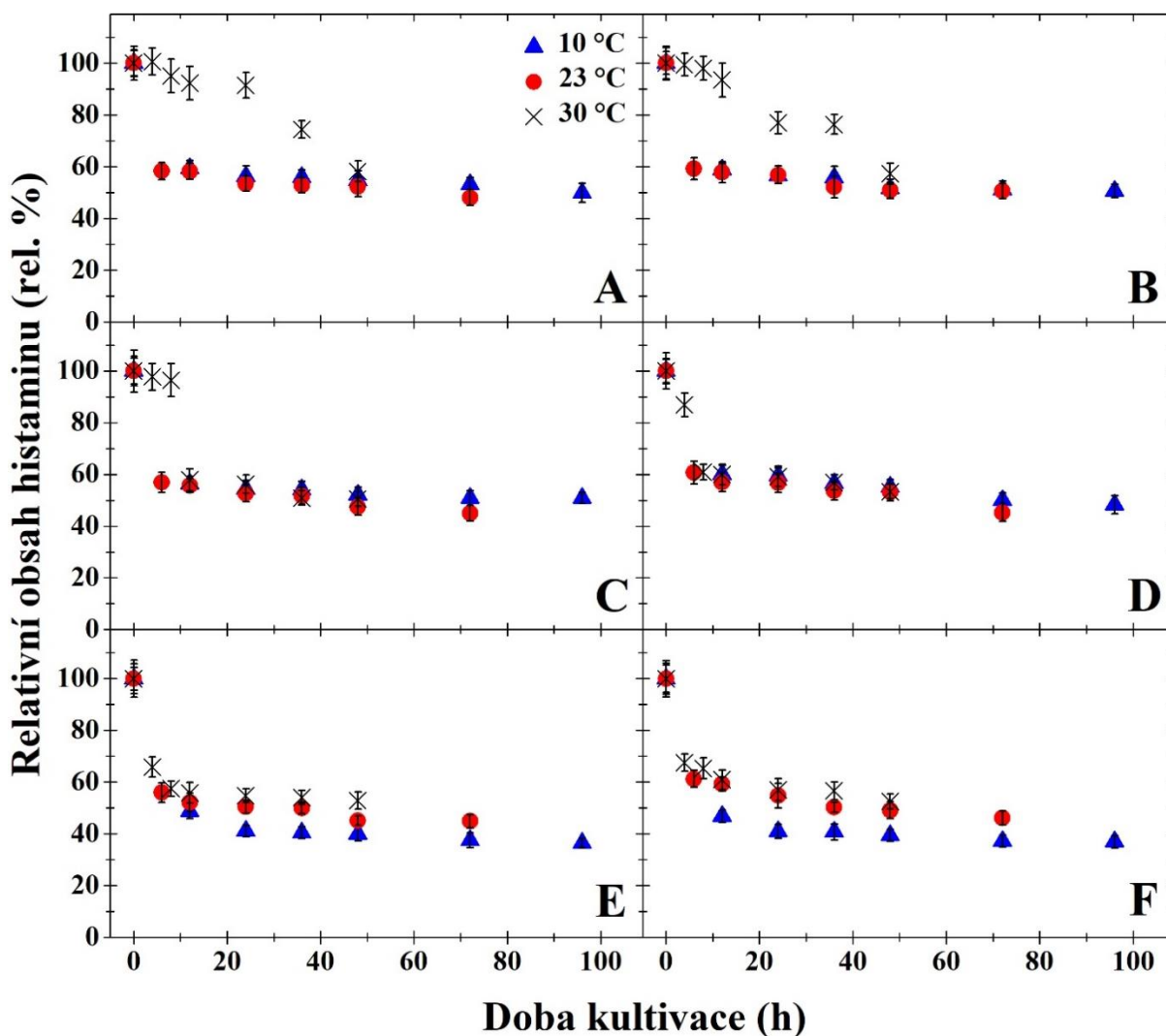
Obr. 26: Degradace kadaverinu kmenem *B. subtilis* IB23 v minerálním médiu s 2 a 3 % NaCl; A, B – pH 5; C, D – pH 7; E, F – pH 8; A, C, E – 2 % NaCl; B, D, F – 3 % NaCl



Obr. 27: Degradace kadaverinu kmenem *B. subtilis* IB23 v nutrient broth; A – 0 % NaCl, B – 2 % NaCl

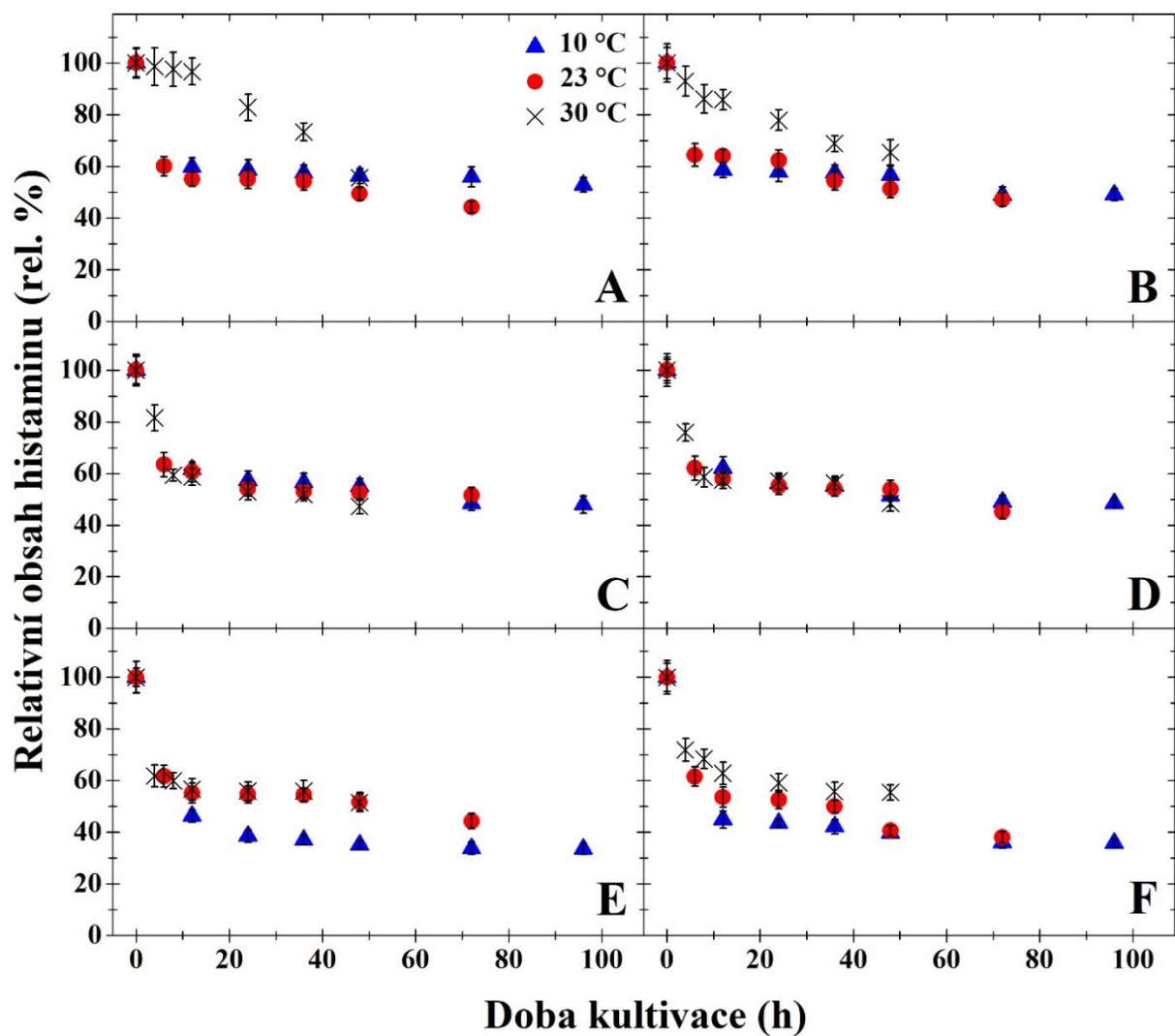
Degradace histaminu probíhala obdobně ve všech variantách médií. Kmen *B. subtilis* IB 23 byl schopen HIM degradovat nejvíce ze všech testovaných aminů, nejefektivněji v médiu o pH 8 při teplotě 10 °C. Výsledná koncentrace se napříč variantami médií ale opět příliš nelišila. Po 96 h kultivace byl výsledný obsah histaminu 39 % jak v médiu bez obsahu soli, tak v médiu obsahujícím 1 % NaCl (Obr. 28). V médiu s obsahem 2 % NaCl byla výsledná koncentrace 35 %, zatímco v médiu s 3 % NaCl 37 % (Obr. 29). V médiu o tomto pH byl histamin nejméně degradován při teplotě 30 °C. Po prvních 4 hodinách, kdy se jeho obsah ve všech typech médií snížil minimálně o čtvrtinu, klesala dál jeho koncentrace už jen mírně. Po 48 h kultivace byly jeho obsahy v jednotlivých variantách médií podobné. V prostředí bez soli byl jeho obsah na konci kultivace 51 %, stejný obsah byl zjištěn i v médiu s 1 % NaCl. Se zvyšující se koncentrací soli velmi mírně klesal i úbytek histaminu. Jeho výsledná koncentrace v prostředí se 2 % soli byla 52 % a v prostředí se 3 % soli 57 %. Průběh degradace při 23 °C vykazoval opět velmi podobné hodnoty napříč všemi typy médií. Největší rozdíly v míře degradace byly patrné v prostředí o pH 8 s 3 % NaCl mezi teplotami 23 °C a 30 °C, kdy byly výsledky v daných časech velmi podobné, a teplotou 10 °C. V průběhu degradace histaminu v médiu o pH 7 byly pozorovány jen minimální rozdíly v koncentraci napříč testovanými teplotami kultivace a koncentracemi soli. S minimálním rozdílem byl HIM nejlépe degradován při teplotě 23 °C v médiu bez NaCl, kdy po 48 h klesl jeho obsah o 53 %. Pro srovnání můžeme uvést, že v daném médiu v daný čas klesla koncentrace HIM během kultivace při 30 °C o 51 % a o 50 % během kultivace při 10 °C. V prostředí o pH 5 klesalo množství histaminu nejpomaleji při 30 °C. Během prvních 4 h kultivace se jeho obsah takřka nezměnil u všech variant médií, kromé média s nejvyšší testovanou koncentrací soli, kde po 4 h klesl obsah histaminu o 8 %. Po 12 hodinách se obsah HIM stále pohyboval kolem 96 %, opět s výjimkou média s 3 % NaCl, kdy byl obsah histaminu 86 %. Po 48 h od inokulace v médiu o pH 5 probíhala degradace nejefektivněji při 23 °C. Po 72 hodinách klesl obsah histaminu nejvíce v médiu s 2 % NaCl, kdy bylo jeho výsledné množství 45 %.

V nutrient broth probíhala degradace bez přidavku soli nejefektivněji při 30 °C (Obr. 30). Během prvních 12 h klesaly hodnoty histaminu velice podobným tempem i při 23 °C a 10° C. Po 96 h kultivace při 10 °C klesl obsah HIM o 41 % v médiu bez soli. Ve stejné variantě MM1 klesl obsah histaminu o 48 %. Nejnižší množství HIM bylo v dané variantě média zjištěno po 48 h při teplotě 30 °C, kdy se jeho obsah snížil o 40 %. V žádné z testovaných variant médií neklesl při teplotě 30 °C obsah histaminu během 48 h o více než 51 %, během 72 h při teplotě 23 °C o více než 62 % a během 96 h při teplotě 10 °C o více než 65 %. V NB s přidavkem soli klesala koncentrace HIM za prvních 24 h nejvíce během kultivace při 23 °C. I v případě nutričně bohatšího média měl přidavek soli vliv na průběh degradace. Po 96 h kultivace byl při 10 °C úbytek histaminu v médiu s 2 % NaCl o 6 % nižší než u varianty bez soli a o 15 % nižší než u stejné varianty v minerálním médiu. Výsledky degradace histaminu byly nejvíce ovlivněny různými hodnotami pH.

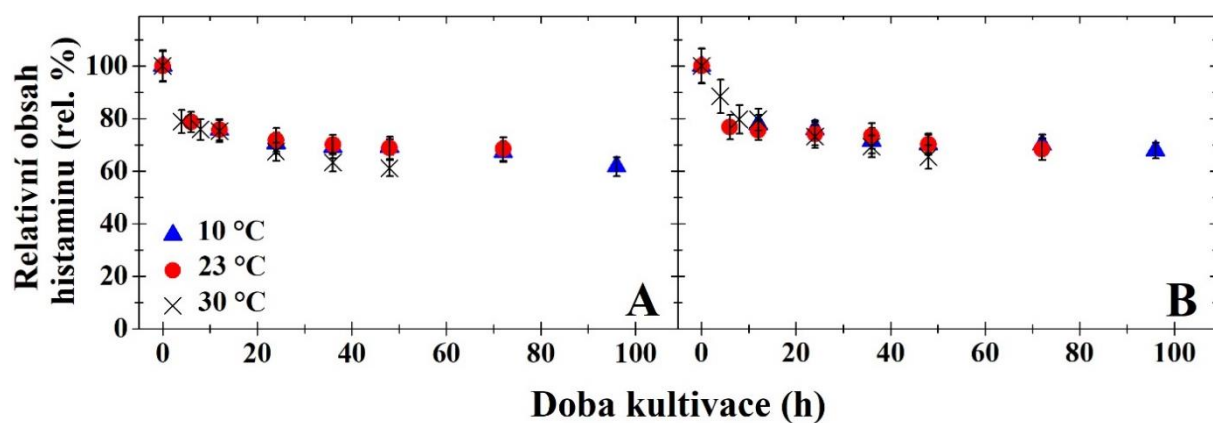


Obr. 28: Degradace histaminu kmenem *B. subtilis* IB23 v minerálním médiu bez přidavku soli a s 1 % NaCl; A, B – pH 5; C, D – pH 7; E, F – pH 8; A, C, E – 0 % NaCl; B, D, F – 1 % NaCl





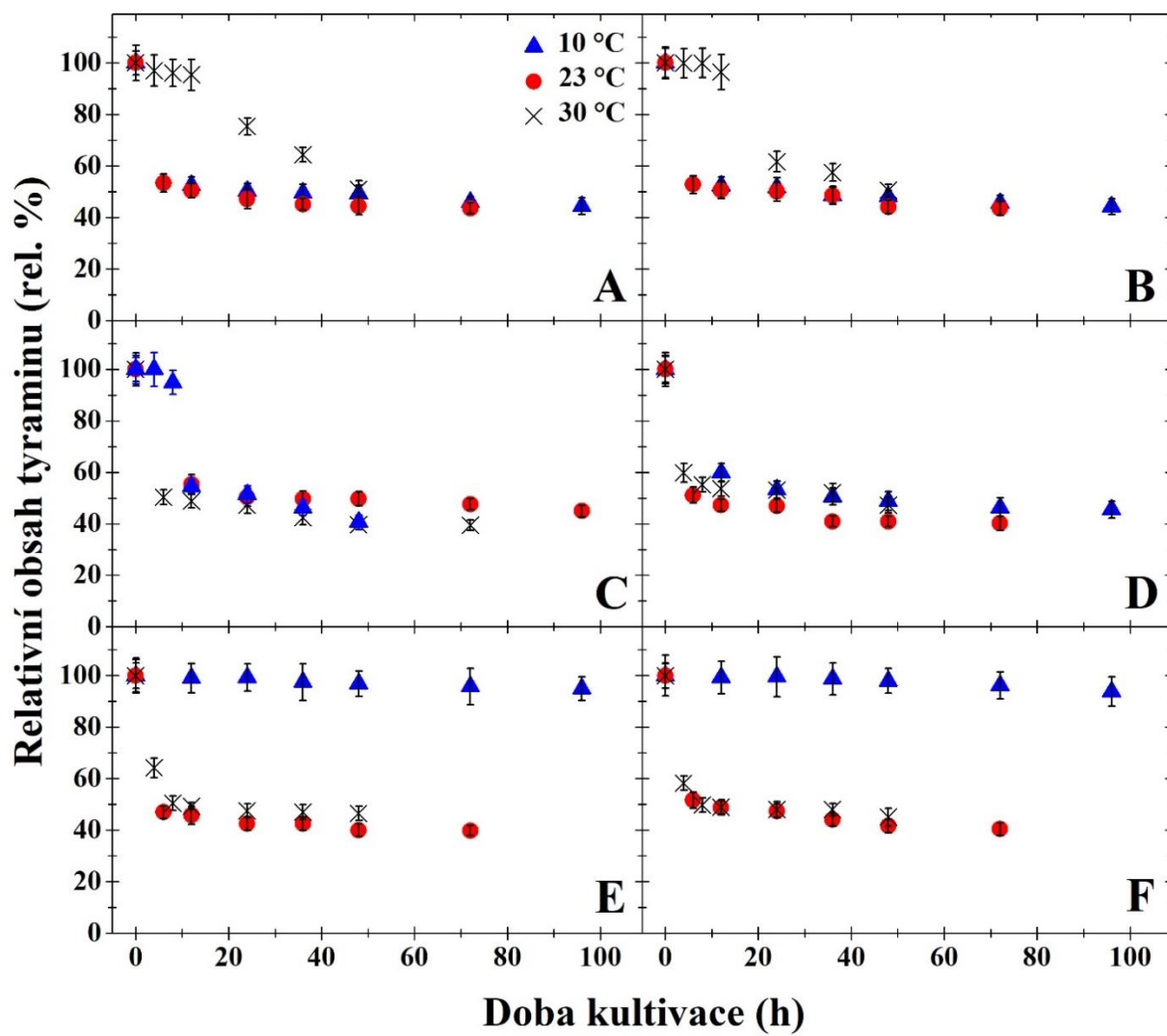
Obr. 29: Degradace histaminu kmenem *B. subtilis* IB23 v minerálním médiu s 2 a 3 % NaCl; A, B – pH 5; C, D – pH 7; E, F – pH 8; A, C, E – 2 % NaCl; B, D, F – 3 % NaCl



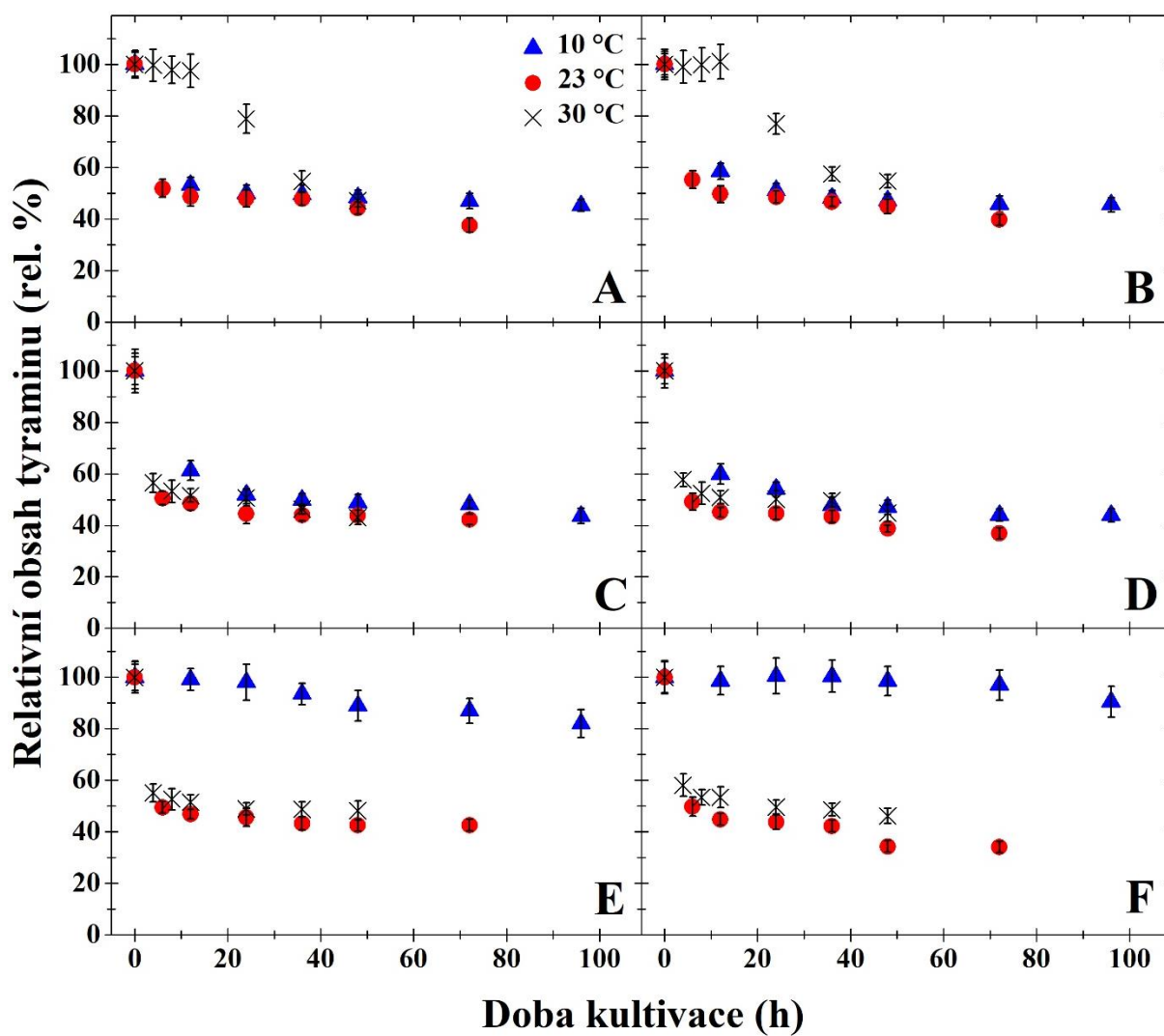
Obr. 30: Degradace histaminu kmenem *B. subtilis* IB23 v nutrient broth; A – 0 % NaCl, B – 2 % NaCl

Nejmenší rozdíly v průběhu degradace tyraminu byly pozorovány u všech variant médií s iniciačním pH 7. V počátečních fázích inkubace při 30 °C byl po 8 hodinách v médiu bez přídavku soli pozorován jen velmi mírný pokles koncentrace tyraminu (o 5 %; Obr. 31), na rozdíl od variant médií s přídavkem soli, kdy hladiny tyraminu výrazně klesaly už po 6 h kultivace. V médiu s 1 % soli klesl obsah TYM o 40 %, v médiu se 2 % NaCl o 44 % a v médiu se 3 % NaCl o 42 % (Obr. 32). Po 48 h kultivace při 30 °C byl ale pozorován vůbec nejvyšší úbytek tyraminu (62 %). Po 96 h kultivace při 10 °C byl v médiu o pH 7 u všech testovaných koncentrací solí zaznamenán úbytek tyraminu v rozmezí 54-56 %. V médiu o pH 5 probíhala nejpomaleji degradace TYM při 30 °C, a to při všech testovaných koncentracích NaCl. Po 48 h při 30 °C klesla hladina TYM o 50 % v médiích bez soli a s 1 % NaCl. V médiích s vyššími koncentracemi soli klesla koncentrace TYM o 45 %. Zatímco už během prvních 6 h inkubace při 23 °C a 10 °C klesly koncentrace tyraminu ve všech variantách médií o pH 5 minimálně o 40 %, při 30 °C začaly koncentrace u všech typů médií výrazněji klesat až po 24 h kultivace, během prvních 12 h kultivace se obsahy tyraminu pohybovaly mez 97 a 100 %. Nejvyšší úbytek TYM ve všech variantách médií o pH 5 byl zaznamenán během inkubace při 23 °C v bujónu s přídavkem 2 % NaCl. Během kultivace při 10 °C probíhala degradace v nejmenší míře v médiu o pH 8 bez ohledu na přítomnost soli. Nejnižší koncentrace tyraminu v prostředí bez soli byla po 96 h kultivace 82 %. V médiu s 1% a 3% koncentrací NaCl se po 96 h objem přítomného tyraminu snížil jen o 10 %, v médiu se 2 % NaCl o 17 %. Stejně jako v případě putrescinu probíhala degradace v prostředí o pH 8 nejrychleji při 23 °C u všech koncentrací soli. Nejmenší rozdíl v míře degradace při 23 a 30 °C byl pozorován u média s 1 % soli.

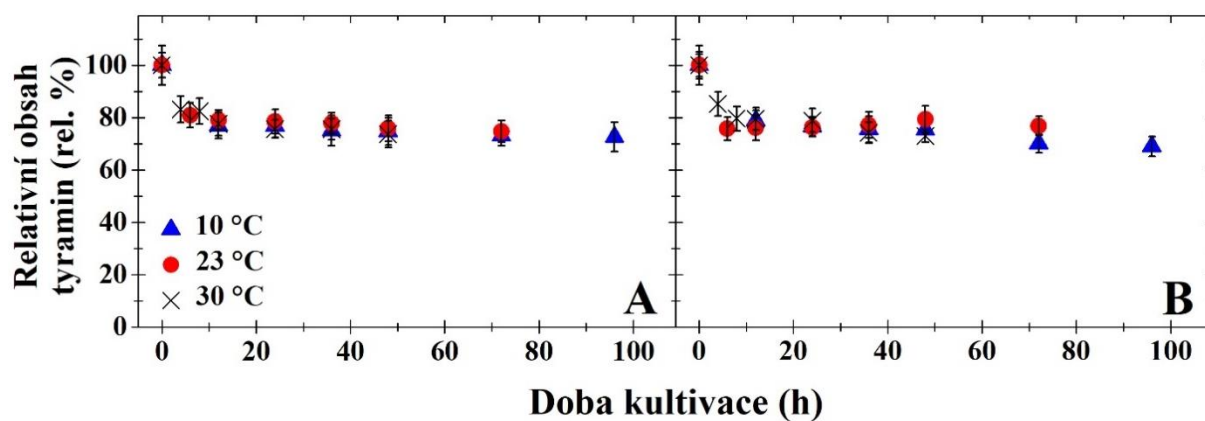
V NB neprobíhala degradace v takové míře jako v MM1 (Obr. 33). Nejvyšší úbytek TYM po 48 h byl patrný po kultivaci při 30 °C v obou variantách média. U žádné z teplot ani variant média nepřesáhl úbytek TYM v NB 30 %, což je o 32 % méně než v případě MM1.



Obr. 31: Degradace tyraminu kmenem *B. subtilis* IB23 v minerálním médiu bez přídavku soli a s 1 % NaCl; A, B – pH 5; C, D – pH 7; E, F – pH 8; A, C, E – 0 % NaCl; B, D, F – 1 % NaCl



Obr. 32: Degradace tyraminu kmenem *B. subtilis* IB23 v minerálním médiu s 2 a 3 % NaCl; A, B – pH 5; C, D – pH 7; E, F – pH 8; A, C, E – 2 % NaCl; B, D, F – 3 % NaCl



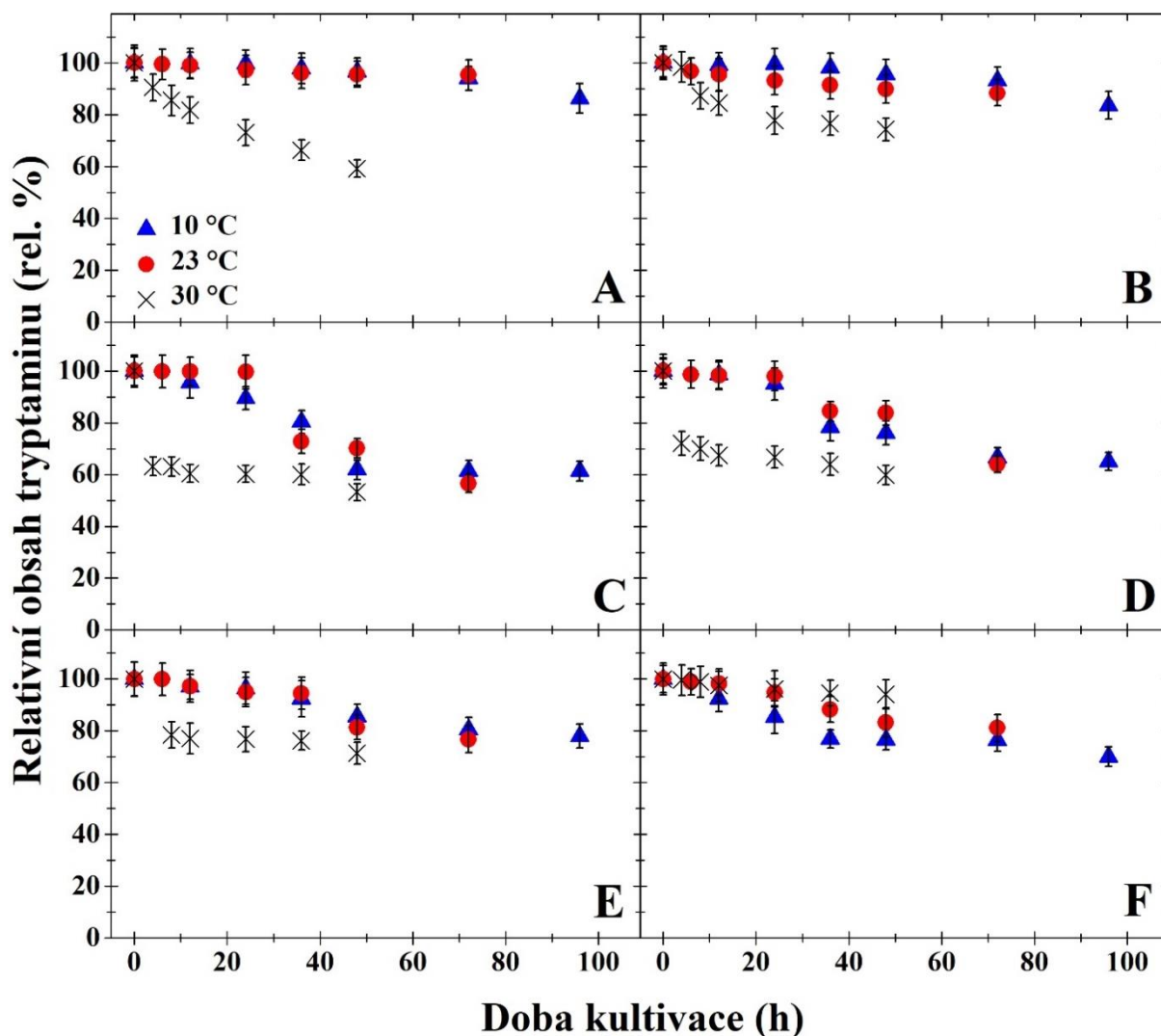
Obr. 33: Degradace tyraminu kmenem *B. subtilis* IB23 v nutrient broth; A – 0 % NaCl, B – 2 % NaCl

Ze statistického hodnocení získaných výsledků degradace biogenních aminů kmenem *B. subtilis* IB23 vyplývá, že všechny testované faktory statisticky významně ovlivňují míru degradace tryptaminu v minerálním médiu ( $P \leq 0,05$ ), v médiu nutrient broth je míra degradace ovlivňována pouze dobou kultivace, ostatní sledované faktory sice ovlivňují míru degradace, ale nejedná se o statisticky významné rozdíly ( $P > 0,05$ ). V případě degradace fenylethylaminu neposkytují testované koncentrace NaCl v minerálním médiu či v nutrient broth významné statistické rozdíly. Bakteriální degradaci putrescinu a kadaverinu v MM1 významně ovlivňují všechny sledované faktory kultivace – čas a teplota kultivace, hodnota pH a koncentrace NaCl ( $P \leq 0,05$ ), na rozklad těchto aminů v NB neměla téměř žádný vliv sledovaná koncentrace soli ( $P > 0,05$ ). U histaminu poskytovaly statisticky významné rozdíly jen sledované hodnoty pH, teplota a čas ( $P \leq 0,05$ ), stejně jako v NB médiu koncentrace soli degradaci výrazně neovlivňovala ( $P > 0,05$ ). Snížení obsahu tyraminu v MM1 za sledovaných podmínek významně ovlivňovaly opět jen hodnoty pH, čas a teplota ( $P \leq 0,05$ ), degradace v NB byla ovlivněna pouze dobou kultivace. Srovnání rozkladu všech biogenních aminů v testovaných médiích ukázalo patrné rozdíly, ale i přes očekávání byly tyto interakce statisticky nevýznamné ( $P > 0,05$ ) a míra degradace byla významně ovlivněna jen dobou kultivace při 30 °C.

#### 4. 4. 2. Kinetika degradace biogenních aminů kmenem *Bacillus pumilus* IB26

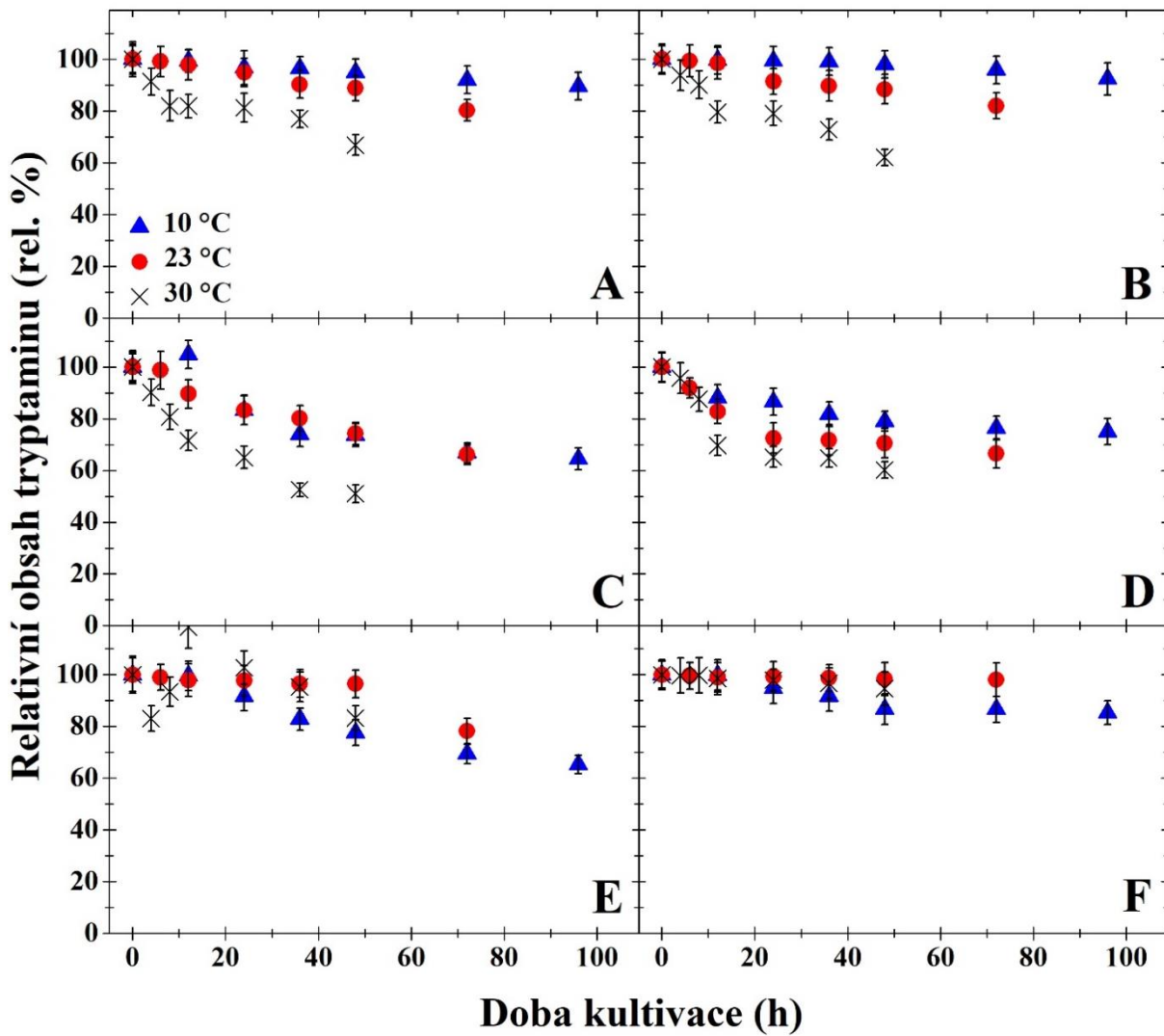
Redukce obsahu tryptaminu kmenem *B. pumilus* IB26 probíhala nejvíce v prostředí o pH 7 během kultivace při 30 °C. Největší pokles obsahu tryptaminu byl po 48 h inkubace detekován v prostředí s obsahem 2 % soli, během této doby pokleslo jeho množství na polovinu, jednalo se o nejvyšší úbytek TRY ve všech variantách médií. Nejmenší pokles (o 40 %) byl pozorován při 30 °C v prostředí o pH 7 v médiích s 1 % a 3 % soli. Degradace během kultivace při 23 °C a 10 °C probíhala méně. Nejvyšší úbytky TRY během kultivace při 10 °C byly zaznamenány v prostředí se 2 % NaCl, s vyšší koncentrací soli byl pokles TRY opět nižší. V médiu s přídavkem 3 % NaCl byl při této teplotě zaznamenán nejnižší úbytek tohoto aminu, a to jen o 24 %. Degradace TRY probíhala v počátečních fázích inkubace rychleji v médiu bez přídavku soli a v médiu s 1 % NaCl, kdy byl během prvních 4 h kultivace detekován pokles koncentrace v obou případech minimálně o čtvrtinu (Obr. 34). Se zvyšujícím se obsahem soli klesaly hladiny tryptaminu pomaleji, v médiu s 2 % NaCl o 9 % a v médiu s 3 % soli o 4 %. Naopak degradace při 23 °C probíhala pomaleji v médiu s nulovým obsahem NaCl a v médiu s 1 % soli, kdy bylo po 24 h kultivace přítomno stále minimálně 96 % obsahu tryptaminu. V médiu se 2 % NaCl klesla koncentrace TRY na 86 % a se zvyšující se koncentrací soli klesl jeho obsah během 24 h o 28 %. Během následující doby se ale proces degradace v médiu bez soli a s 1 % NaCl zrychlil, v médiích se 2 % a 3 % soli naopak zpomalil (Obr. 35). Po 72 h kultivace při 23 °C byla nejnižší koncentrace TRY (57 %) zaznamenána v médiu

bez přídavku soli a s jejím rostoucím obsahem se zvyšoval i výsledný celkový obsah TRY, jehož koncentrace dosahovala na konci 72 h kultivace 67 %. Vůbec nejméně byl tryptamin redukován při 10 °C v prostředí o pH 5 v médiu s obsahem 3 % NaCl. Jeho minimální koncentrace dosahovala 92 % z původního objemu. Nejvíce byl TRY při 10 °C v prostředí o pH 5 degradován v médiu s 1 % NaCl. Jeho koncentrace klesla o 15 %. O trochu více byl TRY degradován při 23 °C v médiích s přídavkem soli, kdy se koncentrace TRY spolu s rostoucím obsahem soli postupně snižovala na 81 %. V médiu bez přídavku soli probíhala degradace při 23 °C v obdobném rozsahu jako při 10 °C. V prostředí o pH 5 byl TRY degradován nejrychleji při 30 °C. Po 48 h byla jeho nejnižší naměřená koncentrace v médiu bez přídavku soli 59 %. Při této teplotě v prostředí o pH 5 byla po 48 h jeho nejvyšší koncentrace 71 %. V prostředí o pH 8 byl TRY nejméně degradován při teplotě 23 °C ve všech médiích s výjimkou média s 1 % soli, kdy byl nejméně degradován při 30 °C. Obsah tryptaminu během kultivace při 23 °C byl po 72 h snížen nejvíce v médiu bez soli (o 21 %), nejméně v médiu se 3 % NaCl (o 3 %). V médiích s přídavkem soli byl TRY rozkládán nejlépe při teplotě 10 °C. Jeho koncentrace po 96 h kultivace klesla o 30 % v médiu s 1 % soli a o 37 % v médiu se 2 % soli. S dalším zvýšením koncentrace soli byl výsledný obsah tryptaminu opět nejméně o 10 % vyšší. Všeobecně probíhal rozklad tryptaminu nejlépe při 30 °C u všech sledovaných hodnot pH v médiu bez obsahu soli.

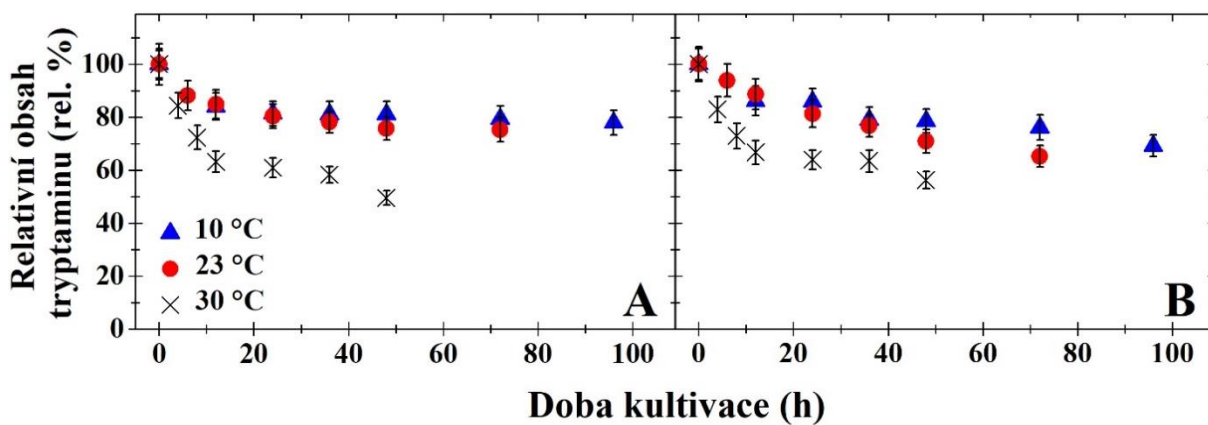


Obr. 34: Degradace tryptaminu kmenem *B. pumilus* IB26 v minerálním médiu bez přídavku soli a s 1 % NaCl; A, B – pH 5; C, D – pH 7; E, F – pH 8; A, C, E – 0 % NaCl; B, D, F – 1 % NaCl

V médiu NB během kultivace při 30 °C klesl obsah tryptaminu nepatrně více než ve stejné variantě minerálního média (Obr. 36). Po 48 h kultivace se jeho obsah v médiu bez soli snížil o 51 %. Nejhuře probíhala degradace během kultivace při 10 °C, kdy byl po 72 hodinách zbytkový obsah TRY 80 %, obsah tryptaminu po kultivaci při 10 °C byl však jen o 3 % nižší. Ve srovnání s MM1 se obsah TRY během kultivace při 10 °C v dané variantě NB média snížil o 17 % méně, při 23 °C o 21 % méně. V médiu s přídavkem 2 % NaCl byl TRY odbouráván ještě pomaleji. Výsledná koncentrace tryptaminu v NB byla po kultivaci při 30 °C 57 %, tedy o 6 % nižší než ve stejné variantě minerálního média. I v médiu obsahujícím 2 % NaCl byl TRY nejvíce degradován při teplotě 30 °C a nejméně při teplotě 10 °C. Po 96 h inkubace při 10 °C byl výsledný úbytek TRY v NB o 6 % nižší než v MM1.



Obr. 35: Degradace tryptaminu kmenem *B. pumilus* IB26 v minerálním médiu s 2 a 3 % NaCl; A, B – pH 5; C, D – pH 7; E, F – pH 8; A, C, E – 2 % NaCl; B, D, F – 3 % NaCl

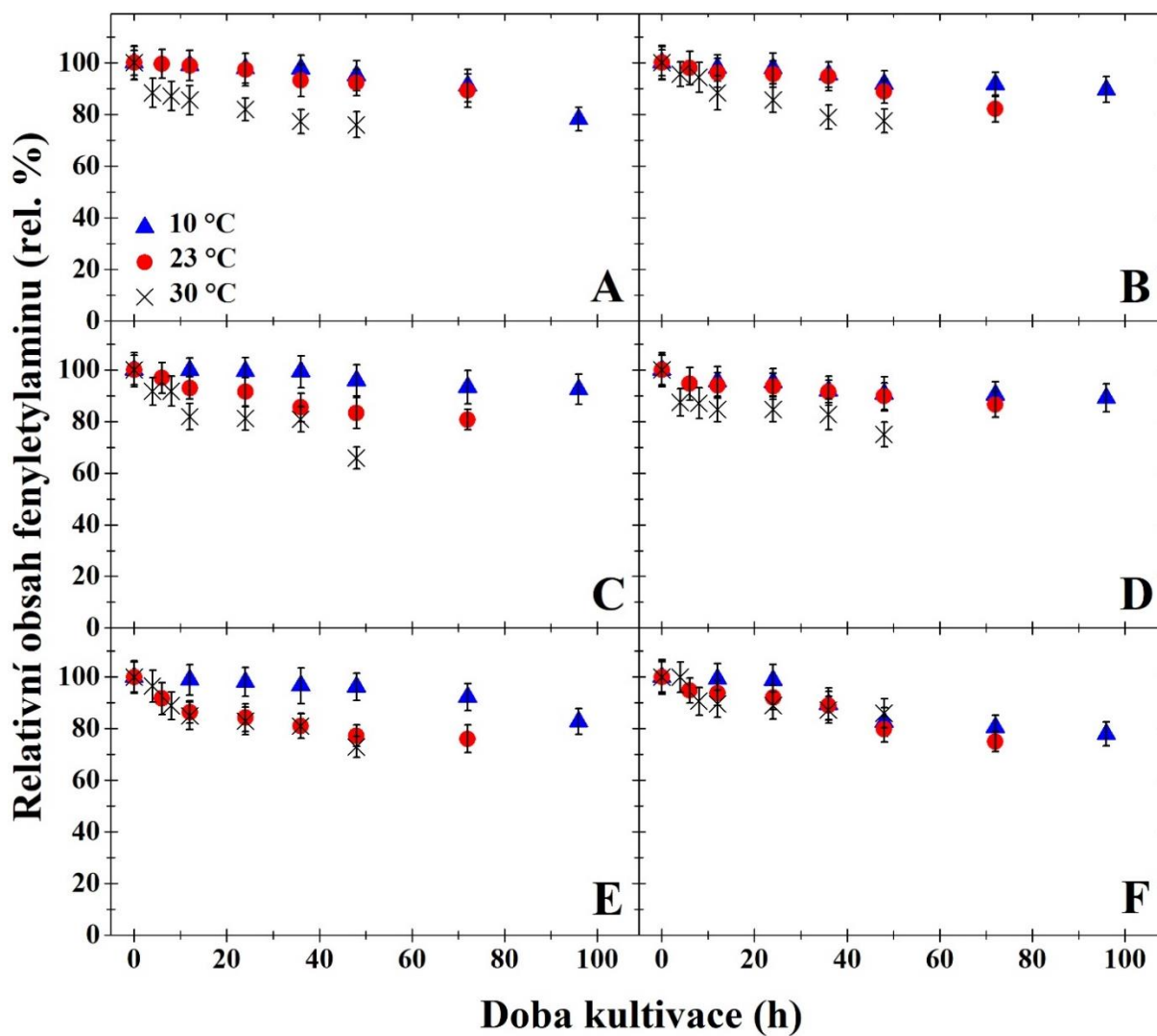


Obr. 36: Degradace tryptaminu kmenem *B. pumilus* IB26 v nutrient broth; A – 0 % NaCl, B – 2 % NaCl

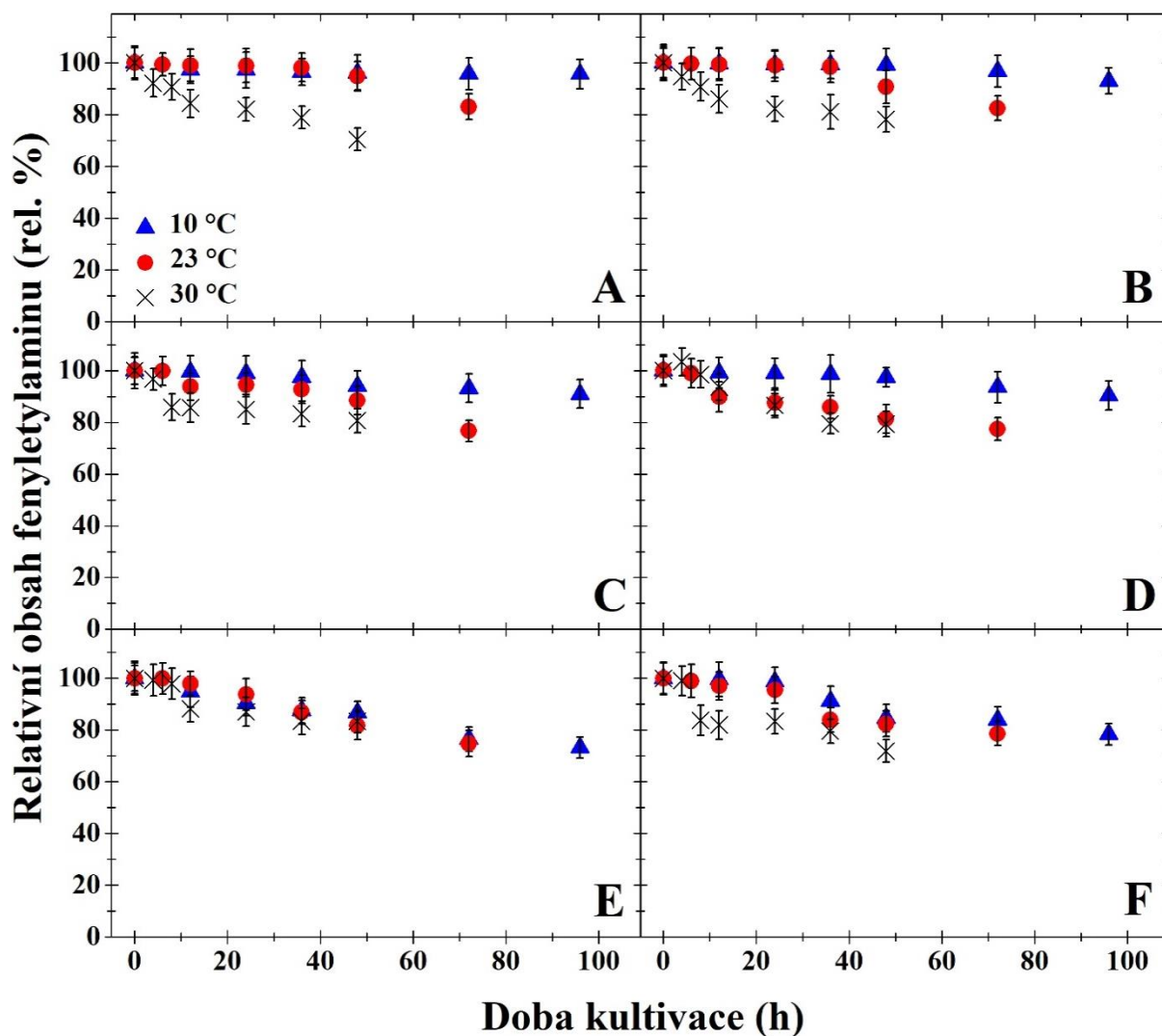


Nejméně ze všech biogenních aminů redukoval kmen *B. pumilus* IB26 fenylethylamin. Ve všech variantách minerálního média byl PEA redukován nejvíce o 35 %. K tomuto poklesu došlo v prostředí o pH 7 při kultivační teplotě 30 °C v médiu bez NaCl (Obr. 37). Výsledná koncentrace se zvyšovala zároveň se zvyšující se koncentrací soli. V médiu s 3 % NaCl se po 48hodinové inkubaci nacházelo 80 % původního množství fenylethylaminu. K nejmenšímu úbytku PEA během inkubace při 30 °C došlo v prostředí o pH 8 s 1 % soli. Po 48 h byl detekován úbytek 15 % obsahu PEA. Koncentrace PEA klesala u všech testovaných teplot pozvolna. Nedocházelo zde k takovým skokovým úbytkům, jako tomu bylo např. při degradaci TRY, kdy v prostředí o pH 7 docházelo k velkým úbytkům již během prvních 4 h kultivace. Rozklad PEA při teplotě 10 °C probíhal ve všech testovaných variantách prostředí nejméně. Nejvyšší úbytek obsahu fenylethylaminu byl zaznamenán v prostředí o pH 8 v médiích s 1% a 2% koncentrací soli. Po 96 h kultivace zde shodně klesla koncentrace PEA o 22 %. Nejnižší úbytek tohoto aminu byl naopak pozorován v prostředí s nejnižším testovaným pH a s obsahem soli 2 % a 3 %, kdy bylo po 96 h inkubace degradováno pouze 2 %, respektive 5 % jeho původního množství (Obr. 38). Ve všech variantách médií klesala koncentrace PEA při inkubační teplotě 10 °C velmi pomalu. V médiu bez soli byl v prostředí o pH 7 snížen obsah fenylethylaminu o 5 %, v prostředí o pH 8 o 2 %. Kultivace při 23 °C vykazovala nevyšší míru degradace v prostředí o pH 8. Nejvíce byl obsah PEA redukován v médiu s přídavkem 1 % NaCl, kdy byla jeho koncentrace po 72 h snížena o 23 %. U ostatních variant médií se však v daném prostředí výsledná koncentrace příliš nelišila a pohybovala se v rozmezí 77-79 %. Nejméně byl za dané teploty PEA rozkládán v prostředí o pH 5. U všech typů médi jeho koncentrace během prvních 36 h kultivace příliš neklesala. Obsah fenylethylaminu se u všech variant médií pohyboval mezi 94 a 98 %. Výraznější pokles koncentrace byl detekován po 72h kultivace, kdy byl pozorován úbytek PEA o 10 % a spolu se zvyšující se koncentrací NaCl se zvyšoval až na 17 %.

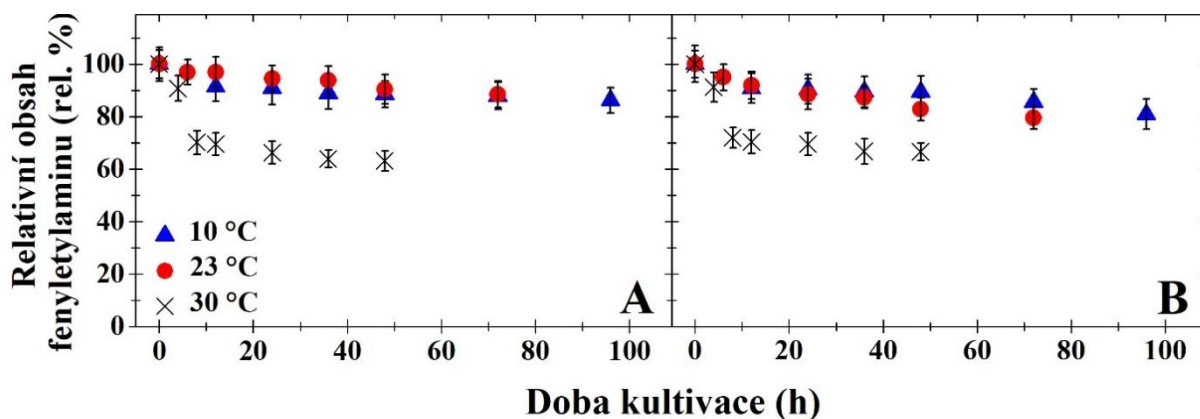
Degradační aktivita *B. pumilus* IB26 v NB ukázala rozdíl v míře degradace zejména za daných teplot. Na rozdíl od rozkladu PEA v MM1, kde za daných podmínek probíhala nejpomaleji degradace při 10 °C, probíhala v NB degradace v médiu bez přídavku soli nejpomaleji při teplotě 23 °C (Obr. 39). Za dané teploty došlo po 72 h v médiu s 2 % NaCl k úbytku PEA vyššímu o 10 %. Nejvíce byl PEA v NB degradován při 30 °C v médiu bez přídavku soli. Koncentrace fenylethylaminu byla po 48 h snížena o 36 %, což je o 4 % více než v médiu s přídavkem soli, a jen o 1 % méně než v MM1. V NB s přídavkem soli probíhal rozklad PEA při 30 °C intenzivněji. Výsledná koncentrace fenylethylaminu po 48h kultivaci byla v médiu bez přídavku soli o 2 % nižší než u dané varianty MM1. Podobné výsledky byly pozorovány i u varianty NB s přídavkem NaCl, kdy bylo detekováno stejné snížení koncentrace jako v příslušné variantě MM1.



Obr. 37: Degradace fenylethylaminu kmenem *B. pumilus* IB26 v minerálním médiu bez přídavku soli a s 1 % NaCl; A, B – pH 5; C, D – pH 7; E, F – pH 8; A, C, E – 0 % NaCl; B, D, F – 1 % NaCl



Obr. 38: Degradace fenylethylaminu kmenem *B. pumilus* IB26 v minerálním médiu s 2 a 3 % NaCl; A, B – pH 5; C, D – pH 7; E, F – pH 8; A, C, E – 2 % NaCl; B, D, F – 3 % NaCl

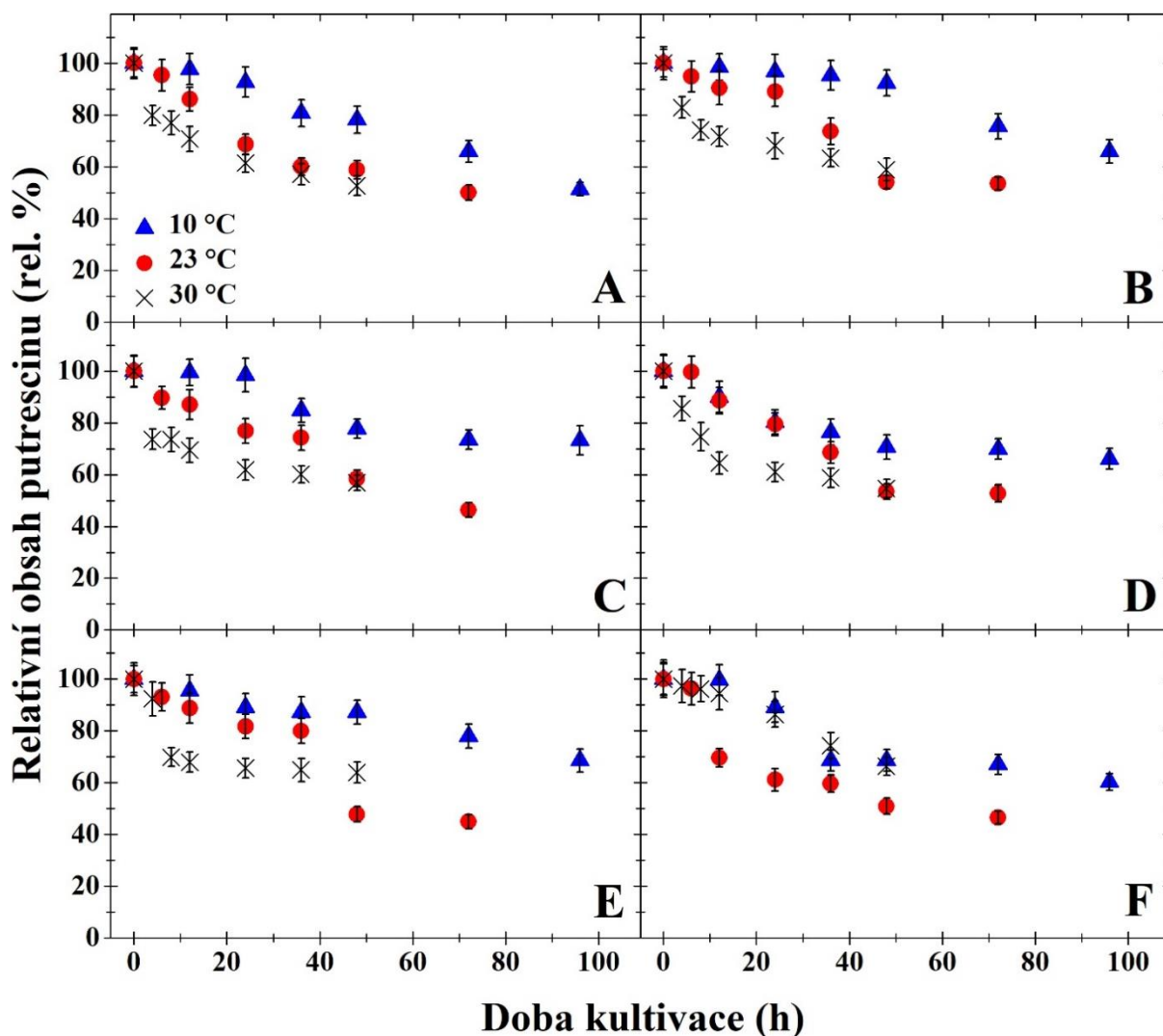


Obr. 39: Degradace fenylethylaminu kmenem *B. pumilus* IB26 v nutrient broth; A – 0 % NaCl, B – 2 % NaCl

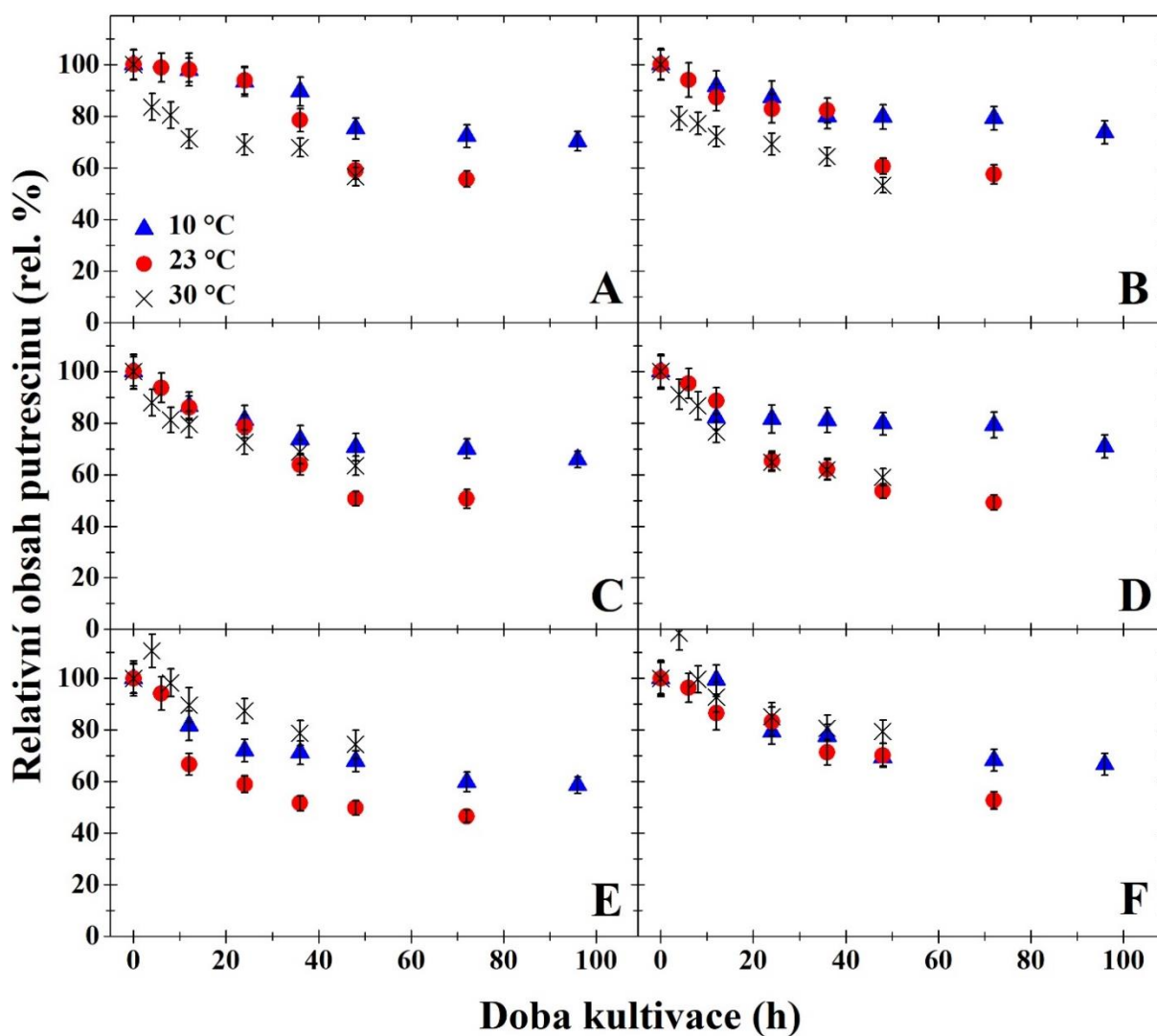
Bakteriální rozklad putrescinu probíhal u kmene *B. pumilus* IB26 nejlépe za teploty 23 °C v prostředí o pH 8 u všech variant médií (Obr. 40, Obr. 41). Nejvyšší úbytek byl však zaznamenán v médiu bez přídavku soli. Jeho koncentrace po 72 h kultivace klesla na 46 %. S rostoucí koncentrací soli se jeho obsah příliš neměnil. U všech zbylých variant média s obsahem soli se jeho množství pohybovalo mezi 48 a 50 % původní koncentrace. Přítomnost soli neměla výrazný vliv na obsah putrescinu ani při kultivaci v médiích o dalších testovaných hodnotách pH. V prostředí o pH 7 se výsledný obsah PUT pohyboval u všech variant médií mezi 47 a 51 %. I zde byl však pozorován nejvyšší úbytek PUT v médiu bez přídavku soli. V prostředí o pH 5 byl po 72 h kultivace při 23 °C zaznamenán největší úbytek opět v médiu bez soli (Obr. 40). Obsah putrescinu klesl o 50 %. V médiích s přídavkem soli se na konci kultivace jeho obsah zvyšoval z 52 na 55 %. Rostoucí koncentrace soli v tomto případě mírně snížila výsledný úbytek PUT. Během inkubace při teplotě 30 °C docházelo k největšímu rozkladu putrescinu v prostředí o pH 7, kdy byla jeho nejnižší koncentrace zachycena v médiu s 1 % soli. Koncentrace tohoto aminu v daném prostředí klesla po 48 h kultivace o 45 %. Nejméně byl PUT při teplotě 30 °C a v prostředí o pH 7 degradován v médiu s přídavkem 2 % NaCl, kdy se jeho hladina pohybovala na 63 %. Při kultivaci v prostředí o pH 8 byl pozorován podobný trend degradace jako v prostředí o pH 7. Výsledná koncentrace PUT byla po 48 h 63 %, tedy o 4 % vyšší než v médiu o pH 7. S přídavkem soli se míra rozkladu PUT při inkubaci ve 30 °C v prostředí o pH 8 snižovala a na konci kultivační doby dosahovala 32 % v médiu s 1 % NaCl, 27 % v médiu se 2 % NaCl a 22 % v médiu se 3 % NaCl. Během kultivace při 30 °C v prostředí o pH 5 dosahovaly nejnižší koncentrace putrescinu 54 % v médiu s nejvyšším testovaným obsahem soli. S výjimkou média o pH 8 s 3 % NaCl (Obr. 41) jsme mohli u všech ostatních variant médií po 48 h pozorovat nejmenší snížení koncentrace PUT po inkubaci při 10 °C. Za kultivace při 10 °C byl PUT nejvíce degradován v prostředí o pH 5 v médiu bez soli. Jeho koncentrace dosahovala po 96 h kultivace 52 %, naopak nejhůře byl degradován v médiu bez přídavku soli v prostředí o pH 7. V prostředí o pH 5 v médiu s přídavkem 1 % NaCl se za prvních 48 h kultivace jeho obsah snižoval relativně pomalu. Po 2 dnech kultivace při 10 °C za daných podmínek klesl obsah putrescinu v této variantě média vůbec nejméně, o 8 %.

Inkubace v nutrient broth vykazovala oproti inkubace v MM1 i v případě degradace putrescinu statisticky významné rozdíly ( $P \leq 0,05$ ), a to zejména během kultivace při 23 °C v médiu bez přídavku NaCl (Obr. 42). V médiu NB klesaly hodnoty putrescinu během kultivace při 10 °C a 23 °C ve srovnání s MM1 velmi pomalu (Obr. 42). Ve variantě minerálního média, kde docházelo k rozkladu PUT za daných podmínek nejrychleji, klesala jeho koncentrace v NB prvních 36 h nejpomaleji. Výsledná koncentrace putrescinu po 72 h kultivace při 23 °C dosahovala 77 %, což je o 32 % více než u MM1. Ve variantě NB s přídavkem soli klesala koncentrace PUT při 23 °C rychleji a jeho výsledný zůstatek byl po 96 h inkubace o 11 % nižší než u varianty média bez soli, ale o 19 % vyšší

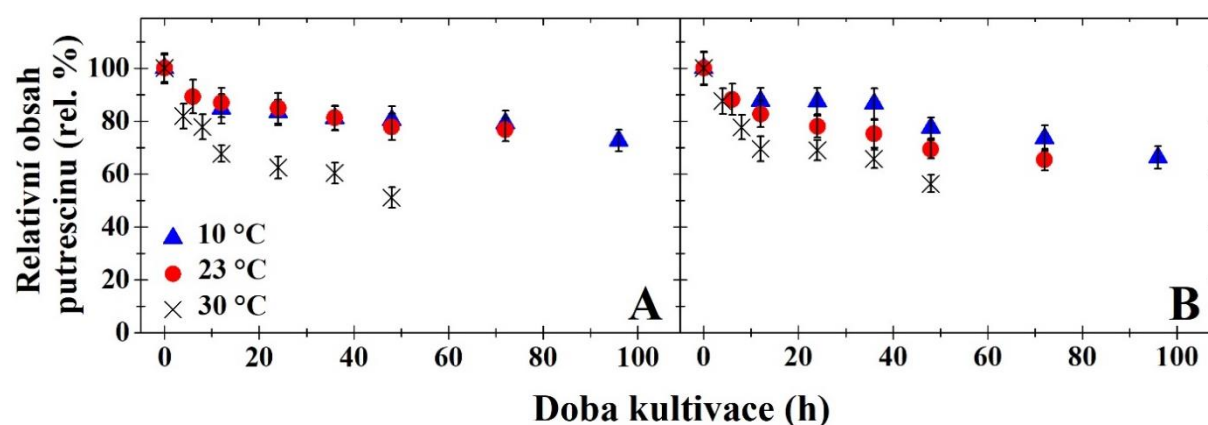
než ve stejné variantě s MM1. Nejvyšší snížení obsahu putrescinu v NB bylo pozorováno během kultivace při 30 °C. Jeho obsah klesl po 48 h na 50 %. Ve srovnání se stejnou variantou MM1 byl jeho výsledný obsah v NB v daném čase o 10 % nižší. Degradace v nutrient broth s přidavkem soli byla i v tomto případě mírně vyšší. Výsledná koncentrace PUT klesla v porovnání s variantou MM1 o 3 % více.



Obr. 40: Degradace putrescinu kmenem *B. pumilus* IB26 v minerálním médiu bez přidavku soli a s 1 % NaCl; A, B – pH 5; C, D – pH 7; E, F – pH 8; A, C, E – 0 % NaCl; B, D, F – 1 % NaCl



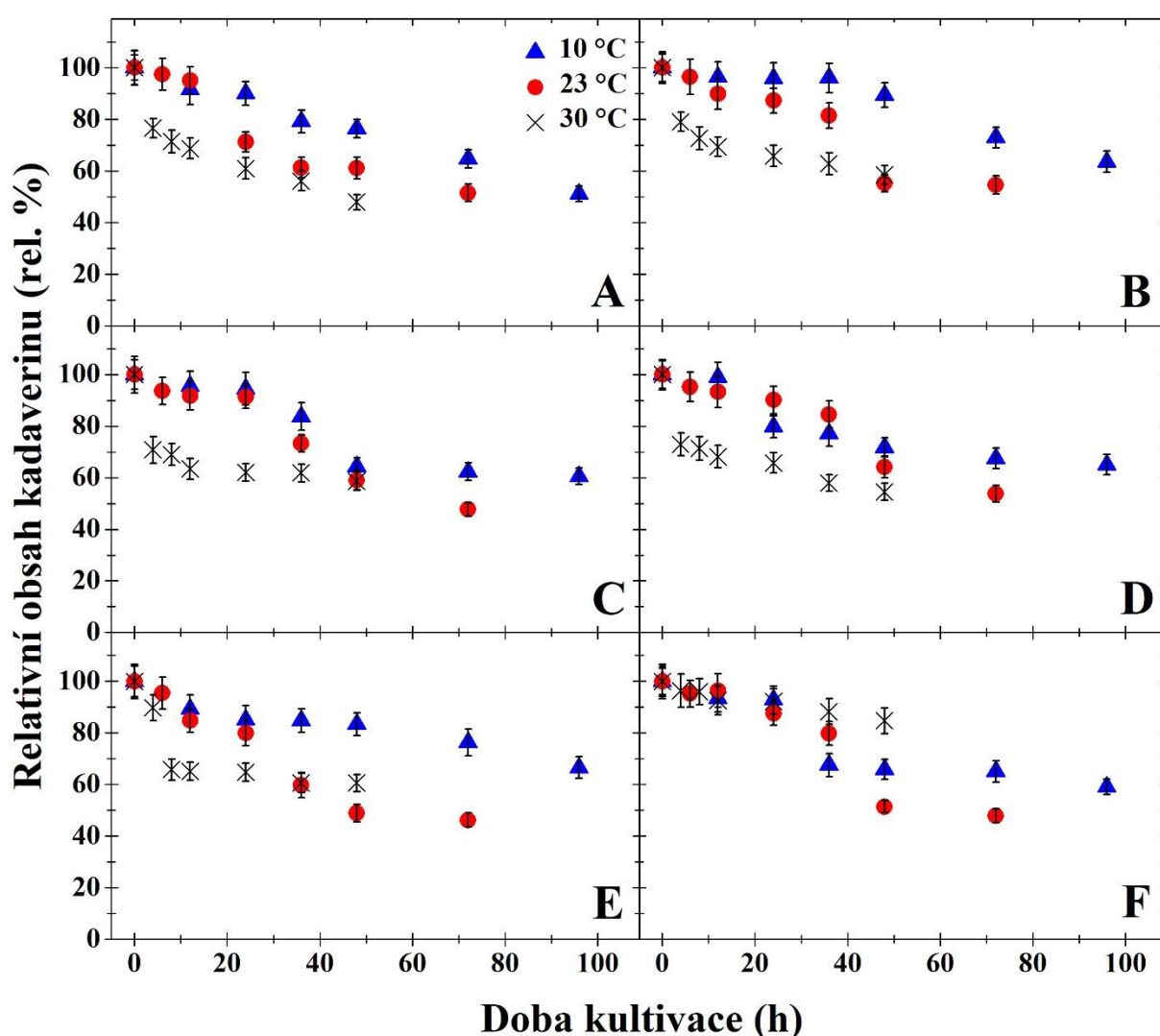
Obr. 41: Degradace putrescinu kmenem *B. pumilus* IB26 v minerálním médiu s 2 a 3 % NaCl; A, B – pH 5; C, D – pH 7; E, F – pH 8; A, C, E – 2 % NaCl; B, D, F – 3 % NaCl



Obr. 42: Degradace putrescinu kmenem *B. pumilus* IB26 v nutrient broth; A – 0 % NaCl, B – 2 % NaCl

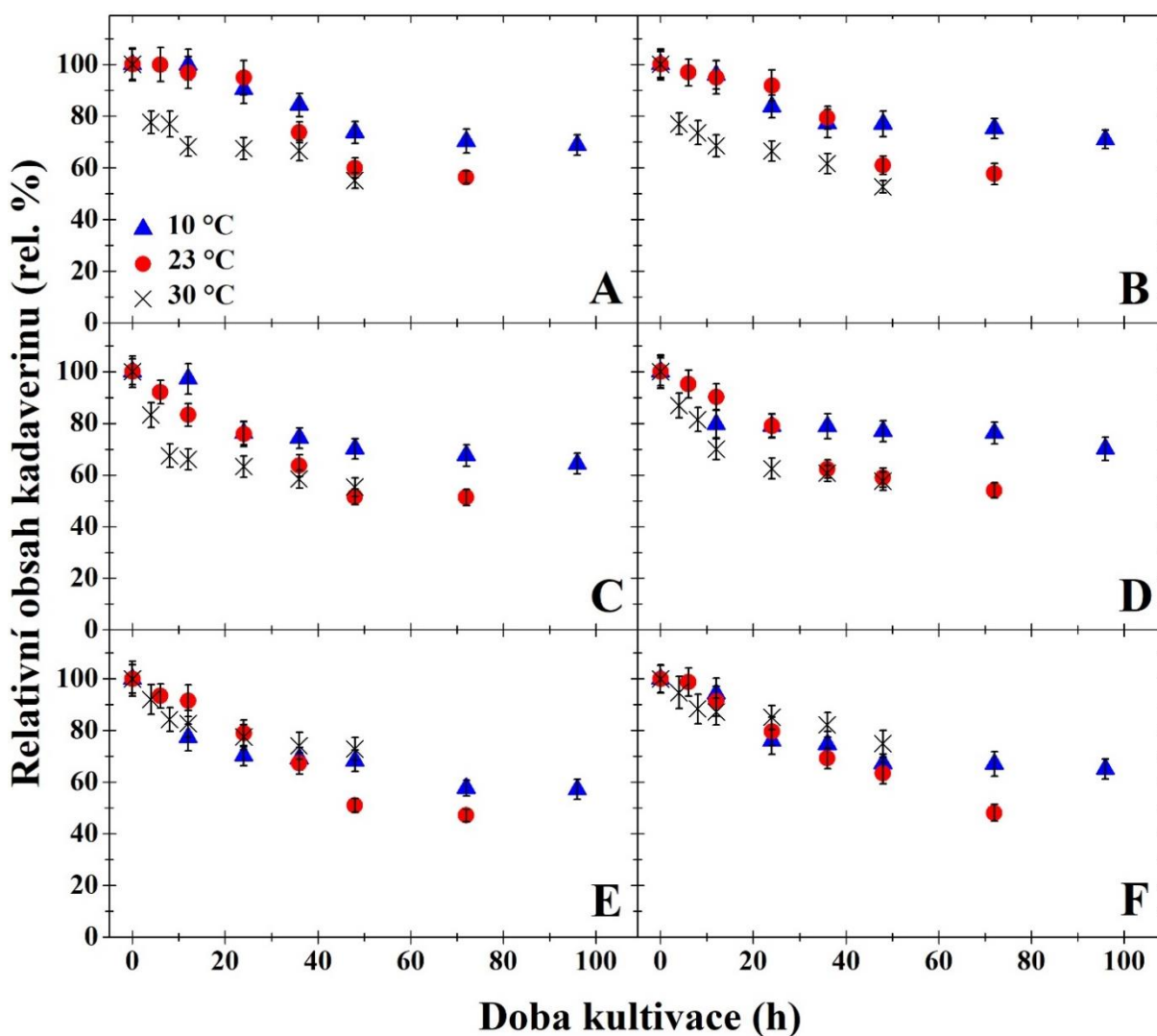
Kadaverin byl nejlépe rozkládán při teplotě 23 °C v prostředí o pH 8 ve variantě média bez přidané soli (Obr. 43). Jeho obsah byl po 72 h inkubace

snížen o 53 %. S rostoucím obsahem soli se však jeho výsledná koncentrace výrazněji neměnila a pohybovala se mezi 48 a 49 %. I v prostředí o pH 7 byla koncentrace KAD po 72 h kultivace nejnižší ve variantě média bez přidané soli, kdy jeho obsah klesl o 51 %. Podobně jako během kultivace v prostředí o pH 5 se s rostoucí koncentrací soli výsledný obsah kadaverinu příliš neměnil a pohyboval se mezi 51 a 54 % (Obr. 44). Podobně jako v předchozích dvou případech se koncentrace KAD s rostoucí koncentrací soli neměnila ani v prostředí o pH 5. Maximální snížení obsahu KAD bylo pozorováno i zde v médiu bez NaCl, kdy jeho množství kleslo o 50 %, v dalších variantách média se ale po 72 h kultivace jeho obsah pohyboval stále v rozmezí 54-57 %. Degradace při kultivační teplotě 23 °C nebyla příliš ovlivňována hodnotami pH ani zvyšujícími se koncentracemi soli. Při kultivační teplotě 30 °C byl nejvyšší úbytek kadaverinu (51 %) pozorován v prostředí o pH 5 v médiu bez NaCl.



Obr. 43: Degradace kadaverinu kmenem *B. pumilus* IB26 v minerálním médiu bez přídavku soli a s 1 % NaCl; A, B – pH 5; C, D – pH 7; E, F – pH 8; A, C, E – 0 % NaCl; B, D, F – 1 % NaCl

K nejnižšímu úbytku kadaverinu v prostředí o pH 5 došlo v médiu s přídavkem 1 % soli. V médiu o pH 7 docházelo k nejvyššímu snížení obsahu KAD opět ve variantě média s obsahem soli 1 %, kde množství KAD kleslo po 48 h na 55 %. Při teplotě 10 °C byl KAD nejméně degradován v prostředí o pH 5 a 3% koncentrací NaCl, kdy bylo rozloženo 29 % jeho celkového obsahu (Obr. 44), nejvíce byla jeho koncentrace snížena v prostředí o pH 8 bez přídavku soli. Ve všech pozorovaných prostředích se množství degradovaného kadaverinu snižovalo spolu s rostoucí koncentrací soli.

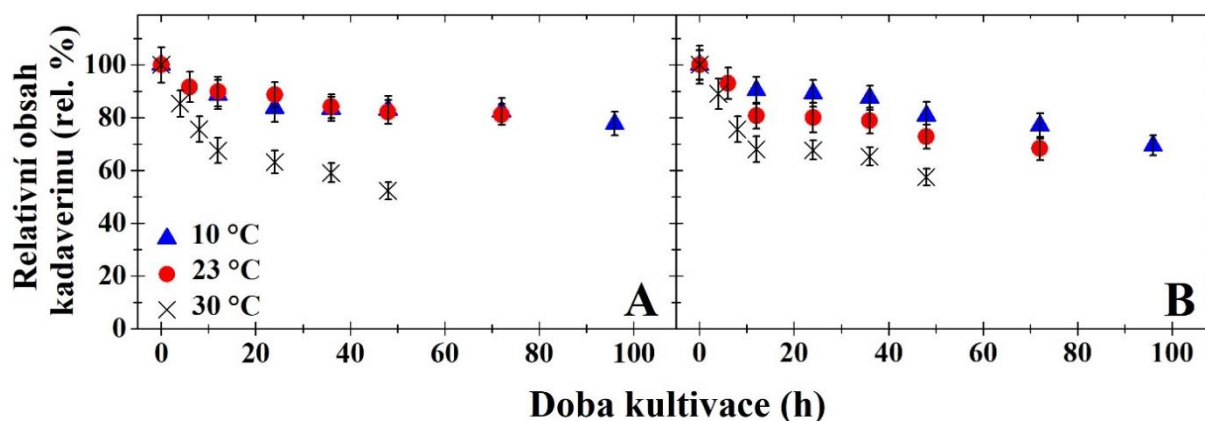


Obr. 44: Degradace kadaverinu kmenem *B. pumilus* IB26 v minerálním médiu s 2 a 3 % NaCl; A, B – pH 5; C, D – pH 7; E, F – pH 8; A, C, E – 2 % NaCl; B, D, F – 3 % NaCl

Množství kadaverinu v NB bez NaCl kleslo při inkubaci při 30 °C na 53 %, což je o 7 % více než ve stejné variantě MM1 (Obr. 45). Úbytek KAD o 18 % byl zaznamenán po 72 h při teplotě 10 °C a o 19 % při kultivační teplotě 23 °C. Ve stejné variantě MM1 byl u obou teplot zaznamenán úbytek kadaverinu minimálně o jednu třetinu. V NB s přídavkem soli byl zaznamenán vyšší pokles

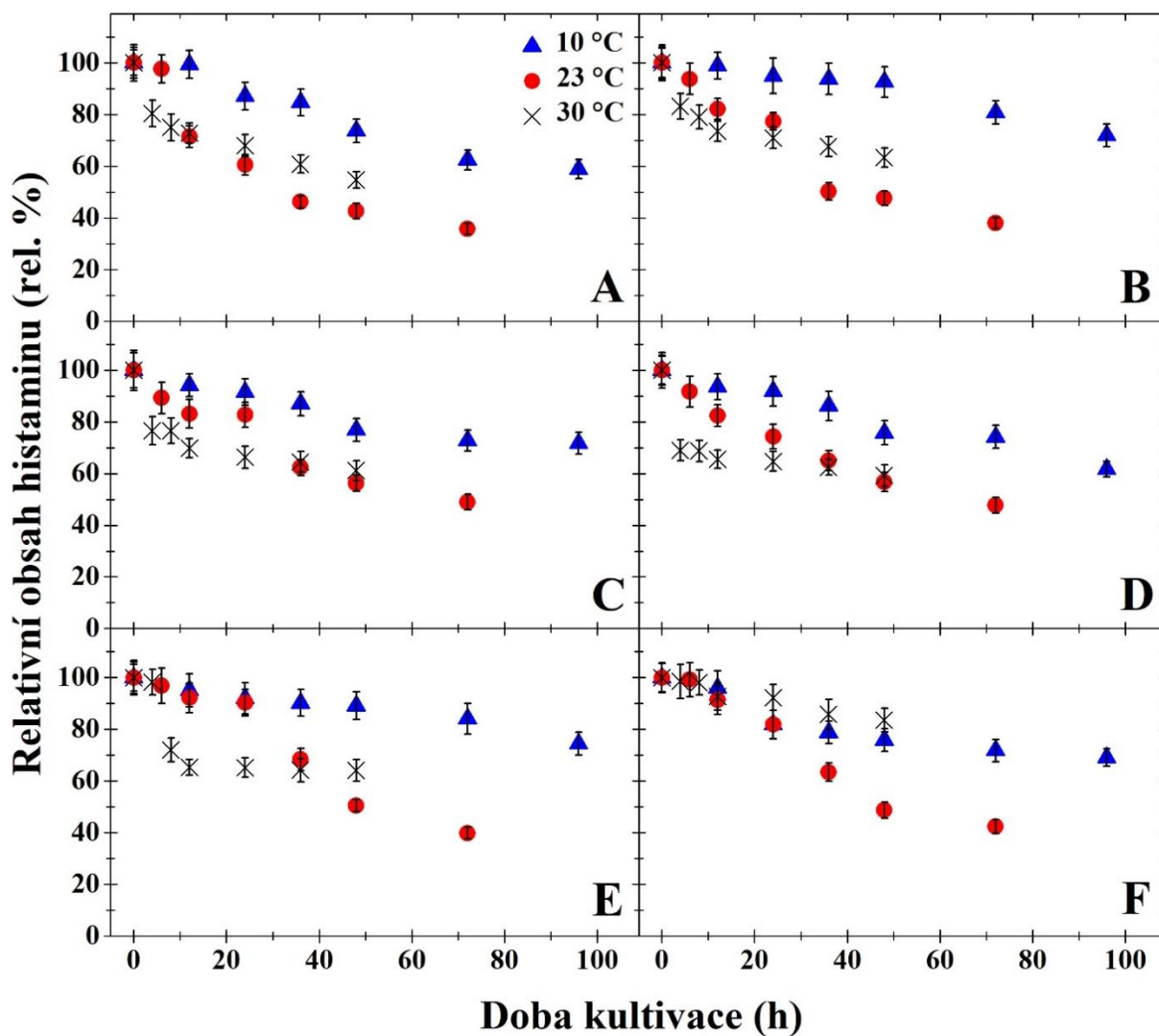


u obou teplot. Při inkubační teplotě 10 °C klesla hladina kadaverinu o 21 %, při 23 °C o 31 %.

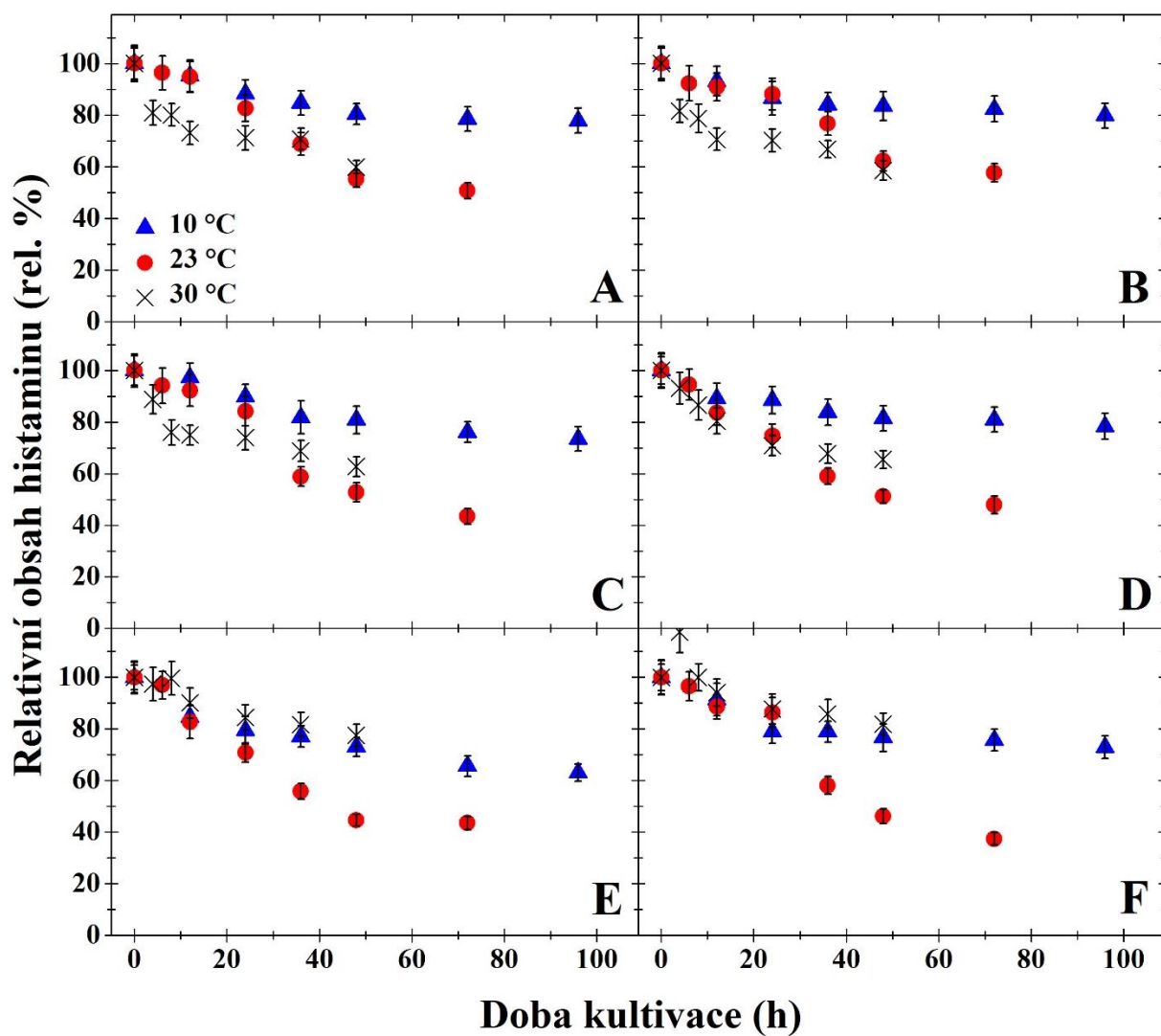


Obr. 45: Degradace kadaverinu kmenem *B. pumilus* IB26 v nutrient broth; A – 0 % NaCl, B – 2 % NaCl

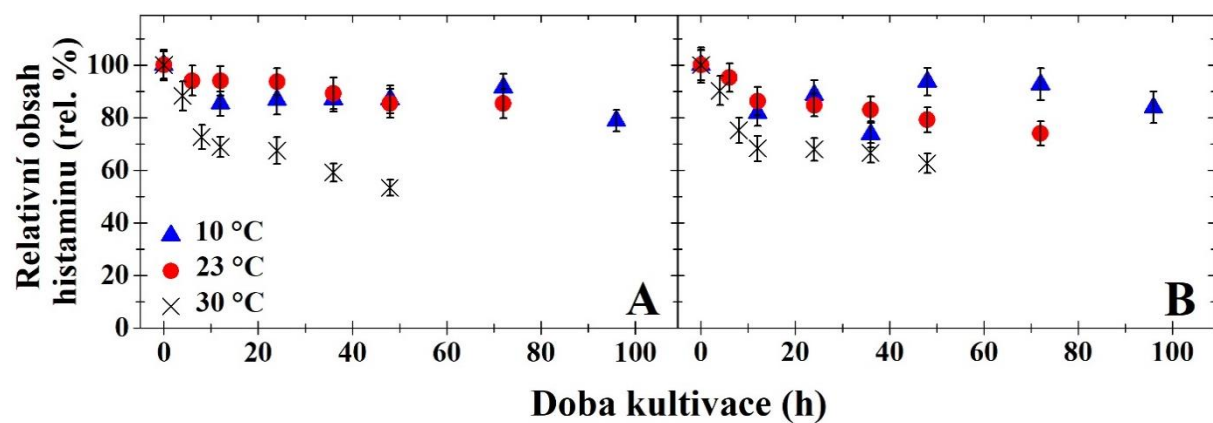
Z testovaných biogenních aminů byl kmen *B. pumilus* IB26 schopen nejlépe rozkládat histamin. Po 72 h kultivace při 23 °C byl jeho nejnižší obsah detekován v prostředí o pH 5 v médiu bez soli (Obr. 46). Jeho koncentrace po 72 h kultivace klesla o 63 %. Čím vyšší koncentrace soli byla v médiu, tím méně byl HIM degradován. V médiu se 3 % NaCl kleslo množství histaminu po 72 h o 42 %. V prostředí o pH 8 v médiu bez soli a v médiu s 3 % NaCl byl shodně zaznamenán 61% pokles koncentrace HIM. V médiu o pH 8 s 1 % soli jeho koncentrace mírně stoupla na 41 %, v médiu s obsahem soli 2 % dále koncentrace HIM mírně rostla až na 45 %, v médiu s nejvyšším testovaným obsahem soli koncentrace histaminu po 72 h opět klesla na 39 % (Obr. 47). V médiu o iniciačním pH 7 byl histamin degradován nejméně u varianty s nejvyšší sledovanou koncentrací soli. Jeho obsah byl při 23 °C po 72 h redukován o 52 %. Nejméně byl HIM degradován během kultivace při 10 °C ve všech variantách testovaných médií. Nejnižší dosažená koncentrace při 10 °C po 96 h inkubace byla detekována v prostředí o pH 5 v médiu bez přidané soli. I v tomto případě se míra degradace snižovala v médiích s vyšším obsahem NaCl. Histamin byl při teplotě 10 °C v prostředí o pH 5 redukován pomaleji. Po 36 h inkubace byla jeho minimální koncentrace 85 %. V prostředí o vyšším pH byl HIM při 10 °C redukován rychleji. V prostředí o pH 8 při teplotě 30 °C byl histamin redukován nejméně ze všech testovaných teplot v médiích s přídavkem soli. V médiu bez soli byla po 48 h jeho nejnižší koncentrace 63 %, v médiích s přídavkem soli se jeho koncentrace po 48 h pohybovala v rozmezí od 79-83 %. Při teplotě 30 °C byl HIM nejlépe degradován v prostředí o iniciačním pH 7 s 1 % soli, kdy jeho koncentrace po 48 h klesla o 41 %.



Obr. 46: Degradace histaminu kmenem *B. pumilus* IB26 v minerálním médiu bez přidavku soli a s 1 % NaCl; A, B – pH 5; C, D – pH 7; E, F – pH 8; A, C, E – 0 % NaCl; B, D, F – 1 % NaCl



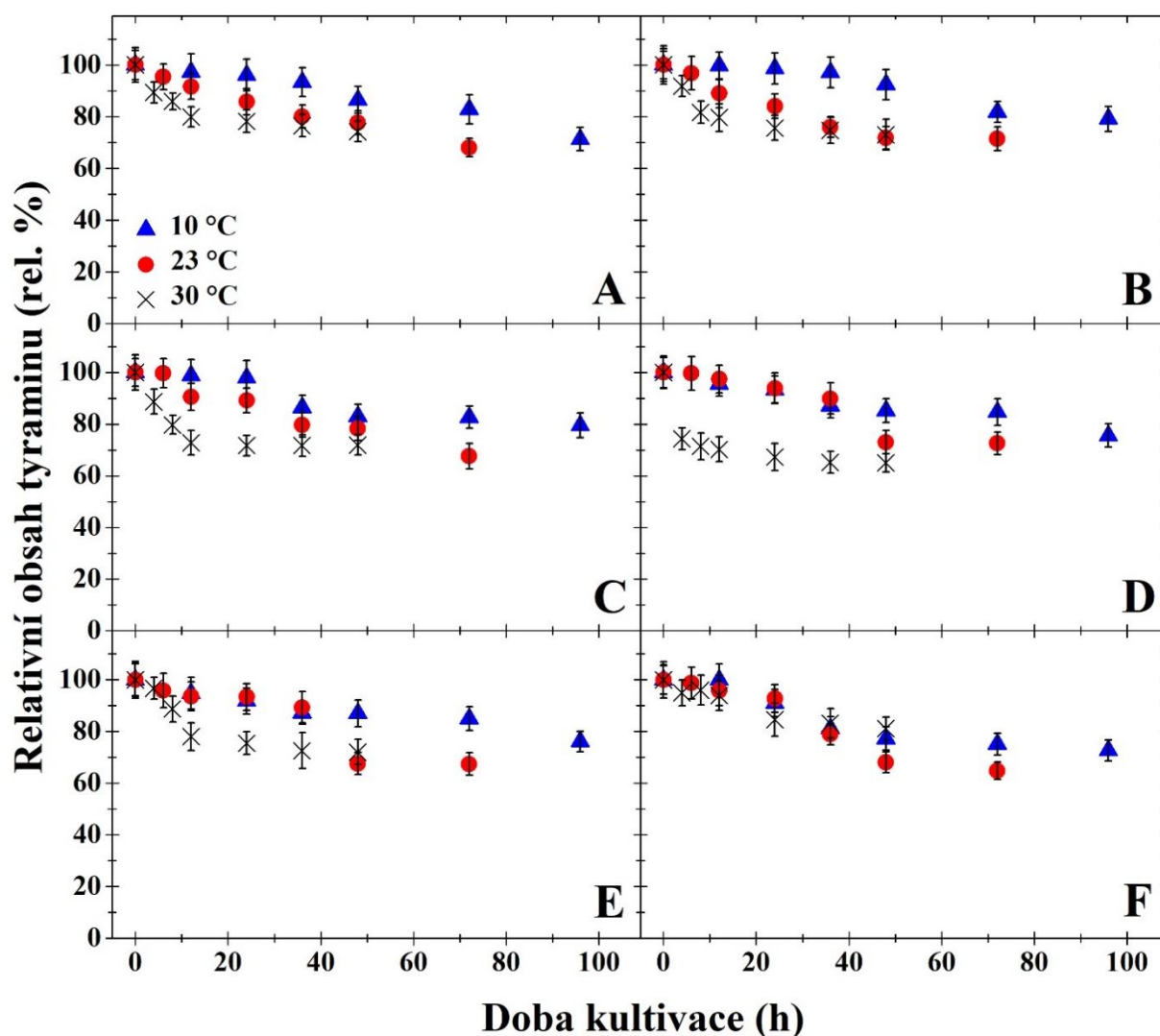
Obr. 47: Degradace histaminu kmenem *B. pumilus* IB26 v minerálním médiu s 2 a 3 % NaCl; A, B – pH 5; C, D – pH 7; E, F – pH 8; A, C, E – 2 % NaCl; B, D, F – 3 % NaCl



Obr. 48: Degradace histaminu kmenem *B. pumilus* IB26 v nutrient broth; A – 0 % NaCl, B – 2 % NaCl

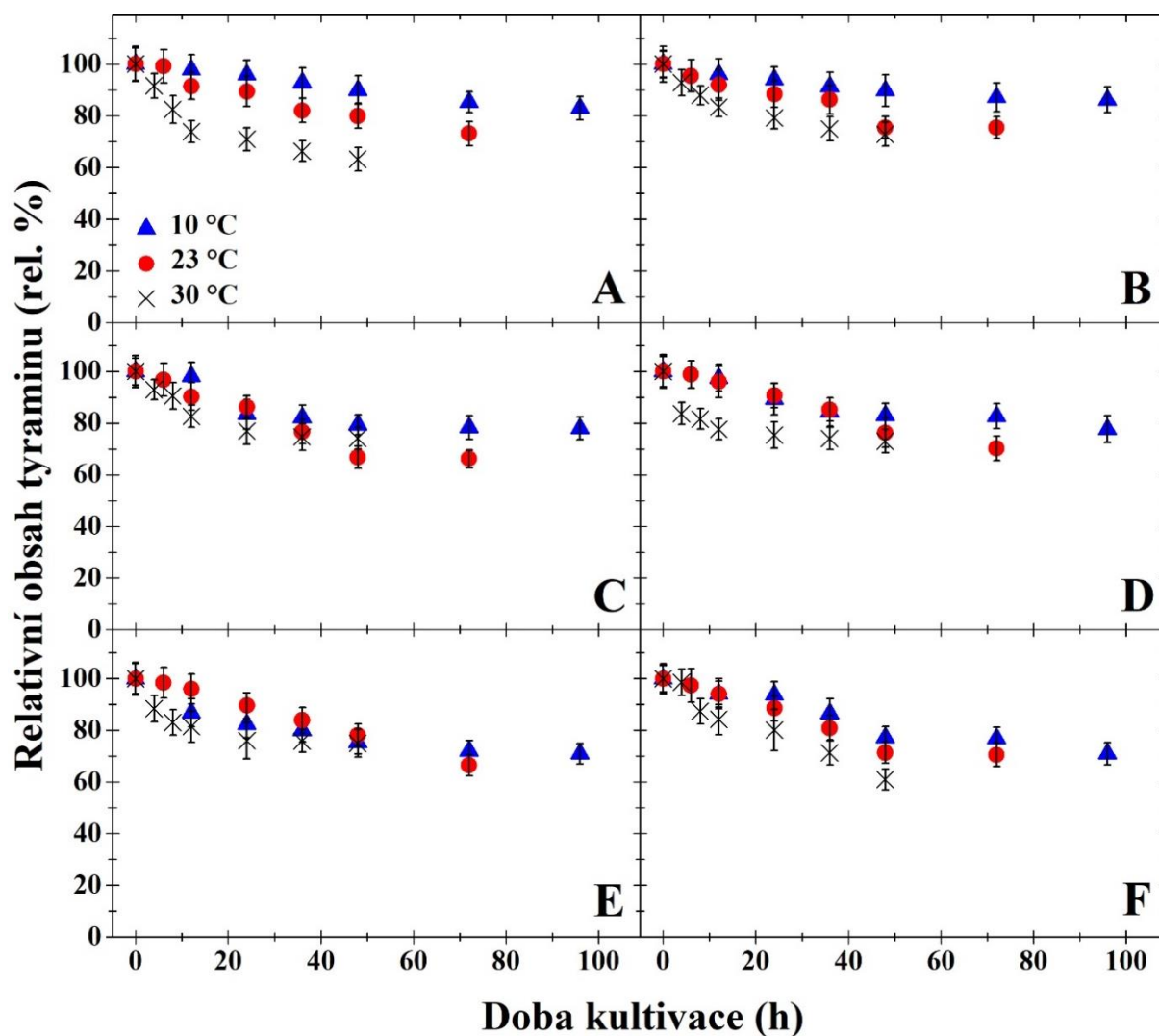
Rozklad histaminu v nutrient broth probíhal nejlépe při teplotě 30 °C (Obr. 48). Jeho obsah byl skokově redukován již během prvních 4 h kultivace, kdy jeho koncentrace klesla v médiu bez přídavku soli o 27 %, tento úbytek byl o 4% vyšší než u stejné varianty minerálního média. Po 48 h kultivace klesl obsah HIM v NB o 56 %, histamin byl tedy redukován o 5 % více než po 48 h v minerálním médiu. Naopak degradace při 23 °C probíhala v nutričně bohatém médiu výrazně pomaleji. Během prvních 12 h inkubace klesl obsah histaminu o 5 %, tedy o 12 % méně než v minerálním médiu. Po 72 h kultivace pozvolna klesal obsah histaminu až na 85 %. Ve stejné variantě MM1 byl po 72 h o 36 % nižší. Rozklad HIM při teplotě 10 °C v NB nevykazoval v porovnání s redukcí histaminu v MM1 tak výrazné rozdíly jako u předchozí teploty. Během prvních 12 h inkubace klesl obsah HIM o 15 %, tedy o 10 % více než v minerálním médiu, po 96 h kultivace kleslo množství histaminu celkově o 20 %, tedy o 7 % méně než ve stejné variantě MM1. V NB s přídavkem 2 % NaCl byl histamin nejvíce redukován opět při teplotě 30 °C. Po 48 h dosahovala jeho koncentrace 62 %, koncentrace HIM ve stejné variantě minerálního média byla o 1 % vyšší. V 10 °C byl HIM degradován o 15 %, tedy méně než ve variantě bez přídavku soli. Při inkubaci ve 23 °C byl histamin redukován o 9 % více než u média bez přídavku NaCl.

Nejnižší redukce tyraminu byla zaznamenána při teplotě 10 °C v prostředích o pH 5 a 7 u všech variant kultivačních médií. V prostředí o pH 5 bez soli byla po 96 h kultivace koncentrace TYM 72 % a postupně rostla s rostoucí koncentrací soli až na hodnotu 87 %. V prostředí o pH 7 byla po 96h kultivaci při 10 °C naměřena nejnižší koncentrace tyraminu v médiu s obsahem 1 % NaCl (Obr. 49), kdy hladina tyraminu klesla o 23 %. V ostatních variantách média se pokles pohyboval mezi 20-21 %. Po 48 h inkubace při 10 °C byl nejvyšší pokles TYM zaznamenán v prostředí o pH 8 v médiu s přídavkem 2 % soli, kdy se jeho koncentrace snížila o 26 % (Obr. 50). Po ukončení kultivace po 96 h se koncentrace TYM ve všech variantách médií pohybovala mezi 72-76 %. V prostředí o iniciačním pH 5 probíhal rozklad tyraminu rychleji při teplotě 23 °C. V čase 72 h bylo degradováno 31 % obsahu TYM v médiu bez přidané soli (Obr. 49). Spolu s rostoucí koncentrací soli se opět mírně zvyšovala zbytková koncentrace TYM na 72 %, 73 % a 76 %.



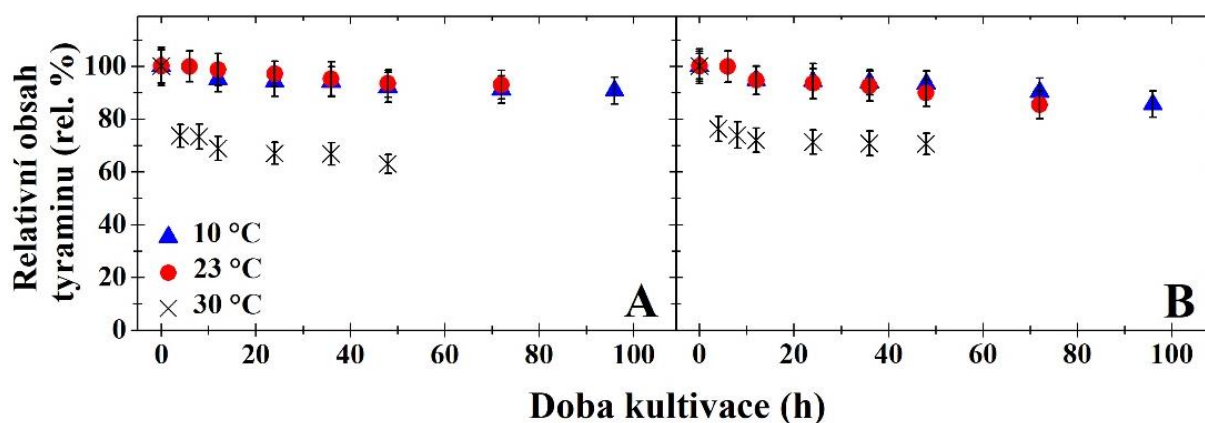
Obr. 49: Degradace tyraminu kmenem *B. pumilus* IB26 v minerálním médiu bez přídavku soli a s 1 % NaCl; A, B – pH 5; C, D – pH 7; E, F – pH 8; A, C, E – 0 % NaCl; B, D, F – 1 % NaCl

V prostředí o pH 5 byl tyramin redukován nejvíce v médiu se 2 % NaCl, kdy se po 72 h kultivace jeho výsledný obsah zastavil na 68 %. U ostatních variant média se výsledné koncentrace pohybovaly v intervalu 69-71 %. Během počátečních 24 h kultivace byl největší pokles obsahu TYM zaznamenán při 30 °C u všech testovaných variant médií. Při této teplotě v prostředí o pH 8 s 3 % NaCl došlo k nejvyššímu zaznamenanému úbytku tyraminu (Obr. 50). Jeho obsah klesl po 48 h kultivace na 60 %. Naopak nejnižší úbytek po 48 h byl pozorován při dané teplotě v prostředí o pH 8 v médiu s 1 % NaCl, kdy jeho obsah klesl o 18 %.



Obr. 50: Degradace tyraminu kmenem *B. pumilus* IB26 v minerálním médiu s 2 a 3 % NaCl; A, B – pH 5; C, D – pH 7; E, F – pH 8; A, C, E – 2 % NaCl; B, D, F – 3 % NaCl

Degradace TYM v NB probíhala i v tomto případě odlišně (Obr. 51). Nejvíce byl TYM degradován při teplotě 30 °C, v čase 48 h bylo jeho zbytkové množství 62 % ve variantě bez soli a 70 % ve variantě s 2 % NaCl, i v tomto případě je úbytek o 9 % vyšší než u stejné varianty MM1 bez přídavku soli, u varianty se 2 % NaCl je pokles o 6 % vyšší. Po 76 h při teplotě 10 °C byl TYM degradován v prostředí bez soli jen o 8 %, při teplotě 23 °C ve stejném prostředí o 6 %. Obdobné výsledky byly pozorovány i při kultivaci v NB s přídavkem soli, kdy obsah TYM klesl při 10 °C po 96 h o 13 %, při 23 °C po 72 h o 14 %.



Obr. 51: Degradace tyraminu kmenem *B. pumilus* IB26 v nutrient broth; A – 0 % NaCl, B – 2 % NaCl

Ze získaných výsledků degradace biogenních aminů kmenem *B. pumilus* IB26 a jejich statistického vyhodnocení vyplývá, že stejně jako během degradace kmenem *B. subtilis* IB23 všechny testované faktory statisticky významně ovlivňují míru degradace tryptaminu v minerálním médiu ( $P \leq 0,05$ ), v médiu nutrient broth je míra degradace i v tomto případě ovlivněna pouze dobou kultivace, ostatní sledované faktory mají sice vliv na bakteriální degradaci, ale nejedná se o statisticky významné rozdíly ( $P > 0,05$ ). Degradace fenylethylaminu není ani v tomto případě významně ovlivňována ( $P > 0,05$ ) sledovanými koncentracemi soli v žádném z testovaných médií. Obdobně jako u předchozího experimentu rozklad putrescinu a kadaverinu v MM1 významně ovlivňují všechny sledované faktory kultivace, na rozklad aminů v NB neměla testovaná koncentrace soli statisticky významný vliv ( $P > 0,05$ ). U histaminu poskytovaly v MM1 statisticky významné rozdíly ( $P \leq 0,05$ ) jen sledované hodnoty pH, teplota a čas, naopak žádné ze sledovaných parametrů rozkladu HIM v nutrient broth degradaci významně neovlivňovaly. Snížení obsahu tyraminu v MM1 ve sledovaných podmínkách významně ovlivňovaly pouze hodnoty pH, čas a teplota ( $P \leq 0,05$ ), degradace v NB byla i v tomto případě ovlivněna pouze dobou kultivace. Srovnání rozkladu všech biogenních aminů v podmínkách *in vitro* ukázalo patrné rozdíly, které však byly statisticky nevýznamné ( $P > 0,05$ ) a míra degradace byla v daných médiích významně ovlivněna jen dobou kultivace při teplotě 30 °C ( $P \leq 0,05$ ).

## 5. SOUHRNNÁ DISKUZE

Biogenní aminy mají negativní efekt na lidské zdraví. Reakce lidského organismu na přítomnost BA v potravinách je individuální, existují však jedinci, kteří jsou na přítomnost těchto látek citlivější a zvýšený příjem jim může způsobovat zdravotní problémy (Emborg a Dalgaard, 2008). Vzhledem k této skutečnosti přetrvávají v potravinářském průmyslu tendence kontrolovat obsah BA v potravinách a nápojích. Bylo navrženo mnoho strategií, které by mohly výsledný obsah biogenních aminů ovlivnit. Většina těchto navržených technik se však soustřeďuje na potlačení růstu mikroorganismů s dekarboxylázovou aktivitou, jako je např. používání aditiv, výběr startérových kultur, zvolené metody balení potravin, či ošetření vysokým tlakem nebo ionizujícím zářením (Mohedano et al., 2015), kromě toho je třeba vzít v úvahu aspekty, jako je produkce antimikrobiálních sloučenin, jako jsou bakteriociny (Ayhan et al., 1999; Bover-Cid et al., 2001b), které rovněž mohou potlačit růst dekarboxyláza pozitivních mikroorganismů. Všechny tyto navržené metody mají možnost zabránit produkci BA, případně zpomalit proces jejich tvorby, ale neexistuje zde možnost eliminace již vytvořených BA. Jako možná alternativa se ukazuje využití mikroorganismů, které jsou schopny využít biogenní aminy, a tím jejich obsah v potravinách redukovat. Již v minulosti se některé studie zabývaly hledáním BA-degradujících mikroorganismů, které disponují enzymy aminoxidázami, jež jsou zodpovědné za rozklad BA na aldehydy, amoniak a peroxid vodíku (Mohedano et al., 2015; Liu et al., 2016; Xia et al., 2018).

Cílem první části této práce bylo vyhledat v potravinových matricích a nápojích takové mikroorganismy, které jsou schopny rozkládat biogenní aminy, tyto izolovat a následně je identifikovat pomocí instrumentálních a molekulárně-biologických metod. Izolace těchto mikroorganismů byla založena na kultivaci v definovaném minerálním médiu s přidávkou biogenních aminů jako jediných zdrojů uhlíku a dusíku. Degradace BA byla prokázána schopností růstu a množení získaných izolátů v daném médiu. Existuje několik prací, které se zabývaly mikrobiálním rozkladem biogenních aminů a jejich výsledky do jisté míry korelují se záchyty mikroorganismů uvedených v této práci (Alvarez a Moreno-Arribas, 2014; Cueva et al., 2012; Zaman et al., 2014). Studium izolace BA-degradujících mikroorganismů se zabývala např. také práce Leuschner et al., 1998, kteří v potravinách objevili kmeny, které byly schopny redukovat histamin a tyramin. Tyto kmeny byly identifikovány jako *Arthrobacter* sp., *Brevibacterium linens*, *Geotrichum candidum*, *Lacticaseibacillus casei*, *Lactiplantibacillus pentosus*, *Lactiplantibacillus plantarum*, *Micrococcus* sp., *Pediococcus acidilactici* a *Rhodococcus* sp. Další kmeny identifikované jako zástupci rodů *Bacillus* a *Staphylococcus* schopné degradovat jeden či více BA se podařilo izolovat Zaman et al. (2010) z rybích omáček. Několik zástupců rodu *Bacillus*, kteří byli schopni výrazně snížit obsahy histaminu a tyraminu, bylo izolováno také z fermentovaných sójových produktů (Eom et al., 2015) a různých variací sýrů



(Saad et al., 2022). Herrero-Fresno et al. (2012) se ve své práci zabývali studiem 17 izolátů identifikovaných jako *Lacticaseibacillus casei* (dříve *Lactobacillus casei*) nalezených v sýru, u kterých byla popsána schopnost degradovat histamin a tyramin *in vitro*. Získané izoláty byly identifikovány sekvenováním části genu pro 16S rRNA. Lee et al. (2015) popsali ve své studii dalších 8 izolátů pocházejících z produktů rybolovu a identifikovaných jako *Agrobacterium radiobacter*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *B. cereus*, *B. licheniformis*, *B. polymyxa*, *B. subtilis* a *Rummeliibacillus stabekisii*, které byly schopny výrazně degradovat histamin. Tittarelli et al. (2019) popsali izolaci a identifikaci bakterií schopných degradovat histamin a tyramin. Všechny získané kmeny byly izolovány ze sýra a identifikovány jako *Bifidobacterium pseudocatenalatum*, *Kocuria varians* *Latilactobacillus curvatus*, *L. sakei*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Pediococcus pentosaceus*, *P. acidilactici*, *P. parvulus* a *Staphylococcus carnosus*.

V rámci dalších experimentů byly z potravin izolovány mikroorganismy schopné růstu v minerálním médiu obsahujícím biogenní aminy. Tyto izoláty byly identifikované jako *Acinetobacter pittii*, *Agrobacterium radiobacter*, *Bacillus altitudinis*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus safensis*, *Bacillus subtilis*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Micrococcus luteus*, *Pseudomonas koreensis*, *Pseudomonas fulva*, *Serratia marcescens*, *Serratia ureylitica* a následně byly podrobeny dalším analýzám. Byla sledována jejich schopnost degradace tryptaminu, fenylethylaminu, putrescinu, kadaverinu, histaminu a tyraminu v čase v podmínkách *in vitro*. V porovnání s ostatními izoláty vykazoval *Bacillus subtilis* IB23 nejvyšší degradační aktivitu. Byla pozorována téměř 100% degradace putrescinu, 97% degradace histaminu a rozklad 92 % kadaverinu. Tryptamin, fenylethylamin a tyramin byly po 72 hodinách degradovány v rozmezí 22-49 %. Kmeny *Acinetobacter pittii* IB5, *Agrobacterium radiobacter* IB102, *Bacillus altitudinis* IB84 a *Bacillus pumilus* IB26 vykazovaly nejvyšší degradační kapacitu pro tyramin, který degradovaly v rozmezí od 36 do 50 %, všechny ostatní sledované kmeny byly schopny nejvíce degradovat putrescin. Studium kinetiky degradace BA se zabývaly i mnohé další studie. V práci Lee et al. (2015) je popisována degradace histaminu u *B. subtilis*, kdy bylo během 24hodinové kultivace v bujónu degradováno 74 % jeho obsahu, u *Paenibacillus polymyxa* (dříve *Bacillus polymyxa*) bylo během této doby redukováno až 100 % histaminu. Degradace histaminu o 27-60 %, putrescinu o 7-30 % a kadaverinu o 22-29 % během 24 hodin v podmínkách *in vitro* byla pozorována u *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus subtilis*, *Priestia megaterium* (dříve *Bacillus megaterium*) a *Bacillus licheniformis* (Zaman et al., 2014). Mah a Hwang (2009) ve své práci pozorovali schopnost degradovat histamin u dvou kmenů, *Bacillus coagulans* a *Styphylococcus xylosus*. Během 24 hodin v podmínkách *in vitro* byly tyto kmeny schopny snížit jeho obsah o 35-38 %. Použití mikroorganismů s aminoxidázovou aktivitou a jejich aplikace do potravin při procesu jejich výroby má ovšem také svá omezení, a to zejména tehdy, pokud podmínky výrobního či skladovacího procesu nejsou souladu s podmínkami pro přežití těchto

mikroorganismů, respektive s optimálními podmínkami pro katalytickou aktivitu degradujících enzymů, např. příliš vysoké teploty či koncentrace soli, čímž může být zabráněno degradaci přítomných BA (Tapingkae et al., 2010). Pro zmapování podmínek ideálních pro růst těchto mikroorganismů, a tedy jejich následný rozklad biogenních aminů, je nutné provést sérii experimentů, které by popsaly chování aminoxidáza pozitivních mikroorganismů pod vlivem kombinace různých vnějších faktorů *in vitro*. Teplota, pH a obsah soli jsou klíčové environmentální prvky, které ovlivňují mikrobiální aktivitu v potravinách. Tyto faktory jsou zodpovědné za metabolismus živé buňky, která produkuje bakteriální dekarboxylázy, a také ovlivňují aktivitu tohoto enzymu (Saad et al., 2022).

Po vyhodnocení výsledků pozorování, kdy byla sledována míra degradační aktivity u jednotlivých kmenů, byl *B. subtilis* IB23 vybrán pro sledování kinetiky degradace pěti vybraných biogenních aminů v závislosti na změně vnějších podmínek. Byl sledován vliv kombinace těchto faktorů, konkrétně to byla hodnota pH kultivačního média, teplota a aerobní/anaerobní způsob kultivace. Teplota prostředí významně ovlivňuje tvorbu BA u dekarboxyláza-pozitivních mikroorganismů, kdy spolu se snižující se teplotou se snižuje i množství produkovaných BA (Naila et al., 2010). V rámci tohoto experimentu byla porovnávána míra degradace v prostředí 3 různých teplot (8 °C, 23 °C, 30 °C), které představují teplotu skladování potravin, běžnou pokojovou teplotu, respektive optimální teplotu pro růst testovaných mikroorganismů. S nižší teplotou byla předpokládána i nižší degradační aktivita s ohledem na růstové optimum pro *B. subtilis* (30-37 °C). Tato hypotéza se však nepotvrdila a nižší kultivační teplota neměla na výsledný obsah BA výraznější vliv. Naopak byl v některých případech zaznamenán nejvyšší úbytek BA právě během inkubace při teplotě 10 °C. Např. v případě degradace fenylethylaminu v prostředí o pH 5 byl jeho celkový obsah po 48 h kultivace při 10 °C redukován o 76 %, při 30 °C však jen o 69 %. Spolu s rostoucí teplotou však rostla rychlost degradace BA, kdy během kultivace při 30 °C často docházelo ke skokovému snížení koncentrace aminů již během prvních 12 h kultivace a jejich množství kleslo až na čtvrtinu původního obsahu, při nižších inkubačních teplotách docházelo k podobným úbytkům až po 24 h kultivace. Závislost aktivity tyraminoxidázy na okolní teplotě popsali Leuschner et al. (1998), kteří sledovali míru degradace v prostředí v širokém rozsahu teplot. Snížení aktivity této aminoxidázy bylo pozorováno při teplotě 5 °C, naopak při teplotě 37-40 °C byl tyramin degradován nejvíce. Při teplotách vyšších než 60 °C docházelo k denaturaci tyraminoxidázy a nedocházelo tak k degradaci tohoto biogenního aminu. Zeng et al. (2021) zkoumali aktivitu diaminoxidázy v závislosti na teplotě inkubace. Jejich výsledky ukázaly, že DAO izolovaná z *Arthrobacter spheroides* v nejvyšší míře degraduje histamin a putrescin. Jejich pozorování naznačují, že termostabilita této diaminoxidázy je velmi malá a nejvyšší teplota, při které je ještě schopna rozkládat histamin a putrescin, je 37 °C. Během inkubace při teplotě 35 °C

po dobu 50 minut klesá její aktivita až o 50 %. Nejvyšší degradační aktivita byla zaznamenána při teplotě do 30 °C. Dapkevicius et al. (2000) studovali degradaci BA bakteriemi mléčného kvašení při čtyřech různých teplotách (37, 30, 22 a 15 °C). Testované BMK izolované z rybích past byly schopny rozkládat přítomné BA za všech sledovaných teplot, kdy opět spolu s klesající teplotou klesala i úroveň degradace v prostředí o pH 7, v prostředí o pH 4,5 ale nebyla zaznamenána téměř žádná degradační aktivita. Výsledky naší práce ukázaly, že pokles množství testovaných biogenních aminů byl téměř stejný jak při aerobní, tak při anaerobní kultivaci. Z dalších měření vyplývá, že testované kombinace jednotlivých faktorů nijak výrazně neovlivnily schopnost kmene *B. subtilis* IB23 degradovat vybrané biogenní aminy. Ve všech variantách pH minerálního média, za všech teplot a u obou způsobů kultivace došlo ke snížení obsahu BA o 65-87 %. Přesto, že testování vlivu jednotlivých faktorů na míru degradace neukázalo příliš velké rozdíly ve výsledných koncentracích BA, můžeme obecně předpokládat, že se jedná o zajímavé výsledky, které naznačují využití v relativně širokém spektru vnějších podmínek, a to i u těch potravin, které se vyznačují náročnějšími výrobními procesy. V případech, kdy selhávají metody prevence vzniku těchto nežádoucích látek, naznačují získané výsledky možnost využití izolovaných degradérů biogenních aminů ke snížení jejich obsahu v potravinách. V řadě dalších publikovaných studií (Zaman et al., 2014; Kim et al., 2012; Alvarez a Moreno-Arribas, 2014; Eom et al., 2015; Lee et al., 2015) byly zaznamenány pozitivní výsledky degradace biogenních aminů u *B. subtilis*.

Při porovnání degradace BA kmeny *B. subtilis* IB23 a *B. pumilus* IB26 byla pozorována vyšší degradační aktivita u prvního zmíněného kmene. Během inkubace při 30 °C v prostředí o pH 7 v médiu bez přidané soli degradoval po 48 h *B. subtilis* IB23 tryptamin o 50 %, fenylethylamin o 57 %, putrescin o 45 %, kadaverin o 47 %, histamin o 51 % a tyramin o 62 %, *B. pumilus* IB 26 degradoval ve stejném prostředí tryptamin o 47 %, fenylethylamin o 35 %, putrescin o 42 %, kadaverin o 41 %, histamin o 39 % a tyramin o 25 %, snížil tak koncentraci testovaných BA minimálně o čtvrtinu. Obdobně jako u předchozích pozorování měla na míru degradace největší vliv teplota. Obecně lze konstatovat, že biogenní aminy byly nejlépe degradovány při teplotě 30 °C, což je nejen teplotní optimum pro růst obou vybraných kmenů, ale také ideální teplota pro působení bakteriálních aminoxidáz (Cheng et al., 2020), se zvyšující se teplotou nad 45 °C dochází k denaturaci těchto enzymů, a tedy úplné inhibici degradace BA (Zaman et al., 2014). Se snižující se teplotou klesala degradační aktivita obou sledovaných kmenů. *B. pumilus* IB26 např. v prostředí o pH 7 v médiu bez přidané soli degradoval obsah putrescinu při 30 °C po 24 h o 41 %, při teplotě 23 °C o 24 % a při teplotě 10 °C jen o 2-3 %. Spolu se snižováním teploty se snižuje i rychlost metabolismu a růstu bakterií, proto i k redukci biogenních aminů dochází pomaleji. Při nejnižší sledované teplotě byla tedy kultivační doba prodloužena na 96 h. Po ukončení kultivace *B. pumilus* IB26 klesly obsahy všech sledovaných

BA ve všech prostředích minimálně o čtvrtinu. Podobné výsledky jsou veskrze pozitivní např. pro výrobu dlouho zrajícího sýra, který je často zdrojem vysokého množství biogenních aminů. Zrací teploty jsou závislé na individuálním druhu a vlastnostech sýra, ale obvykle se pohybují právě kolem 10 °C (Joosten a Nuñez, 1996). Přídavek BA-degradující kultury schopné přežít výrobní proces a zrání při nízkých teplotách by mohl výsledný obsah BA významně snížit. Schopnost degradace HIM a TYM v sýru testovali Leuschner a Hammes (1998). Kmen *Brevibacterium linens* používaný jako mazová kultura u sýrů zrajících s mazem na povrchu byl schopen během měsíčního zrání sýru s přidanými BA redukovat obsah histaminu o 55 % a tyraminu o 70 %. Námi sledované rozmezí pH míru degradace BA kmeny rodu *Bacillus* ovlivňovalo, ale ze získaných výsledků nelze přesně určit, zda nějaká ze sledovaných hodnot výrazně zesilovala či inhibovala degradaci. Pro příklad lze uvést degradaci histaminu kmenem *B. pumilus* IB26, který v médiu bez přídavku soli při inkubační teplotě 30 °C snížil po 48 h jeho koncentraci v prostředí o pH 5 o 43 %, v prostředí o pH 7 o 45 % a v prostředí o pH 8 o 27 %, naproti tomu hladina putrescinu byla ve stejných podmínkách v prostředí o pH 5 snížena o 44 %, v prostředí o pH 7 o 37 % a v prostředí o pH 8 o 26 %. Cheng et al. (2020) izolovali z několika fermentovaných potravin kvasinky, které byly pomocí sekvenace části genu pro 16S rRNA identifikovány jako *Wickerhamomyces anomalus* a *Millerozyma farinosa*, u nichž sledovali aktivitu aminoxidáz v širokém rozpětí pH (3-10). Stejně jako u většiny bakteriálních aminoxidáz byla prokázána závislost míry degradace na hodnotách pH. Studie uvádí, že i pro tyto aminoxidázy je optimální pH 7, ale jejich aktivita se v rozmezí pH 5-8 příliš nelišila (Dapkevicius et al., 2010). Ke snížení degradace docházelo až v prostředích o pH < 5 a pH > 9 (Cheng et al., 2020). V podobném rozmezí testovali aktivitu aminooxidáz ve své práci i Ying et al., 2016, kdy sledovali míru degradace BA kmenem *Halomonas shantousis* SWA25. Degradace BA probíhala nejintenzivněji v prostředí o pH 7, které je optimem pro funkci bakteriálních aminooxidáz, ale vysokou degradační aktivitu si udržela i v rozmezí pH 5-8. V prostředí o pH 2 a pH 10 neprobíhala žádná zjevná degradační aktivita. Dalším ze sledovaných faktorů byla přítomnost NaCl. V posledních letech mnoho studií ukázalo, že snížení příjmu sodíku je pro zdraví velmi důležité a nezbytné (Wolkers-Rooijackers et al., 2013; Bistola et al., 2020; Celik a Bektas, 2020; Jin et al., 2020). Nadměrný příjem soli je považován za škodlivý pro lidské zdraví, způsobuje kardiovaskulární a cerebrovaskulární onemocnění (Yang et al., 2021). Mnoho zemí proto navrhlo plány na snížení denního příjmu soli (Cappuccio et al., 2018). U některých potravin, pokud je koncentrace soli příliš nízká, je inhibiční účinek soli na některé nežádoucí mikroorganismy oslabený (Jia et al., 2020) a vede často k nepříjemným změnám organoleptických vlastností, jako je třeba kyselost a hořkost (Xie et al., 2022). Pokud nedojde k inhibici růstu mikrobioty, která produkuje BA, nastává opět problém s jejich akumulací (Chun et al., 2020; Li et al., 2020). V námi testovaném rozmezí (0-3 % w/v) byly *B. subtilis* IB23 i *B. pumilus* IB26 schopny

degradovat všechny sledované biogenní aminy. S rostoucí koncentrací soli se ale míra degradace mírně snižovala. Na základě výsledků publikovaných ve studiích Cheng et al. (2020) a Xie et al. (2022), kteří testovali schopnost degradace BA izoláty získaných z potravin, lze předpokládat, že s dalším zvyšováním koncentrace NaCl by se dále snižovala i míra degradace BA až do úplného zastavení růstu dané mikrobioty. Lee et al. (2015) ve své studii popsali obdobný experiment, kdy sledovali vliv různých hodnot pH, různých teplot a koncentrací solí na degradaci histaminu druhem *B. polymyxa*. Z výsledků jejich studie vyplývá, že nejvyšší míru degradace vykazoval tento druh rodu *Bacillus* během kultivace při 30 °C v prostředí o pH 7. Nicméně ostatní sledované hodnoty pH (pH 5-9) vykazovaly v průměru jen o 15 % menší míru degradace. Testovaný kmen byl schopen degradovat HIM v bujónu v poměrně širokém rozmezí koncentrace soli (0,5-5 %), kdy bylo v přítomnosti 0,5 % NaCl degradováno téměř 100 % přítomného HIM, v přítomnosti 5 % NaCl pak 97 %, zatímco v médiu s 10 % soli bylo degradováno jen 8,5 % celkového množství HIM. Žádný histamin nebyl *B. polymyxa* degradován v kultivační půdě při 15% a 20% koncentraci NaCl (Lee et al., 2015). Saad et al. (2022) testovali efekt přídatku kultury *B. polymyxa* D05-1 na eliminaci histaminu a tyraminu v sýru Tallaga, který obsahoval vysokou koncentraci těchto aminů. Po přidání kmene *B. polymyxa* D05-1 během zpracování sýra došlo po 12 h kultivace při 5 °C v prostředí s 2,5 % NaCl (w/v) ke snížení koncentrace histaminu o 67 %, po 24 h kultivace o 83 %, méně byl degradován tyramin, jehož koncentrace klesla po 12 h o 58 %, po 24 h o 72 %. Tato studie ukázala potenciál rodu *Bacillus* efektivně snižovat množství HIM a TYM i v reálných potravinových matricích, kde je zdroj dusíku i uhlíku pro mikroorganismy snadněji přístupný. Mah a Hwang (2009) popsali využití *Staphylococcus xylosus* při snížení koncentrace biogenních aminů u solených fermentovaných ančoviček. *S. xylosus* byl schopen při 25 °C v prostředí s 15 % NaCl v průběhu 10 týdnů degradovat 16 % BA. V literatuře je popsáno jen velmi málo druhů, které by byly schopny degradovat BA při vysokých koncentracích NaCl (> 10 % w/v) (Cheng et al., 2020). Jedním z nich je např. *Brevibacillus* sp. SK35, který byl schopen efektivně degradovat histamin, putrescin, kadaverin, tyramin a tryptamin při teplotě 35 °C v prostředí o pH 8 s 10% koncentrací NaCl. Se zvyšující se koncentrací soli nad 10 % (w/v) se rychlost degradace postupně snižovala (Sinsuwan et al., 2010). Obdobných výsledků bylo dosaženo i v práci Cheng et al. (2020), kdy testované kmeny *Wickerhamomyces anomalus* a *Millerozyma farinosa* vykazovaly pokles degradační aktivity spolu s růstem koncentrace NaCl nad 10 %. Když koncentrace soli dosáhla 30 % (w/v), dané kmeny v podstatě ztratily degradační schopnost pro KAD, PUT, HIM, TYM (<5 %), což může být způsobeno vysokou koncentrací soli inhibující růst daného kmene nebo koncentrace soli inhibující aktivitu aminoxidázy kmene, čímž se snižuje rychlost degradace (Kim et al., 2017). V práci Tapinkgae et al. (2010) byly popsány druhy extrémně halofilních archeí, která jsou schopna BA rozkládat při velmi vysokých teplotách

i koncentracích soli. Tyto organizmy byly izolovány ze solených fermentovaných rybích produktů. Studie popsala degradační aktivitu *Natrinema gari*, kdy byla nejvyšší degradační kapacita zaznamenána při teplotě 40-55 °C v prostředí o pH 6-8,5 a koncentrací soli 15-20 %. Ying et al. (2016) testovali schopnost degradace osmi BA v médiu s obsahem NaCl halotolerantním mikroorganismem *Halomonas santhousis* SWA25. Přestože byl sledovaný kmen schopen redukovat množství všech testovaných BA v prostředí s 20 % NaCl o 10-20 %, nejvyšší degradační aktivity dosahoval v médiu s přídatkem 0-3 % NaCl (w/v), přičemž optimální koncentrace NaCl pro její růst je 3 % NaCl (w/v). Tato studie spolu se studiemi Zaman et al. (2010) a Tapingkae et al. (2010) naznačují, že k nejvyšší míře degradace BA různými mikroorganismy dochází v prostředí s optimální koncentrací NaCl pro jejich růst a různou citlivostí aminooxidáz. Tyto výsledky představují důležitý přínos pro potravinářský průmysl, jelikož takto vysoké koncentrace soli inhibují růst velké části mikroorganismů a teoreticky by se obtížně hledala náhrada, která je schopna v těchto koncentracích nejen růst, ale i redukovat množství přítomných BA.

Stejně jako ve studii Sun et al. (2023) bylo předpokládáno, že rozsah degradační aktivity bude mnohem patrnější v minerálním médiu, kde jedinými zdroji uhlíku a dusíku byly dodané biogenní aminy. Pokud byly sledované kmeny schopny růstu, musely nutně využít minimálně jeden z obsažených BA. Nutrient broth je ale nutričně bohatší médium, které ve svém složení obsahuje mj. glukózu, kvasničný extrakt a pepton, a proto se svou skladbou více podobá vzorku reálné potraviny. Jelikož jsou v médiu NB uhlík a dusík snáze dostupné z jiných zdrojů, bylo sledováno, v jaké míře degradace probíhá. Z toho důvodu také probíhalo sledování degradace *B. subtilis* IB23 a *B. pumilus* IB26 v menším rozsahu. Zajímavým zjištěním bylo, že i v nutričně bohatém médiu degradace BA probíhá při 30 °C poměrně efektivně. *B. subtilis* IB23 dokázal snížit obsah všech BA, během 48 h při kultivační 30 °C v médiu bez přídatku soli došlo k úbytku všech průměrně o 37 %. V případě média s 2 % soli bylo snížení koncentrace v daných podmínkách obdobné. *B. pumilus* IB26 vykazoval ve stejných podmínkách vyšší degradační schopnost a obsah všech testovaných BA snížil během 48 h o 45 %. I v tomto případě bylo v médiu s přídatkem soli dosaženo obdobných výsledků jako v médiu, které sůl neobsahovalo. Srovnání výsledků degradace mezi jednotlivými kmeny ukázalo, že *B. subtilis* IB23 degraduje v MM1 všechny testované biogenní aminy lépe, než kmen *B. pumilus* IB26, v médiu NB jsme došli k výsledkům opačným. K zajímavým výsledkům dospěli také Martuscelli et al., 2000 a Zaman et al., 2011, kdy izolovali stafylokoky (*S. xylosum*, *S. carnosus*), které byly schopny deaminovat tyramin a histamin *in vitro*, ale v reálných potravinových systémech byla jejich aktivita výrazně omezena přítomností jiných zdrojů dusíku, které byly pro tyto bakterie snadněji dostupné, např. v případě tepelně neopracovaných fermentovaných masných výrobků (Gardini et al., 2002). V kontrastu k těmto výsledkům byla zajímavější data získána v reálné potravinové matici chudé na dusík, jako je víno, ve kterém

probíhala deaminace BA kmeny *Lacticaseibacillus casei*, *Lactiplantibacillus plantarum* a *Pediococcus* spp. výrazně lépe (García-Ruiz et al., 2011; Capozzi et al., 2012).

Využití námi izolovaných a testovaných sporulujících bakterií v potravinářském průmyslu ovšem vyžaduje další studie, které by se zabývaly degradací BA přímo v potravinové matrici a zároveň by se soustředily na udržení jejich nezávadnosti a organoleptických vlastností (Kim et al., 2022). Podobně jako u *Weizmania coagulans* (dříve *Bacillus coagulans*) a *Geobacillus stearothermophilus*, které se vyznačují silným enzymatickým aparátem, je totiž přítomnost sporotvorného *B. subtilis* v potravinách nežádoucí (Harirchi et al., 2022). V kontrastu s tímto faktem je také důležité zmínit, že některé kmeny *B. subtilis* jsou řazeny mezi probiotika, která naopak pozitivně ovlivňují lidské zdraví (Lorencová et al., 2012). Studie Gopikrishna et al. (2021) popsala vliv *Bacillus subtilis* na lidské zdraví. Zmiňuje zejména jeho pozitivní úlohu v prevenci vysokého tlaku, ochraně před aterosklerózou, ochraně před enteropatogeny ve střevě, inhibuje růst některých rakovinných buněk. *B. subtilis* i *B. pumilus* je možné využít jako startérové kultury pro výrobu některých fermentovaných potravin (Ouoba et al., 2004). Tyto startérové kultury mohou inhibovat růst patogenních mikroorganismů svou schopností produkovat bioaktivní sloučeniny a také propůjčit fermentovaným potravinám požadované organoleptické vlastnosti (Gopikrishna et al., 2021).

## 6. ZÁVĚR

Jednou z nejslibnějších možností přímého odstranění biogenních aminů z potravin je využití mikroorganismů se silnou aminoxidázovou aktivitou a jejich zařazení mezi potenciální startérové kultury. Pro tento proces je nejdůležitější vyhledat a izolovat mikroorganismy, které tuto schopnost mají, a následně definovat ideální podmínky a parametry pro jejich růst. Pro izolaci a identifikaci kmenů schopných degradovat biogenní aminy byly definovány hlavní cíle disertační práce, které byly zpracovávány ve 4 dílčích experimentech. Experimenty se zabývaly izolací mikroorganismů schopných degradovat biogenní aminy z potravin a jejich následnou identifikací pomocí spektrometrických a molekulárně-biologických metod. Kinetika degradace byla sledována pomocí kapalinové chromatografie.

Podle předpokladů bylo potvrzeno, že záchyt degradérů izolovaných z potravin nebude příliš vysoký. V průběhu počátečního skríningu 895 zejména mléčných a masných výrobků bylo izolováno 114 mikroorganismů schopných degradovat alespoň jeden z následujících aminů – tryptamin, fenylethylamin, putrescin, kadaverin, histamin a tyramin. Všech 114 izolátů bylo metodou MALDI-TOF MS identifikováno a na základě identifikace bylo získáno 22 různých druhů mikroorganismů. Třináct z nich bylo následně vybráno pro další skrínig a jejich identifikace byla ověřena pomocí sekvenace. Takto byly identifikovány druhy *Acinetobacter pittii*, *Agrobacterium radiobacter*, *Bacillus altitudinis*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus safensis*, *Bacillus subtilis*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Micrococcus luteus*, *Pseudomonas koreensis*, *Pseudomonas fulva*, *Serratia marcescens*, *Serratia ureylitica*.

Bylo prokázáno, že všech 13 identifikovaných kmenů je schopno v podmínkách *in vitro* při 30 °C degradovat všechny z testovaných aminů o 8-100 %. Nejvíce byla snížena koncentrace tyraminu a putrescinu, které po 72 hodinách kultivace při 30 °C klesly v rozmezí 36-100 %. Nejvyšší degradační kapacita byla zaznamenána u kmene *B. subtilis* IB23, který degradoval putrescin, kadaverin a histamin o více než 92 %, u zbylých aminů dokázal snížit jejich koncentraci o 22-48 %.

U kmene *B. subtilis* IB23, který vykazoval nejvyšší aminoxidázovou aktivitu, byla v čase sledována kinetika degradace za definovaných podmínek *in vitro*. V této fázi byl studován vliv teploty, různých hodnot pH a způsob kultivace na míru degradace biogenních aminů. Bylo prokázáno, že žádný ze sledovaných parametrů ani jejich vzájemné kombinace výrazně neovlivnily degradační aktivitu *B. subtilis* IB23. Ve všech případech byly po 48 hodinách kultivace hodnoty biogenních aminů sníženy o 52-83 %. I když nejvyšší míru kultivace vykazoval *B. subtilis* IB23 při kultivační teplotě 30 °C, s nižšími teplotami se výsledný obsah biogenních aminů výrazněji nelišil.

V další fázi práce byla u *Bacillus subtilis* IB23 a *Bacillus pumilus* IB26 srovnávána kinetika degradace biogenních aminů v minerálním médiu a v médiu



nutrient broth. Sledovanými parametry byly teplota, hodnoty pH a koncentrace soli. Ze všech sledovaných faktorů byla míra degradace nejvíce ovlivňována kultivační teplotou. Dle předpokladů oba kmeny rozkládaly BA nejlépe při teplotě 30 °C, což je nejen růstové optimum vybraných druhů, ale také ideální teplota pro činnost bakteriálních aminoxidáz. Se snižující se teplotou míra degradace klesala. Hodnoty pH iniciačního média měly na degradaci sice vliv ( $P \leq 0,05$ ), na základě získaných výsledků ale nelze jednoznačně určit, zda nějaká z testovaných hodnot pH rozklad BA výrazněji inhibuje. V rozmezí 0-3 % w/v NaCl byly *B. subtilis* IB23 i *B. pumilus* IB26 schopny degradovat všechny sledované biogenní aminy, vliv koncentrací NaCl byl na oba dva kmeny stejný. S rostoucí koncentrací se ale míra degradace mírně snižovala. Bylo také prokázáno, že v minerálním médiu degraduje kmen *B. subtilis* IB23 všechny testované BA více než kmen *B. pumilus* IB26, kdy *B. subtilis* IB23 snížil koncentraci některých BA až o 62 %, u *B. pumilus* IB26 byl zaznamenán maximální pokles koncentrace o 47 %. Naopak v médiu nutrient broth byla míra degradace vyšší u *B. pumilus* IB26. Předpokládalo se, že v nutričně bohatém médiu budou sledované kmeny BA degradovat minimálně nebo vůbec. I přes to, že byly BA v nutrient broth degradovány méně, snížil *B. subtilis* IB23 obsah všech BA v nutrient broth, během 48 h při kultivační teplotě 30 °C v médiu bez přídavku soli průměrně o 37 %, v médiu s 2 % soli bylo snížení koncentrace v daných podmínkách obdobné. *B. pumilus* IB26 snížil obsah sledovaných BA během 48 h průměrně o 45 %, obdobné výsledky byly získány i po kultivaci v médiu s přídavkem soli.

## 7. PŘÍNOS PRO VĚDU S PRAXI

Předkládaná disertační práce se věnovala vytipování mikroorganismů izolovaných z potravin a jejich schopnosti degradovat biogenní aminy. U nalezených kmenů byla studována kinetika degradace v podmínkách *in vitro*. Jednotlivé metody identifikace mikroorganismů a následná kvantifikace jejich schopností rozkládat biogenní aminy mohou přispět k detailnějšímu prostudování mechanismů bakteriální degradace a přispět tak ke snížení či úplné eliminaci otrav z potravin a negativních vlivů takto kontaminovaných potravin na lidské zdraví. Dále mohou sloužit jako podklady pro další studie zabývající se konzervací a trvanlivostí zejména fermentovaných výrobků.

Přínos pro vědu lze spatřit v následujících aspektech

- Byl proveden rozsáhlý skrínig nejrozličnějších druhů potravin, v nichž bylo zachyceno 114 izolátů schopných degradovat jeden a/nebo více biogenních aminů.
- Bylo identifikováno 22 různých bakteriálních druhů s vysokou degradační aktivitou.
- Byla kvantifikována schopnost a míra degradace biogenních aminů u 13 druhů bakterií – *Acinetobacter pittii*, *Agrobacterium radiobacter*, *Bacillus altitudinis*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus safensis*, *Bacillus subtilis*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Micrococcus luteus*, *Pseudomonas koreensis*, *Pseudomonas fulva*, *Serratia marcescens*, *Serratia ureylitica*.
- Byl studován vliv vnějších podmínek na degradaci fenylethylaminu, putrescinu, kadaverinu, histaminu a tyraminu kmenem *Bacillus subtilis* IB23
- Byly sledovány rozdíly v degradaci u kmenů *Bacillus subtilis* IB23 a *Bacillus pumilus* IB26 v závislosti na teplotě, pH média, koncentraci soli a použitém médiu v různých časových intervalech.
- Byl prokázán vliv teploty, zvyšující se koncentrace soli a druh použitého média na průběh degradace.

Přínos pro praxi lze spatřit v následujících aspektech

- Zjištění, že testované kmeny jsou schopny degradovat biogenní aminy v poměrně širokém rozmezí teplot.
- Zjištění efektivního rozkladu BA v širším rozmezí pH.
- Zjištění, že se zvyšujícím se množstvím soli v médiu sice klesá míra degradace, ale při přídatku až 3 % (w/v) NaCl není výrazně inhibována.
- Zjištění, že testované kmeny jsou schopny poměrně dobře rozkládat BA i v nutričně bohatém médiu přibližujícímu se vzorku reálné potravin.

Získané poznatky mohou sloužit jako základ pro další studium rozkladu BA v reálných potravinách včetně těch s náročnějšími výrobními parametry.

## SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

Abdulumeen, H. A., Risikat, A. N., Sururah, A. R. (2012). Food: Its preservatives, additives and applications. *International Journal of Chemical and Biochemical Sciences*, 1, 36-47, DOI: 10.1007/s12161-017-1122-9

Adımcılar, V., Öztekin, N., Bedia Erim, F. (2018). A direct and sensitive analysis method for biogenic amines in dairy products by capillary electrophoresis coupled with contactless conductivity detection. *Food Analytical Methods*, 11, 1374-1379, DOI: 10.1007/s12161-017-1122-9

Ahmad, W., Mohammed, G.I., Al-Eryani, D.A., Saigl, Z.M., Alyoubi, A.O., Alwael, H., Bashammakh, A.S., O'Sullivan, C.K., El-Shahawi, M.S. (2020). Biogenic Amines Formation Mechanism and Determination Strategies: Future Challenges and Limitations. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 50, 485-500. DOI:10.1080/10408347.2019.1657793

Ahn, H. J., Yook, H. S., Rhee, M. S., Lee, C. H., Cho, Y., Byun, M. W. (2002). Application of gamma irradiation on breakdown of hazardous volatile *N*-nitrosamines. *Journal of Food Science*, 67, 586-599. DOI: 10.1111/j.1365-2621.2002.tb10644.x

Alvarez, M. A., Moreno-Arribas, M. V. (2014). The problem of biogenic amines in fermented foods and the use of potential biogenic amine-degrading microorganisms as a solution. *Trends in Food Science and Technology*, 39, 146-155. DOI: 10.1016/j.tifs.2014.07.007

Amghouz, Z., Ancín-Azpilicueta, C., Burusco, K. K., García, J. R., Khainakov, S. A., Luquin, A., Nieto, R., Garrido, J. J. (2014). Biogenic amines in wine: Individual and competitive adsorption on a modified zirconium phosphate. *Microporous and Mesoporous Materials*, 197, 130-139. DOI: 10.1016/j.micromeso.2014.06.006

Anli, R. E., Bayram, M. (2009). Biogenic amines in wines. *Food Reviews International*, 25, 86-102. DOI: 10.1080/87559120802458552

Anli, R. E., Vural, N., Yilmaz, S., Vural, Y. H. (2004). The determination of biogenic amines in Turkish red wines. *Journal of Food Composition Analysis*, 17, 53-62. DOI: 10.1016/S0889-1575(03)00104-2

Arnold, S. H., Brown, W. D. (1978). Histamine toxicity from fish products. *Advances in Food Research*, 34, 113-154. DOI: 10.1016/S0065-2628(08)60157-3

Aydin, S. (2015). A short history, principles, and types of ELISA, and our laboratory experience with peptide/protein analyses using ELISA, *Peptides*, 72, 4-15. DOI: 10.1016/j.peptides.2015.04.012

Ayhan, K., Kolsarici, N., Ozkan, G. A. (1999). The effect of a starter culture on the formation of biogenic amines in Turkish soudjoucks. *Meat Sciences*, 53, 183-188. DOI: 10.1016/S0309-1740(99)00046-7

Balamatsia, C. C., Paleologos, E. K., Kontominas, M. G., Savvaidis, I. N. (2006). Correlation between microbial flora, sensory changes and biogenic amines formation in fresh

chicken meat stored aerobically or under modified atmosphere packaging at 4 degrees C: possible role of biogenic amines as spoilage indicators. *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology*, 89, 9-17. DOI: 10.1007/s10482-005-9003-4

Balamatsia, C. C., Patsias, A., Kontominas, M. G., Savvaidis, I. N. (2007). Possible role of volatile amines as quality-indicating metabolites in modified atmosphere-packaged chicken fillets: correlation with microbiological and sensory attributes. *Food Chemistry*, 104, 1622-1628. DOI: 10.1016/j.foodchem.2007.03.013

Benkerroum, N. (2016). Biogenic amines in dairy products: Origin, incidence, and control means. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 15, 801-826. DOI: 10.1111/1541-4337.12212

Biji, K. B., Ravishankar, C. N., Venkateswarlu, R., Mohan, C. O., Gopal, T. K. S. (2016). Biogenic amines in seafood: A review. *Journal of Food Science & Technology*, 53, 2210-2218. DOI: 10.1007/s13197-016-2224-x

Bilgin, B., Gençcelep, H. (2015). Determination of biogenic amines in fish products. *Food Science and Biotechnology*, 24, 1907-1913. DOI:10.1007/s10068-015-0251-4

Bistola, V., Arfaras-Melainis, A., Trogkanis, E., Bakosis, G., Polyzogopoulou, E., Karavidas, L., Ikonomidis, I., Parissis, J., Karacidas, A. (2020). Safety and efficacy of salt substitution with a low sodium-potassium enriched dietary salt in patients with heart failure with reduced ejection fraction: a pilot study. *Clinical Nutrition ESPEN*, 35, 90-94. DOI: 10.1016/j.clnesp.2019.11.004

Blatná, D. (1996). *Neparametrické metody. Testy založené na pořádkových a pořadových statistikách*. 1. vyd. Praha: VŠE, 217 s. ISBN 80-7079-607-3.

Bodmer, S., Imark, C., Kneubühl, M. (1999). Biogenic amines in foods: histamine and food processing. *Inflammatory Research*, 48, 296–300. DOI: 10.1007/s000110050463

Bover-Cid, S., Izquierdo-Pulido, M., Vidal-Carou, M.C. (2001a). Effect of the interaction between a low tyramine-producing *Lactobacillus* and proteolytic staphylococci on biogenic amine production during ripening and storage of dry sausages. *International Journal of Food Microbiology*, 65, 113–123. DOI: 10.1016/S0168-1605(00)00525-0

Bover-Cid, S., Miguel-Arrizádo, M. J., Vidal-Carou, M. C. (2001b). Biogenic amine accumulation in ripened sausages affected by the addition of sodium sulphite. *Meat Sciences*, 59, 391–396. DOI: 10.1016/S0309-1740(01)00091-2

Bover-Cid, S., Miguélez-Arrizado, M. J., Becker, B., Holzapfel, W. H., Vidal-Carou, M. C., (2008). Amino acid decarboxylation by *Lactobacillus curvatus* CTC273 affected by the pH and glucose availability. *Food Microbiology*, 25, 2, 269-277. DOI: 10.1016/j.fm.2007.10.013

Bozkurt, H., Erkmen, O. (2014). Effects of temperature humidity and additives on the formation of biogenic amines in sucuk during ripening and storage periods. *Food Science and Technology International*, 10, 21-28. DOI: 10.1177/1082013204041992

Brewer, M.S., 2009. Irradiation effects on meat flavor: A review. *Meat Sci.*, roč. 81, s. 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2008.07.011>

Buňka, F., Budinský, P., Čechová, M., Drienovský, V., Pachlová, V., Matoulková, D., Kubáň, V., Buňková, L. (2012). Content of biogenic amines and polyamines in beers from the Czech Republic. *Journal of The Institute of Brewing*, 118, 213-216. DOI: 10.1002/jib.31

Buňková, L., Buňka, F., Klčovská, P., Mrkvička, V., Doležalová, M., Kráčmar, S. (2010). Formation of biogenic amines by Gram-negative bacteria isolated from poultry skin. *Food Chemistry*, 121, 203-206. DOI: 10.1016/j.foodchem.2009.12.012

Callejon, S., Sendra, R., Ferrer, S., Pardo, I. (2014). Identification of a novel enzymatic activity from lactic acid bacteria able to degrade biogenic amines in wine. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98, 185-198. DOI: 10.1007/s00253-013-4829-6

Callejon, S., Sendra, R., Ferrer, S., Pardo, I. (2015). Ability of *Kocuria varians* LTH 1540 to degrade putrescine: identification and characterization of a novel amine oxidase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63, 4170-4178. DOI: 10.1021/jf5026967

Callejon, S., Sendra, R., Ferrer, S., Pardo, I. (2016). Cloning and characterization of a new laccase from *Lactobacillus plantarum* J16 CECT 8944 catalyzing biogenic amines degradation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100, 3113-3124. DOI: 10.1007/s00253-015-7158-0

Cantoni, C., Bianchi, M. A., Beretta, G. (1974). Amino acids, histamine and tyramine variation during ripening of dry sausage (salami). *Industria Alimentari*, 13, 7578.

Capozzi, V., Russo, P., Ladero, V., Fernández, M., Fiocco, D., Alvarez, M. A., Grieco, F., Spano, G. (2012) Biogenic amines degradation by *Lactobacillus plantarum*: Toward a potential application in wine. *Frontiers in Microbiology*, 3, 122-127. DOI: 10.3389/fmicb.2012.00122

Cappuccio, F. P., Beer, M., Strazzullo, P., European Salt Action Network (2018). Population dietary salt reduction and the risk of cardiovascular disease. A scientific statement from the European Salt Action Network. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 29, 107-114. DOI: 10.1016/2018.11.010

Celik, I., Bektas, M. (2020). An assessment of Turkish adults' knowledge levels about their salt and sugar consumption, and their attitudes toward protecting children from excessive salt and sugar consumption. *Journal of Pediatric Nursing*, 54, 17-22. DOI: 10.1016/j.pedn.2020.04.009

Chander, H., Batish, V. H., Babu, S., Singh, R. S. (1989). Factors affecting amine production by a selected strain of *Lactobacillus bulgaricus*. *Journal of Food Science*, 54, 940–942. DOI: 10.1111/j.1365-2621.1989.tb07917.x

Chen, C.-M., Lin, L.-C., Yen, G.-G. (1994). Relationship between changes in biogenic amine contents and freshness of pork during storage at different temperatures. *Journal of Chinese Agricultural Chemical Society*, 32,47-60.

Chen, H. C., Huang, Y. R., Hsu, H. H., Lin, C. S., Chen, W. C., Lin, C. M., Tsai, Y. H. (2010). Determination of histamine and biogenic amines in fish cubes (*Tetrapturus angustirostris*) implicated in a food-borne poisoning. *Food Control*, 2, 13-18. DOI: 10.1016/j.foodcont.2009.03.014

Cheng, S., Xu, Y., Lan, X. (2020). Isolation, characterization, and application of biogenic amines-degrading strains from fermented food. *Journal of Food Safety*, 40, 12716. DOI: 10.1111/jfs.12716

Chin, K. D. H., Koehler, P. E. (1983). Identification and estimation of histamine, tryptamine, phenylethylamine, and tyramine in soy sauce by thin layer chromatography of dansyl derivatives. *Journal of Food Science*, 48, 1826-1828. DOI: 10.1111/j.1365-2621.1983.tb05094.x

Christensen, H., Bisgaard, M. (2010). Molecular classification and its impact on diagnostics and understanding the phylogeny and epidemiology of selected member of *Pasteurellaceae* of veterinary importance. *Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift*, 123, 20-30. DOI:10.2376/0005-9366-123-20

Chu, C. H., Bjeldanes, L. F. (1981). Effect of diamines, polyamines and tuna fish extracts on the binding of histamine to mucin *in vitro*. *Journal of Food Science*, 47, 79-80. DOI: 10.1111/j.1365-2621.1982.tb11031.x

Chunm B. H., Kim, K. H, Sang, E. J., Che, O. J. (2020). The effect of salt concentrations on the fermentation of doenjang, a traditional Korean fermented soybean paste. *Food Microbiology*, 86, 122-131. DOI:10.1016/j.fm.2019.103329

Comas-Basté, O., Latorre-Moratalla, M. L., Sánchez-Pérez, S., Veciana-Nogués, M. T, del Carmen Vidal-Carou, M. (2019). Histamine and other biogenic amines in food. From scombroid poisoning to histamine intolerance, v C. Proestos (ed.), *Biogenic Amines*, IntechOpen, London. DOI: 10.5772/intechopen.84333

Coniglio, A., Galli, C., Gentili, P., Vadalà, R. (2008). Oxidation of amides by laccase-generated aminoxyl radicals. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 50, 40-49. DOI: 10.1016/j.molcatb.2007.09.022

Corsetti, A., Perpetuini, G. a R. Tofalo (2014). Biopreservation effects in fermented foods. In *Advances in Fermented Foods and Beverages. - Improving Quality, Technologies and Health Benefits*. 1. vyd. Cambridge: Woodhead Publishing, 2014. Kapitola 13. s. 311–327. ISBN 978-1-78242-02-8.

Cueva, C., García-Ruiz, A., González-Rompinelli, E., Bartolomé, B., Martín-Álvarez, P. J., Salazar, O. (2012). Degradation of biogenic amines by vineyard ecosystem fungi. Potential use in winemaking. *Journal of Applied Microbiology*, 112, 672-682. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2012.05243.x

Dabadé, D.S., Jacxsens, L., Miclotte, L., Abatih, E., Devlieghere, F., De Meulenaer, B. (2021). Survey of multiple biogenic amines and correlation to microbiological quality and free amino acids in foods. *Food Control*, 120, 107497. DOI: 10.1016/j.foodcont.2020.107497

Dadáková, E., Křížek, M., Pelikánová, T. (2009a). Determination of biogenic amines in foods using ultra-performance liquid chromatography (UPLC), *Food Chemistry*, 116, 365-370. DOI: 10.1016/j.foodchem.2009.02.018

Dadáková, E., Pelikánová, T., Kalač, P. (2009b). Content of biogenic amines and polyamines in some species of European wild-growing edible mushrooms. *European Food Research and Technology*, 230, 163. DOI:10.1007/s00217-009-1148-3

Dapkevicius, M. L. N. E., Nout, M. J. R., Rombouts, F. M., Houben, J. H., Wymenga, W. (2000). Biogenic amine formation and degradation by potential fish silage starter microorganisms. *International Journal of Food Microbiology*, 57, 107-114. DOI: 10.1016/S0168-1605(00)00238-5

Degheidi, M. A., Effat, B. A., Shalaby, A. R. (1992). Development of some biogenic amines during Ras cheese ripening with special reference to different starters. Proc. 5th Egyptian Conference for Dairy Science and Technology, pp. 205-217.

Dierick, N., Vandekerckhove, P., Dameyer, D. (1974). Changes in nonprotein nitrogen compounds during dry sausage ripening. *Journal Food Science*, 39, 301-304. DOI: 10.1111/j.1365-2621.1974.tb02880.x

Du, W. X., Lin, C. M., Phu, A. T., Cornell, J. A., Marshall, M. R., Wei, C. I. (2002). Development of biogenic amines in yellowfin tuna (*Thunnus albacares*): Effect of storage and correlation with decarboxylase positive bacterial flora. *Journal of Food Science*, 67, 292-301. DOI: 10.1111/j.1365-2621.2002.tb11400.x

Durak-Dados, A., Michalski, M., Osek, J. (2020). Histamine and other biogenic amines in food. *Journal of Veterinary Research*, 64, 281–288. DOI: 10.2478/jvetres-2020-0029

Edwards, R. A., Dainty, R. H., Hibbard, C. M. (1983). The relationship of bacterial numbers and types to diamine concentration in aerobically stored beef, pork, and lamb. *Journal of Food Technology*, 18, 777-788. DOI: 10.1111/j.1365-2621.1983.tb00316.x

El-Sayed, M. M. (1997). Biogenic amines in processed cheese available in Egypt. *International Journal of Dairy Science*, 6, 1079-1086. DOI: 10.1016/S0958-6946(96)00031-3

Ender, F., Harve, G., Helgebostad, A., Koppang, N., Madsen, R., Ceh, L. (1964). Isolation and identification of a hepatotoxic factor in herring meal produced from sodium nitrite preserved herring. *Naturwissenschaften*, 51, 637-638. DOI: 10.1007/BF00623677

Eom, J. S., Seo, B. Y., Choi, H. S. (2015). Biogenic Amine Degradation by *Bacillus* Species Isolated from Traditional Fermented Soybean Food and Detection of Decarboxylase-Related Genes. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25, 1519-1527. DOI: 10.4014/jmb.1506.06006. ISSN 10177825

European Food Safety Authority (EFSA), (2011). Scientific opinion on risk based control of biogenic amine formation in fermented foods. *EFSA Journal* 9 (2393), 1–93. DOI: 10.2903/j.efsa.2011.2393

European Food Safety Authority (EFSA), (2017a). Assessment of the incidents of histamine intoxication in some EU countries. *EFSA Journal* 14 (2903), 1–37. DOI: 10.2903/sp.efsa.2017.EN-1301

European Food Safety Authority (EFSA), (2017b). Re-evaluation of potassium nitrite (E 249) and sodium nitrite (E 250) as food additives, *EFSA Journal* 15 (4786), 1–158. DOI: 10.2903/j.efsa.2017.4786

Emborg, J., Dalgaard, P. (2008). Modelling the effect of temperature, carbon dioxide, water activity and pH on growth and histamine formation by *Morganella psychrotolerans*. *International Journal of Food Microbiology* 128, 226-233. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2008.08.016.

Ercan, S. S., Bozkurt, H., Soysal, C. (2013). Significance of Biogenic Amines in Foods and Their Reduction Methods. *Journal of Food Science and Engineering*, 3, 395-410. DOI: 10.17265/2159-5828/2013.08.001

Fadda, S., Vignolo, G., Oliver, G. (2001). Tyramine degradation and tyramine/histamine production by lactic acid bacteria and *Kocuria* strains. *Biotechnology Letters*, 23, 2015–2019. DOI: 10.1023/A:1013783030276

Food and Drug Administration (FDA), (2014). Scombrototoxin (histamine) formation in Fish and Fishery Products Hazards and Controls Guidance (4th ed), 113-152. ISBN: 978137987461

Feng, C., Teuber, S., Gershwin, M. E. (2016). Histamine (scombroid) fish poisoning: a comprehensive review. *Clinical Reviews Allergy & Immunology*, 50, 64-69. DOI: 10.1007/s12016-015-8467-x

Fernandez, M., del Rio, B., Linares, D. M., Martin, M. C., Alvarez, M. A. (2006). Real-time polymerase chain reaction for quantitative detection of histamine-producing bacteria: Use in cheese production. *Journal of Dairy Science*, 89, 3763-3769. DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(06)72417-1

Fernández, M., Linares, D. M., Rodríguez, A., Alvarez, M. A. (2007a). Factors affecting tyramine production in *Enterococcus durans* IPLA 655. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 73, 1400–1406. DOI: 10.1007/s00253-006-0596-y

Fernández, M., Linares, D. M., del Río, B., Ladero, V., Alvarez, M. A. (2007b). HPLC quantification of biogenic amines in cheeses: correlation with PCR-detection of tyramine-producing microorganisms, *The Journal of Dairy Research*, 74, 276-282. DOI: 10.1017/S0022029907002488

Figueiredo, T. C., Viegas, R. P., Lara, R. J. C., Baião, N. C., Souza, M. R., Henriques, L. G. D., Cançado, S. V. (2013). Bioactive amines and internal quality of commercial eggs. *Poultry Science*, 92, 1376-1384. DOI: 10.3382/ps.2012-02735

Foster, J. W., Hall, H. K. (1991). Inducible pH homeostasis, and the acid tolerance response to *Salmonella typhimurium*. *Journal of Bacteriology*, 173, 16, 5129-5135. DOI: 10.1128/jb.173.16.5129-5135.1991



Frank, H. A., Yoshinaga, W. K., Nip, W. K. (1981). Histamine formation and hortycombing during decomposition of skipjack tuna (*Kalsuwotius pelamis*) at elevated temperatures. *Marine Fisheries Review*, 43, 9.

Fusek, M., Michálek, J., Buňková, L., Buňka, F. (2020). Modelling biogenic amines in fish meat in Central Europe using censored distributions, *Chemosphere*, 251. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2020.126390

García-Moruno, E., Carrascosa, A., Muñoz, R. (2005). A rapid and inexpensive method for the determination of biogenic amines from bacterial cultures by thin-layer chromatography. *Journal of Food Protection*, 68, 625-629. DOI: 10.4315/0362-028x-68.3.625

García-Ruiz, A., González-Rompinelli, E. M., Bartolomé, B., Moreno-Arribas, M. V. (2011). Potential of wine-associated lactic acid bacteria to degrade biogenic amines. *International Journal of Food Microbiology*, 148, 115-120. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2011.05.009

Gardini, F., Martuscelli, M., Crudele, M. A., Paparella, A., Suzzi, G. (2002). Use of *Staphylococcus xylosus* as a starter culture in dried sausages: effect on the biogenic amine content. *Meat Science*, 61, 275-283. DOI: 10.1016/s0309-1740(01)00193-0

Gardini, F., Özogul, Y., Suzzi, G., Tabanelli, G., Özogul, F. (2016). Technological factors affecting biogenic amine content in foods: A review. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1–18. DOI: 10.3389/fmicb.2016.01218

Gençcelep, H., Kaban, G., Kaya, M. (2007). Effects of starter cultures and nitrite levels on formation of biogenic amines in sucuk. *Meat Science*, 77, 424-430. DOI: 10.1016/j.meatsci.2007.04.018

Genigeorgis, C. A. (1976). Quality control for fermented meats. *Journal of the American Veterinary Medical*, 169, 1220-1228.

Gloria, M. B. A. (2005). Bioactive Amines. s. 13–32. In: HUI, Y. H.: Handbook of Food Science, Technology, and Engineering. Boca Raton: CRC Press, 3632 s. ISBN 978-1-4665-0787-6.

Gobbi, L., Ciano L. S., Rapa, M., Ruggieri, R. (2019). Biogenic amines determination in plant milks. *Beverages*, 5, 40. DOI:10.3390/beverages5020040

Gonzalez-Fernandez, C., Santos, E. M., Jaime, I., Rovira, J. (2003). Influence of starter cultures and sugar concentrations on biogenic amine contents in chorizo dry sausage, *Food Microbiology*, 20, 275-284. DOI: 10.1016/S0740-0020(02)00157-0

Gopikrishna, T., Suresh Kumar, H. K., Perumal, K., Elangovan, E. (2021). Impact of *Bacillus* in fermented soybean foods on human health. *Annals of Microbiology*, 71, 30. DOI: 10.1186/s13213-021-01641-9

Guarcello, R., De Angelis, M., Settanni, L., Formiglio, S., Gaglio, R., Minervini, F., Moschetti, G., Gobbetti, M., Björkroth, J. (2016). Selection of amine-oxidizing dairy lactic acid

bacteria and identification of the enzyme and gene involved in the decrease of biogenic amines. *Applied and Environmental Microbiology*, 82, 6870-6880. DOI: 10.1128/AEM.01051-16

Gücükoğlu, A., Küplülü, O. (2010). The effect of different starter cultures and ripening temperatures on formation of biogenic amine in Turkish fermented sausages. *European Food Research and Technology*, 230, 875-884. DOI: 10.1007/s00217-010-1220-z

Guo, Y.-Y., Yang, Y.-P., Peng, Q., Han, Y. (2015). Biogenic amines in wine: a review. *International Journal of Food Science and Technology*, 50, 1523–1532. DOI: 10.1111/ijfs.12833

Halász, A., Baráth, Á. (2002). Toxicity of biogenic amines – the present knowledge. *Food Science and Technology*, 7, 131-141.

Halász, A., Baráth, A., Simon-Sarkadi, L., Holzapfel, W. (1994). Biogenic amines and their production by micro-organisms in food-review. *Trends in Food Science and Technology*, 5, 49. DOI: 10.1016/0924-2244(94)90070-1

Harirchi, S., Sar, T., Ramezani, M., Aliyu, H., Etemadifar, Z., Nojoumi, S. A., Yazdian, F., Awasthi, M. K., Taherzadeh, M. J. (2022). *Bacillales*: From Taxonomy to Biotechnological and Industrial Perspectives. *Microorganisms*, 10, 2355. DOI: 10.3390/microorganisms10122355

Heldman, E. R. (1980). Frozen Foods: Challenges for the future, *Food Australia*, 45, 374-380. ISSN: 1032-5298

Hernandez-Jover, T., Izquierdo-Pulido, M., Veciana-Nogues, M. T., Marine-Font, A., Vidal-Carou, M. C. (1997). Biogenic amine and polyamine contents in meat and meat products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 2098-2102. DOI: 10.1021/jf960790p

Hernandez-Orte, P., Cacho, J. F., Ferreira, V. (2002). Relationship between varietal amino acid profile of grapes and wine aromatic composition, experiments with model solutions and chemometric study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 2891-2899. DOI: 10.1021/jf011395o

Herrero-Fresno, A., Martínez, N., Sánchez-Llana, E., Díaz, M., Fernández, M., Martín, M. C., Ladero, V., Alvarez, M. A. (2012). *Lactobacillus casei* strains isolated from cheese reduce biogenic amine accumulation in an experimental model. *International Journal of Food Microbiology*, 157, 297–304. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2012.06.002

Hiroyuki, S., Minoru, S., Hiroyuki A., Mitsuo, Y., Yoshikatsu, M. (1992). A monoamine-regulated *Klebsiella aerogenes* operon containing the monoamine oxidase structural gene (*maoA*) and the *maoC* Gene. *Journal of Bacteriology*, 174, 2485-2492. DOI: 10.1128/jb.174.8.2485-2492.1992

Hoegger, P. J., Kilaru, S., James, T. Y., Thacker, J. R., Kues, U. (2006). Phylogenetic comparison and classification of laccase and related multicopper oxidase protein sequences. *FEBS Journal*, 273, 2308-2326. DOI: 10.1111/j.1742-4658.2006.05247.x

Hui, J. Y., Taylor, S. L. (1985). Inhibition of in vivo histamine metabolism in rats by foodborne and pharmacologic inhibitors of diamine oxidase, histamine N-methyltransferase, and monoamine oxidase. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 81, 241-249. DOI: 10.1016/0041-008x(85)90160-7

Hungerford, J.M., 2010. Scombroid poisoning: A review. *Toxicon*, 56, 231–243. DOI: 10.1016/j.toxicon.2010.02.006

Iversen, L. L., Iversen, S. D., Snyder, S. H. (2012). *Biochemistry of Biogenic Amines*. s. 247-326 In: Handbook of Psychopharmacology, 1. vyd. USA: Springer US, 486 s. ISBN 978-1-4684-3173-5

Jairath, G., Singh, P., Dabur, R., Rani, M., Chaudhari, M. (2015). Biogenic amines in meat and meat products and its public health significance: a review. *Journal of Food Science and Technology*, 52, 6835-6846. DOI: 10.1007/s13197-015-1860-x

Jakšić, S., Baloš, M. Ž., Mihaljev, Ž., Prodanov Radulović, J., Nešić, K. (2017). Comparison of analytical methods for the determination of histamine in reference canned fish samples. IOP Conference Series: Earth and Environmental Science, 85, 12-66. DOI:10.1088/1755-1315/85/1/012066

Jarisch, R. (2004). Histamin-Intoleranz, Histamin und Seekrankheit. 2nd ed. Thieme, Stuttgart, 166 s. ISBN: 3131053836

Jean, P. B. (1994). *Food Preservation*. In: Nicolas Appert inventeur at humaniste, dostupné z [http://www.appert\\_aina.com](http://www.appert_aina.com).

Jia, Y., Niu, C. T., Lu, Z. M., Zhang, X. J., Chai, L. J., Shi, J. S., Xu, Z. H., Li, Q. (2020) A bottom-up approach to develop a synthetic microbial community model: application for efficient reduced-salt broad bean paste fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*, 86, 6-20. DOI: 10.1128/AEM.00306-20

Jin, A. M., Liu, K., Labarthe, D. R., Feng, X. X., Zhang, R. J., Wang, H. X., Qiao, Q. K., Li, H. J. J., Li, Y., Gao, P., Fang, H., Duan, P. F., Wang, Y. Q., Zhang, H., Cao, L., Neal, B., Chen, J. S., Wu, Y. F. (2020). Impact of salt substitute and stepwise reduction of salt supply on blood pressure in residents in senior residential facilities: design and rationale of the DECIDE-Salt trial. *American Heart Journal*, 226, 198-205, DOI: 10.1016/j.ahj.2020.05.013

Joosten, H. M. L. G. (1988). Conditions allowing the formation of biogenic amines in cheese. 3. Factors influencing the amounts formed. *Netherlands Milk Dairy Journal*, 41, 329-357.

Joosten, H. M., Nunez, M. (1996). Prevention of Histamine Formation in Cheese by Bacteriocin-Producing Lactic Acid Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 62, 1178-1181. DOI: 10.1128/aem.62.4.1178-1181.1996

Joosten, H. M. L. G., Olieman, C. (1986). Determination of biogenic amines in cheese and some other food products by high-performance liquid chromatography in combination with thermosensitized reaction detection. *Journal of Chromatography*, 356, 311-319.

Joosten, H. M. L. G., Stadhouders, J. (1987). Conditions allowing the formation of biogenic amines in cheese. 1. Decarboxylative properties of starter bacteria. *Netherlands Milk Dairy Journal*, 41, 247-259. DOI: 10.1016/s0021-9673(00)91491-2

P. Kalač, P. Krausová (2005). A review of dietary polyamines: formation, implications for growth and health and occurrence in foods. *Food Chemistry*, 90, 219-260. DOI: 10.1016/j.foodchem.2004.03.044

Kalač, P., Křížek, M. (1997). Formation of biogenic amines in four edible mushroom species stored under different conditions. *Food Chemistry*, 58, 233-236. DOI: 10.1016/S0308-8146(96)00170-7

Kalač, P., Savel, J., Krizek, M., Pelikanova, T., M. Prokopova (2002). Biogenic amine formation in bottled beer, *Food Chemistry*, 79 (2002) 431-434. DOI: 10.1016/S0308-8146(02)00193-0

Kalač, P., Spicka, J., Krizek, M., Pelikanova, T., M. Prokopova (2000). The effect of lactic acid bacteria inoculants on biogenic amines formation in sauerkraut. *Food Chemistry*, 70, 355-359. DOI: 10.1016/S0308-8146(00)00103-5

Karovičová, J. a Kohajdová, Z. (2005). Biogenic Amines in Food. *Chemical Papers*, 59, 70-79. DOI:10.1002/chin.200534338

Kim, J. H., Ahn, H. J., Jo, C., Park, H. J., Chung, Y. J., Byun, M. W. (2004). Radiolysis of biogenic amines in model system by gamma irradiation. *Food Control*, 15, 405–408. DOI: 10.1016/S0956-7135(03)00102-6

Kim, J. H., Ahn, H. J., Kim, D. H., Jo, C., Yook, H. S., Park, H. J., Byun, M. W. (2003). Irradiation effects on biogenic amines in korean fermented soybean paste during fermentation. *Journal of Food Science*, 68, 80–4. DOI: 10.1111/j.1365-2621.2003.tb14118.x

Kim, J. S., Cho, S. H., Jeong, D. Y., Uhm, T. B. (2012). Isolation of Biogenic Amines-Degrading Strains of *Bacillus subtilis* and *Bacillus amyloliquefaciens* from Traditionally Fermented Soybean Products. *Korean Journal of Microbiology*, 48, 2202224. DOI: 10.7845/kjm.2012.042

Kim, S.-H., Yehuala, G. A., Bang, W. Y., Yang, J., Jung, Y. H., Park, M.-K. (2022) Safety Evaluation of *Bacillus subtilis* IDCC1101, Newly Isolated from Cheonggukjang, for Industrial Applications. *Microorganisms*, 10, 2494. DOI: 10.3390/microorganisms10122494

Kim, S. Y., Kim, H. E., Kim, Y. S. (2017). The potentials of *Bacillus licheniformis* strains for inhibition of *B. cereus* growth and reduction of biogenic amines in cheonggukjang (Korean fermented unsalted soy-bean paste). *Food Control*, 79, 87–93. DOI: 10.1016/j.foodcont.2017.03.028

Kodiček, Milan (2004). ELISA. In: Biochemické pojmy: výkladový slovník [online]. Praha: VŠCHT Praha, Dostupné z: [https://vydavatelstvi-old.vscht.cz/knihy/uid\\_es-002/ebook.html?p=elisa](https://vydavatelstvi-old.vscht.cz/knihy/uid_es-002/ebook.html?p=elisa)

Koehler, P. E., Eitenmiller, R. R. (1978). High performance liquid chromatographic analysis of tyramine, phenylethylamine and tryptamine in sausage, cheese, and chocolate. *Journal of Food Science*, 43, 344-346. DOI: 10.1111/j.1365-2621.1978.tb15279.x

Koutsoumanis, K., Tassou, C., Nychas G.-J. E. (2010). Biogenic amines in foods, in Pathogens and Toxins in Food: Challenges and Interventions. Juneja VK and Sofos JN, (eds.) Wiley, 248-274. DOI: 10.1128/9781555815936.ch16

Kurt, S., Zorba, O. (2009). The effects of ripening period nitrite level and heat treatment on biogenic amine formation of “sucuk”—A Turkish dry fermented sausage. *Meat Science*, 82, 179-184. DOI: 10.1016/j.meatsci.2009.01.008

Ladero, V., Calles-Enríquez, M., Fernández, M., Alvarez, M. A. (2010). Toxicological effects of dietary biogenic amines. *Current Nutrition and Food Science*, 6, 145–156. DOI: 10.2174/157340110791233256

Lanciotti, R., Patrignani, P., Iucci, L., Guerzoni, M. E., Suzzi, G., Belletti, N., Gardini, F. (2007). Effects of milk high pressure homogenization on biogenic amine accumulation during ripening of ovine and bovine Italian cheeses. *Food Chemistry*, 104, 693-701. DOI: 10.1016/j.foodchem.2006.12.017

Latorre-Moratalla, M. L., Bover-Cid, S., Aymerich, T., Marcos, B., Vidal-Carou, M. C., Garriga, M. (2007). Aminogenesis control in fermented sausages manufactured with pressurized meat batter and starter culture. *Meat Science*, 75, 460–9. DOI: 10.1016/j.meatsci.2006.07.020

Latorre-Moratalla, M. L., Bover-Cid, S., Veciana-Nogués, T., Vidal-Carou, M. C. (2009). Thin-layer chromatography for the identification and semi-quantification of biogenic amines produced by bacteria. *Journal of Chromatography A*, 1216, 4128-4132. DOI: 10.1016/j.chroma.2009.02.045

Lee, J., Jin, Y.H., Pawluk, A.M., Mah, J.-H. (2021). Reduction in Biogenic Amine Content in Baechu (Napa Cabbage) Kimchi by Biogenic Amine-Degrading Lactic Acid Bacteria. *Microorganisms*, 9, 2570. DOI: 10.3390/microorganisms9122570

Lee, J. I., Kim, Y. W. (2013). Characterization of amine oxidases from *Arthrobacter aureoscens* and application for determination of biogenic amines. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 29 (2013), 673-682. DOI: 10.1007/s11274-012-1223-y

Lee, Y.-C., Lin, C.-S., Liu, F.-L., Huang, T.-C., Tsai, Y.-H. (2015). Degradation of histamine by *Bacillus polymyxa* isolated from salted fish products. *Journal of Food and Drug Analysis*, 23, 836-844. DOI: 10.1016/j.jfda.2015.02.003.

Lehane, L., Olley, J. (2000). Histamine fish poisoning revisited: Toxicology and Clinical Aspects. *International Journal of Food Microbiology*, 58, 1-37. DOI: 10.1016/S0168-1605(00)00296-8

Leuschner, R. G., Hammes, W. P. (1998). Degradation of histamine and tyramine by *Brevibacterium linens* during surface ripening of Munster cheese. *Journal of Food Protection*, 61, 874–878. DOI: 10.4315/0362-028x-61.7.874

Leuschner, R. G., Heidel, M., Hammes, W. P. (1998). Histamine and tyramine degradation by food fermenting microorganisms. *International Journal of Food Microbiology*, 39, 1–10. DOI: 10.1016/s0168-1605(97)00109-8

Li, J., Jiang, K., Huang, H. Z., Cheng, H., Ye, X. Q., Zhi, Z. J. (2020). Process improvement to prevent the formation of biogenic amines during soy sauce brewing. *Food Chemistry*, 331, 127347. DOI: 10.1016/j.foodchem.2020.127347

Lia, B., Lu, S. (2020). The Importance of Amine-degrading Enzymes on the Biogenic Amine Degradation in Fermented Foods: A review. *Process Biochemistry*, 99, 331-339. DOI: 10.1016/j.procbio.2020.09.012

Linares, D. M., del Río, B., Ladero, V., Martínez, N., Fernández, M., Cruz Martín, M., Álvarez, M. A. (2011). Factors influencing biogenic amines accumulation in dairy products. *Frontiers in Microbiology*, 3, 180. DOI: 10.3389/fmicb.2012.00180

Liu, S. P., Yu, J. X., Wei, X. L., Ji, Z. W., Zhou, Z. L., Meng, X. Y., Mao, J. (2016). Sequencing-based screening of functional microorganisms to decrease the formation of biogenic amines in Chinese rice wine. *Food Control*, 64, 98-104. DOI: 10.1016/j.foodcont.2015.12.013

Loaharanu, P. (1989). Worldwide status of food irradiation and the FAO/IAEA/WHO/ITCUNCTAD/GATT international conference on the acceptance; control of and trade in irradiated food. *International Journal of Radiation Applications and Instrumentation*, 76-81. ISSN 0933-5463

Long, F., Fong, Y., El-Nezami, H., Sze, E. T. P (2021). Biogenic amines – Precursors of carcinogens in traditional Chinese fermented food. *NFS Journal*, 23, 52-57. DOI: 10.1016/j.nfs.2021.04.002

Lorencová, E., Buňková, L., Matoulková, D., Dráb, V., Pleva, P., Kubáň, V., Buňka, F. (2012). Production of biogenic amines by lactic acid bacteria and bifidobacteria isolated from dairy products and beer. *International Journal of Food Science and Technology*. 47, 2086-2091. DOI: 10.1111/j.1365-21.2012.03074.x.

Lorenzo, J. M., Munekeata, P. E. S., Domínguez, R. (2017). Role of autochthonous starter cultures in the reduction of biogenic amines in traditional meat products. *Current Opinion in Food Science*, 14, 61-65. DOI: 10.1016/j.cofs.2017.01.009

Lovenberg, W. (1973). Some vaso- and psychoactive substances in food: amines stimulates depressants and hallucinogens. *In Toxicants Occurring Naturally in Foods*, National Academy of Science, Washington, DC.

Lyte, M. (2004). The biogenic amine tyramine modulates the adherence of *Escherichia coli* O157:H7 to intestinal mucosa. *Journal of Food Protection*, 67, 878-883. DOI: 10.4315/0362-028x-67.5.878

Mah, J.-H., Hwang, H.-Y. (2009). Inhibition of biogenic amine formation in a salted and fermented anchovy by *Staphylococcus xylosus* as a protective culture. *Food Control*, 20, 796-801. DOI: 10.1016/j.foodcont.2008.10.005.

Maijala, R. L. (1993). Formation of histamine and tyramine by some lactic acid bacteria in MRS-broth and modified decarboxylation agar. *Letters in Applied Microbiology*, 17, 40-43. DOI: 10.1111/j.1472-765X.1993.tb01431.x

Maijala, R. L., Nurmi, E., Fischer, A. (1995). Influence of processing temperature on the formation of biogenic amines in dry sausages. *Meat Science*, 39, 9-22. DOI: 10.1016/0309-1740(95)80003-4

Maintz, L., Novak, N. (2007). Histamine and histamine intolerance. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 85, 1185-1196. DOI: 10.1093/ajcn/85.5.1185

Majou, D., Christeans, S. (2018). Mechanisms of the bactericidal effects of nitrate and nitrite in cured meats. *Meat Science*, 145, 273-284. DOI: 10.1016/j.meatsci.2018.06.013

Martinez, N., Cruz Martin, M., Herrero, A., Fernandez, M., Alvarez, M., Ladero, V. (2011). q PCR as a powerful tool for microbial food spoilage quantification: significant for food quality. *Trends in Food Science and Technology*, 22, 367-376.

Martuscelli, M., Crudele, M. A., Gardini, F., Suzzi, G. (2000). Biogenic amine formation and oxidation by *Staphylococcus xylosus* strains from artisanal fermented sausages. *Letters in Applied Microbiology*, 31, 228-232. DOI: 10.1016/j.tifs.2011.04.004

Maxa, E., Brandes, W. (1993). Biogene amine in fruchtsäften. *Chemistry*, 43, 101.

Mayer, H. K., Fiechter, G., Fischer, E. (2010). A new ultra-pressure liquid chromatography method for the determination of biogenic amines in cheese. *Journal of Chromatography A*, 1217, 3251-3257. DOI: 10.1016/j.chroma.2009.09.027

Mbarki, R., Miloud, N. B., Selmi, S., Dhib, S., Sadok, S. (2009). Effect of vacuum packaging and low-dose irradiation on the microbial, chemical and sensory characteristics of chub mackerel (*Scomber japonicus*). *Food Microbiology*, 26, 821-826. DOI: 10.1016/j.fm.2009.05.008

McCabe-Sellers, B. J. (1986). Dietary tyramine and other pressor amines in MAOI regimens: a review. *Journal of the American Dietetic Association*, 86, 1059-1064. ISSN: 0002-8223

Mikolasch, A., Hammer, E., Jonas, U., Popowski, K., Stielow, A., Schauer, F. (2002). Synthesis of 3-(3,4-dihydroxyphenyl)-propionic acid derivatives by N-coupling of amines using laccase. *Tetrahedron*, 58, 7589-7593. DOI: 10.1016/S0040-4020(02)00872-4

Mikolasch, A., Niedermeyer, T. H. J., Lalk, M., Witt, S., Seefeldt, S., Hammer, E., Schauer, F., Gesell, M., Hessel, S., Jülich, W., Lindequist, U. (2007). Novel Cephalosporins Synthesized by Amination of 2,5-Dihydroxybenzoic Acid Derivatives Using Fungal Laccases II. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 55, 412-416. DOI: 10.1248/cpb.55.412

Min, J. S., Lee, S., Jang, A., Jo, C., Lee, M. (2007). Irradiation and organic acid treatment for microbial control and the production of biogenic amines in beef and pork. *Food Chemistry*, 104, 791–799. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.12.030>

Ming, L. X., Wei, Z., Tong, B. J., Jing, L.J., Hua, Y., Zhen, M. L. (2019) Effects of Different Starter Cultures of Lactic Acid Bacteria on the Quality of Fermented Red Sausage. *Meat Research* 33: 7-13. ISSN: 1001-8123

Mohedano, M. L., López, P., Spano, G., Russo, P. (2015). Controlling the formation of biogenic amines in fermented foods. *Advances in Fermented Foods and Beverages*, 273-310. DOI: 10.1016/B978-1-78242-015-6.00012-8.

Molenaar, D., Bosscher, J. S., ten Brink, B., Driessen, A. J. M., Konings, W. N. (1993). Generation of a proton motive force by histidine decarboxylation and electrogenic histidine/histamine antiport in *Lactobacillus buchneri*. *Journal of Bacteriology*, 175, 2864–2870. DOI: 10.1128/jb.175.10.2864-2870.1993

Mower, H. F., Bhagavan, N. V. (1989). Tyramine content of Asian and Pacific foods determined by high performance liquid chromatography. *Food Chemistry*, 31, 251-257. DOI: 10.1016/0308-8146(89)90066-6

Nakamura, M., Wada, Y., Saway, H., Kawabata, T. (1979). Polyamine content in fresh and processed pork. *Journal of Food Science*, 44, 515-517. DOI: 10.1111/j.1365-2621.1979.tb03824.x

Naila, A., Flint, S., Fletcher, G., Bremer, P., Meerdink, M. (2010). Control of Biogenic Amines in Food—Existing and Emerging Approaches. *Journal of Food Science*, 75, 139-150. DOI: 10.1111/j.1750-3841.2010.01774.x

Naila, A., Flint, S., Fletcher, G., Bremer, P., Meerdink, M., Morton, R. H. (2012). Prediction of the amount and rate of histamine degradation by diamine oxidase (DAO). *Food Chemistry*, 135, 2650-2660. DOI: 10.1016/j.foodchem.2012.07.022

Narang, D., Tomlinson, S., Holt, A., Mousseau, D.D., Baker, G.B. (2011). Trace amines and their relevance to psychiatry and neurology: a brief overview. *Bulletin of Clinical Psychopharmacology*, 21, 73–79. DOI: 10.5350/kpb-bcp201121113

Nařízení Komise (ES) č. 2073/2005 ze dne 15. listopadu 2005 o mikrobiologických kritériích pro potraviny. Dostupné z: <https://eur-lex.europa.eu/legalcontent/CS/TXT/PDF/?uri=CELEX:02005R2073-20130701&from=ET>

Nebelin, E., Pillai, S., Lund, E., Thomsen, J. (1980). On the formation of N-nitrosopyrrolidine from potential precursors and nitrite. *Chemistry*, 31, 183-193.

Nemeth-Szerdahelyi, L., Freudenreich, P., Fischer, K. (1993). Studies on biogenic amine contents in pork. *Fleischwirtschaft*, 73, 789-790.

Nishino, N., Hattori, H., Wada, H., Touno, E. (2007). Biogenic amine production in grass, maize and total mixed ration silages inoculated with *Lactobacillus casei* or *Lactobacillus*



*buchneri*. *Journal of Applied Microbiology*, 103, 325-332. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2006.03244.x

Nout, M. J. R., Rukies, M. M. W., Bouwmeester, H. M., Beljaars, P. R. (1993). Effect of processing conditions on the formation of biogenic amines and ethyl carbamate in soybean tempeh. *Journal of Food Safety*, 13, 293–303. DOI: 10.1111/j.1745-4565.1993.tb00114.x

Novella-Rodriguez, S., Veciana-Nogues, M. T., Saldo, J., Vidal-Carou, M. C. (2002). Effects of high hydrostatic pressure treatments on biogenic amine contents in goat cheeses during ripening. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 50, 7288–7292. DOI: 10.1021/jf025665u

Nuñez, M., Medina, M. (2011). Biogenic amines in Encyclopedia of Dairy Sciences (Second Edition), 451-456.

Okamura, H., Murooka, Y., Harada, T. (1976). Regulation of tyramine oxidase synthesis in *Klebsiella aerogenes*. *Journal of Bacteriology*, 127, 24-31. DOI: 10.1128/jb.127.1.24-31.1976

Önal, A. (2007). A review: Current analytical methods for the determination of biogenic amines in foods. *Food Chemistry*, 103, 1475-1486. DOI: 10.1016/j.foodchem.2006.08.028

Ordóñez, J.L., Troncoso, A.M., García-Parrilla, M.D.C., Callejón, R.M. (2016). Recent trends in the determination of biogenic amines in fermented beverages – A review. *Analytica Chimica Acta*, 939, 10–25. DOI: 10.1016/j.aca.2016.07.045

Ouoba, L. I. I., Diawara, B., Amoa-Awua, W. K., Traoré, A. S., Moller, P. L. (2004). Genotyping of starter cultures of *Bacillus subtilis* and *Bacillus pumilus* for fermentation of African locust bean (*Parkia biglobosa*) to produce Soumbala. *International Journal of Food Microbiology*, 90, 197-205. DOI: 10.1016/S0168-1605(03)00302-7.

Pachlová, V, Buňková, L., Flasarová, R., Salek, R. N., Dlabajová, A., Butor I., Buňka, F. (2018). Biogenic amine production by nonstarter strains of *Lactobacillus curvatus* and *Lactobacillus paracasei* in the model system of Dutch-type cheese. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*, 97, 730-735. DOI: 10.1016/j.lwt.2018.07.045

Park, J. E., Seo, J. E., Lee, J. Y., Kwon, H. (2015). Distribution of seven N-nitrosamines in food. *Toxicological Research*, 31, 279-288. DOI: 10.5487/TR.2015.31.3.279

Patterson, M. F. (2005). A review: microbiology of pressure-treated foods. *Journal of Applied Microbiology*, 98, 1400–1409. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2005.02564.x

Pistekova, H., Jancova, P., Bercikova, L., Bunka, F, Sokolova, I., Sopik, T., Marsalkova, K., Amaral, O., Bunkova, L. (2020). Application of qPCR for multicopper oxidase gene (MCO) in biogenic amines degradation by *Lactobacillus casei*. *Food Microbiology*, 91, 103550, DOI: 10.1016/j.fm.2020.103550

Pleva, P. (2017). Faktory ovlivňující produkci biogenních aminů u vybraných bakterií rodů *Enterococcus* a *Staphylococcus*. Disertační práce. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2017, 152 s. ISBN 978-80-7454-689-1.

Postollec, F., Falentin, H., Pavan, S., Combrisson, J., Sohier, D. (2011). Recent advances in quantitative PCR (qPCR) applications in food microbiology. *Food Microbiology*, 28, 848-861. DOI: 10.1016/j.fm.2011.02.008

Poveda, J. M. (2019). Biogenic amines and free amino acids in craft beers from the Spanish market: a statistical approach. *Food Control*, 96, 227-233. DOI: 10.1016/j.foodcont.2018.09.012

Prete, V. D., Costantini, A., Cecchini, F., Morassut, M., Garcia-Moruno, E. (2009). Occurrence of biogenic amines in wine: The role of grapes. *Food Chemistry*, 112, 474-481. DOI: 10.1016/j.foodchem.2008.05.102

Preti, R.; Bernacchia, R.; Vinci, G. (2016). Chemometric evaluation of biogenic amines in commercial fruit juices. *European Food Research Technology*, 242, 2031–2039. DOI: 10.1007/s00217-016-2701-5

Purevdorj, K. (2021). Možnosti redukce biogenních aminů produkovaných mikroorganismy, Disertační práce. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2017, 152 s. ISBN: 978-80-7678-016-3

Purevdorj, K.; Buňková, L.; Dlabajová, A.; Čechová, E.; Pachlová, V.; Buňka, F. (2021). The impact of cell-free supernatants of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* strains on the tyramine formation of *Lactibacillus* and *Lactiplantibacillus* strains isolated from cheese and beer. *Food Microbiology*, 99, 103813. DOI: 10.1016/j.fm.2021.103813

Qiang, W., Zhenjiang, Z. (2021). Screening and characteristics of lactic acid bacteria degrading biogenic amines. *China Brewing*, 40, 115-119.

Radomyski, T., Murano, E. A., Olson, D. G., Murano, P. S. (1994). Elimination of pathogens of significance in food by low-dose irradiation: a review. *Journal of Food Protection*, 57, 73–86. DOI: 10.4315/0362-028X-57.1.73

Ramos, B., Pinho, O., Ferreira, I. M. P. L. V. O. (2009). Changes of yolk biogenic amine concentrations during storage of shell hen eggs. *Food Chemistry*, 116, 340-344. DOI: 10.1016/j.foodchem.2009.02.015

Rivas, B., González, R., Landete, J. M., Munoz, R. (2008). Characterization of a second ornithine decarboxylase isolated from *Morganella morganii*. *Journal of Food Protection*, 71, 657–61. DOI: 10.4315/0362-028x-71.3.657

Rodriguez, M. B. R., Carneiro, C. D. S., Feijó, M. B. D. S., Conte Júnior, C. A., Mano, S. B., (2014). Bioactive amines: aspects of quality and safety in food. *Food and Nutrition Sciences*, 5, 138-146. DOI: 10.4236/fns.2014.52018

Ruiz-Capillas, C., Jiménez-Colmenero, F. (2004). Biogenic amines in meat and meat products. *Food Science*, 44, 489-499. DOI: 10.1080/10408690490489341

Ruiz-Capillas, C., Colmenero, F. J., Carrascosa, A. V., Munoz, R. (2007). Biogenic amine production in Spanish dry-cured “chorizo” sausage treated with high-pressure and kept in chilled storage. *Meat Science*, 77, 365-371. DOI: 10.1016/j.meatsci.2007.03.027

Saad, M. A., Abd-Rabou, H. S., Elkhtab, E., Rayan, A. M., Abdeen, A., Abdelkader, A., Ibrahim, S. F., Hussien, H. (2022). Occurrence of Toxic Biogenic Amines in Various Types of Soft and Hard Cheeses and Their Control by *Bacillus polymyxa* D05-1. *Fermentation*, 8, 327. DOI: 10.3390/fermentation8070327

Sadeghi, N., Behzad, M., Jannat, B., Oveisi, M., Hajimahmoodi, M., Mozafzri, M. (2019). Determination of histamine in canned tuna fish available in Tehran market by ELISA method. *Journal of Food Safety and Hygiene*, 5, 208-214, DOI: 10.18502/jfsh.v5i1.3884

Sallam, I. K., Morgan, S. E. M., Sayed-Ahmed, M. C., Alqahtani, S. S., Abd-Elghanya, S. M. (2020). Health hazard from exposure to histamine produced in ready-to-eat shawarma widely consumed in Egypt. *Journal of Food Composition and Analysis*, Volume 97, 103794. DOI: 10.1016/j.jfca.2020.103794

Sánchez-Pérez, S., Comas-Basté, O., Rabell-González, J., Veciana-Nogués, M., Latorre-Moratalla, M., Vidal-Carou, M. (2018). Biogenic amines in plant-origin foods: Are they frequently underestimated in low-histamine diets? *Foods*, 7, 205. DOI: 10.3390/foods7120205

Sanli, T., Senel, E. (2015). *Formation of Biogenic Amines in Cheese in Processing and Impact on Active Components in Food*, 1st Edition, Ankara University, Faculty of Agriculture, Department of Dairy Technology, Ankara, Turkey, 223-230. DOI: 10.1016/B978-0-12-404699-3.00027-5

Sattler, J., Häfner, D., Klotter, H. J., Lorenz, W., Wagner, P. K. (1988). Food-induced histaminosis as an epidemiological problem plasma histamine elevation and haemodynamic alterations after oral histamine administration and blockade of diamine oxidase (DAO). *Agents Actions*, 23, 361-365. DOI: 10.1007/BF02142588

Saulo, A. A. (2005). Sugars and Sweeteners in Foods. *Food Safety and Technology*, 16, 1-7.

Savvaidis, I., Ruiz-Capillas, C. (2009). Biogenic amines in fresh and processed meat and meat products *G. Dandriofosse* (Ed.), Biological aspects of biogenic amines, polyamines and conjugates, Transworld Research Network, Trivandrum, India, 438 s.

Schievano, E., Guardini, K., Mammi, S. (2009). Fast determination of histamine in cheese by nuclear magnetic resonance (NMR). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 2647-2652. DOI: 10.1021/jf803364k

Schilling, K. L. B., Lerch, K. (1995). Amine oxidases from *Aspergillus niger*: identification of a novel flavin-dependent enzyme. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1243, 529-537. DOI: 10.1016/0304-4165(94)00183-x

Sekiguchi, Y., Makita, H., Yamamura, A., Matsumoto, K. (2004). A thermostable histamine oxidase from *Arthrobacter crystallopoietes* KAIT-B-007. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 97, 104-110. DOI: 10.1016/s1389-1723(04)70176-0

Shah, P., Swiatlo, E. (2008). A multifaceted role for polyamines in bacterial pathogen. *Molecular Microbiology*, 68, 4-16. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2008.06126.x

Shalaby, A. R. (1995). Multidetector, semiquantitative method for determining biogenic amines in foods. *Food Chemistry*, 52, 367-372. DOI: 10.1016/0308-8146(95)93283-W

Shalaby, A. R. (1996). Significance of biogenic amines in food safety and human health. *Food Research International*, 29, 675-690. DOI: 10.1016/S0963-9969(96)00066-X

Shalaby, A. R., Abd El-Rahman, H. A. (1995). Effect of potassium sorbate on development of biogenic amines during sausage fermentation. *Die Narung*, 39, 310-317. DOI: 10.1002/food.19950390410

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

Simmon, K. E., Croft, A. C., Petti, C. A. (2006). Application of SmartGene IDNS Software to partial 16S rRNA gene sequences for a diverse group of bacteria in a clinical laboratory. *Journal of Clinical Microbiology*, 44, 4400-4406. DOI: 10.1128/JCM.01364-06

Simon-Sarkadi, I., Holzapfel, W. H. (1994). Determination of biogenic amines in leafy vegetables by amino acid analyzer. 2. *Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung* 198, 230-233. DOI: 10.1007/BF01192600

Sinsuwan, S., Montriwong, A., Rodtong, S., Yongsawatdigul, Y. (2010). Biogenic amines degradation by moderate halophile, *Brevibacillus* sp. SK35. *Journal of Biotechnology*, 150, 316-317. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2010.09.297

Smith, J. S., Kenney, P. B., Moore, M. M. (1993). Biogenic amine formation in fresh vacuum-packaged beef during storage at 1 °C for 120 days. *Journal of Food Protection* 56, 497-500. DOI: 10.4315/0362-028X-56.6.497

Smit, A. Y., Toit, M. D. (2013). Evaluating the influence of malolactic fermentation practices and ageing on lees on biogenic amine production in wine. *Food and Bioprocess Technology*, 6, 198-206. DOI: 10.1007/s11947-011-0702-8

Soksawatmaekhin, W., Kuraishi, A., Sakata, K., Kashiwagi, K., Igarashi, K. (2004). Excretion and uptake of cadaverine by CadB and its physiological functions in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, 51, 1401-1412. DOI: 10.1046/j.1365-2958.2003.03913.x

Solano, F., Lucaselío, P., López-Serrano, D., Fernández, E., Sanchez-Amat, A. (2001). Dimethoxyphenol oxidase activity of different microbial blue multicopper proteins. *FEMS Microbiology Letters*, 204, 175-181. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2001.tb10882.x

Souza, A. L. M. D., Calixto, F. A. A., Mesquita, E. D. F. M. D., Packnessm, M. D. P., Azeredo, D. P. (2015). Histamina e rastreamento de pescado: revisão de literatur. *Arquivos do Instituto Biológico*, 82, 1-11. DOI: 10.1590/1808-1657000382013

Stadnik, J., Dolatowski, Z. J. (2010). Biogenic amines in meat and fermented meat products. *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*, 9, 251-263. ISSN 1889-9594

Stockley's Drug Interactions (2011). The Royal Pharmaceutical Society of Great Britain. (dostupné na [www.medicinescomplete.com/mc/stockley/current/x18-1097.htm](http://www.medicinescomplete.com/mc/stockley/current/x18-1097.htm)).

Stratton, J. E., Hutkins, R. W., Taylor, S. L. (1991). Biogenic amines in cheese and other fermented foods: a review. *Journal of Food Protection*, 54, 460-470. DOI: 10.4315/0362-028X-54.6.460

Sun, L., Guo, W., Zhai, Y., Zhao, L., Liu, T., Yang, L., Jin, Y., Duan, Y. (2023). Screening and the ability of biogenic amine-degrading strains from traditional meat products in Inner Mongolia. *LWT – Food Science and Technology*, 176, 114533. DOI: 10.1016/j.lwt.2023.114533

Sun, X., Sun, E., Sun, L., Su, L., Jin, Y., Ren, L., Zhao, L. (2022). Effect of Biogenic Amine-Degrading *Lactobacillus* on the Biogenic Amines and Quality in Fermented Lamb Jerky. *Foods* 2022, 11, 2057. DOI: 10.3390/foods11142057

Suzzi, G., Gardini, F. (2003). Biogenic amines in dry fermented sausages: A review. *International Journal of Food Microbiology*, 88, 41-54. DOI: 10.1016/s0168-1605(03)00080-1

Suzuki, S., Hata, H., Takama, K. (1991). Ornithine decarboxylase activities of a *Shewanella putrefaciens* which produces only diamines. *Letters in Applied Microbiology*, 12, 113-116. DOI: 10.1111/j.1472-765X.1991.tb00518.x

Świder, O., Roszko, M. L., Wójcicki, M., Szymczyk, K. (2020). Biogenic amines and free amino acids in traditional fermented vegetables-dietary risk evaluation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68, 856-868. DOI:10.1021/acs.jafc.9b05625

Šmarda, J., Doškař, J., Pantůček, R., Růžicková, V. (2005). *Metody molekulární biologie*, 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita, 188 s. ISBN 978-80-210-3841-7.

Tabanelli, G., Montanari, C., Bargossi, E., Lanciotti, R., Gatto, V., Felis, G., Torriani, S., Gardini, F. (2014). Control of tyramine and histamine accumulation by lactic acid bacteria using bacteriocin forming lactococci. *International Journal of Food Microbiology*, 190, 14-23. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2014.08.023

Takahashi, H., Ogai, M., Miya, S., Kuda, T., Kimura, B. (2015). Effects of environmental factors on histamine production in the psychrophilic histamine-producing bacterium *Photobacterium iliopiscarium*. *Food Control*, 52, 39-42. DOI: 10.1016/j.foodcont.2014.12.023

Tameem, A. A., Saad, A., Makahleh, A., Salhin, A., Saleh, M. I. (2010). A 4-hydroxy-*N'*-[(*E*)-(2-hydroxyphenyl)methylidene]benzohydrazide-based sorbent material for the

extraction-HPLC determination of biogenic amines in food samples. *Talanta*, 82, 1385-1391. DOI: 10.1016/j.talanta.2010.07.004

Tapingkae, W., Tanasupawat, S., Parkin, K. L., Benjakul, S., Visessanguan, W. (2010). Degradation of histamine by extremely halophilic archaea isolated from high salt-fermented fishery products. *Enzyme and Microbial Technology*, 46, 92-99. DOI: 10.1016/j.enzmictec.2009.10.011

Tawfik, N. F., Shalaby, A. R., Effat, B. A. (1992). Biogenic amine contents of ras cheese and incidence of their bacterial producers. *Egyptian Journal of Dairy Science*, 20, 219-225.

Taylor, S. L.; Speckhard, M. W. (1983). Isolation of histamine producing bacteria from frozen tuna. *Marine Fisheries Review*, 45, 35-39.

ten Brink, B., Damink, C., Joosten, H. M., Huis in't Veld, J. H. (1990). Occurrence and formation of biologically active amines in foods. *International Journal of Food Microbiology*, 11, 73-84. DOI: 10.1016/0168-1605(90)90040-C

Tepkasikul, P., Santiyanont, P., Boocharoen, A., Abhisingha, M., Mhuantong, W., Chantarasakha, K., Pitaksutheepong, C., Visessanguan, W., Tapaamorndech, S. (2022). The functional starter and its genomic insight for histamine degradation in fish sauce. *Food Microbiology*, 104, 103988. DOI: 10.1016/j.fm.2022.103988

Thayer, D. W. (1994). Wholesomeness of irradiated foods. *Food Technology*, 48, 132-136. DOI:10.1111/j.1745-4565.1985.tb00502.x

Tittarelli, F., Perpetuini, G., Di Gianvito, P., Tofalo, R. (2019). Biogenic amines producing and degrading bacteria: A snapshot from raw ewes' cheese. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*, 101, 1-9. DOI: 10.1016/j.lwt.2018.11.030

Tosukhowong, A., Visessanguan, W., Pumpuang, L., Tepkasikul, P., Panya, A., Valyasevi, R. (2001). Biogenic amine formation in Nham a Thai fermented sausage and the reduction by commercial starter culture *Lactobacillus plantarum* BCC 9546, *Food Chemistry*, 129, 846-853. DOI: 10.1016/j.foodchem.2011.05.033

Vasconcelos, H., de Almeida, J. M. M. M., Matias, A., Saraiva, C., Jorge, P. A. S., Coelho, L. C. C. (2021). Detection of biogenic amines in several foods with different sample treatments: An overview. *Trends in Food Science & Technology*, 113, 86-96. DOI: 10.1016/j.tifs.2021.04.043

Vidal-Carou, M. C., Veciana-Nogués, M. T., Latorre-Moratala, M. L. (2007). *Biogenic Amines: Risks and Control*. s. 455-468. In: TOLDRÁ, F.: Handbook of Fermented Meat and Poultry. USA: Blackwell Publishing, 576 s. ISBN 978-0-8138-1477-3.

Vlasova, N. N., Markitan, O. V., Golovkova, L. P. (2011). Adsorption of biogenic amines on albumin-modified silica surface. *Colloid Journal*, 73, 24-27. DOI:10.1134/S1061933X1006102X

Voigt, M. N., Eitenmiller, R. R., Koeliler, P. E., Handy, M. K. (1974). Tyramine, histamine, and tryptamine content of cheese. *Journal of Milk and Food Technology*, 37, 377-388. DOI: 10.4315/0022-2747-37.7.377

Voigt, M. N., Eitenmiller, R. R. (1978). Role of histidine and tyrosine decarboxylases and mono-diamine oxidases in amine on build-up in cheese. *Journal of Food Protection*, 41, 182-186. DOI: 10.4315/0362-028X-41.3.182

Wallace, H. M., Caslake, R. (2001). Polyamines and colon cancer. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology*, 13, 1033-1039. DOI: 10.1097/00042737-200109000-00006

Wang, X.; Zhao, Y.; Zhang, S.; Lin, X.; Liang, H.; Chen, Y.; Ji, C. (2022). Heterologous Expression of the *Lactobacillus sakei* Multiple Copper Oxidase to Degrade Histamine and Tyramine at Different Environmental Conditions. *Foods*, 11, 3306. DOI: 10.3390/foods11203306

Wantke, F., Gotz, M., Jarisch, R. (1993). Histamine-free diet: treatment of choice for histamine-induced food intolerance and supporting treatment for chronic headaches. *Clinical and Experimental Allergy*, 23, 982–985. DOI: 10.1111/j.1365-2222.1993.tb00287.x

WHO (1991). Food Irradiation – A technique for preserving and improving the safety of Food. Geneva: World Health Organization.

WHO (1994). Safety and nutritional adequacy of irradiated food. Geneva: World Health Organization.

WHO (2015). Questions and Answers on the carcinogenicity of the consumption of red meat and processed meat. Geneva: World Health Organization.

Wojcik, W.; Lukasiewicz, M.; Puppel, K. (2020). Biogenic amines: Formation, action and toxicity-a review. *Journal of Science Food Agriculture*, 101, 2634–2640. DOI: 10.1002/jsfa.10928

Wolken, W. A., Lucas, P. M., Lonvaud-Funel, A., Lolkema, J. S. (2006). The mechanism of the tyrosine transporter TyrP supports a proton motive tyrosine decarboxylation pathway in *Lactobacillus brevis*. *Journal of Bacteriology*. 188, 2198–2206. DOI: 10.1128/JB.188.6.2198-2206.2006

Wolkers-Rooijackers, J. C. M., Thomas, S. M., Nout, M. J. R. (2013). Effects of sodium reduction scenarios on fermentation and quality of sauerkraut. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*. 54, 383-388. DOI: 10.1016/j.lwt.2013.07.002

Xia, X., Luo, Y, Zhang, Q., Huang, Y., Zhang, B. (2018). Mixed starter culture regulates biogenic amines formation via decarboxylation and transamination during Chinese rice wine fermentation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66, 6348-6356. DOI:10.1021/acs.jafc.8b01134

Xie, S., Li, Z. Zhang, B. S. Y. (2022). Impact of salt concentration on bacterial diversity and changes in biogenic amines during fermentation of farmhouse soybean paste in

Northeast China. *Current Research in Food Science*, 5, 1225-1234. DOI: 10.1016/j.crfs.2022.07.012

Yagodina, O. V., Nikol'skaya, E. B., Khovanskikh, A. E., Kormilitsyn, B. N. (2002). Amine oxidases of microorganisms. *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology*, 38, 251-258. DOI: 10.1023/A:1020714607203

Yamada, H., Adachi, O., Ogata, K. (1965). Amine oxidases of microorganisms: part I. Formation of amine oxidase by fungi. *Bioscience Biotechnology, and Biochemistry*, 29, 117-123. DOI: 10.1271/bbb1961.29.117

Yang, Y., Niu, C., Shan, W., Zheng, F., Liu, C., Wang, J., Li, Q. (2021). Physicochemical, flavor and microbial dynamic changes during low-salt doubanjiang (broad bean paste) fermentation. *Food Chemistry*, 351, 128454. DOI: 10.1016/j.foodchem.2020.128454

Yen, G. C. (1986). Studies on biogenic amines in foods. I. Determination of biogenic amines in fermented soybean foods by HPLC. *Journal of Chinese Agricultural Chemical Society*, 24, 211-217.

Ying, X., Yu, L., Binghong, X., Dongfeng, W., Wei J. (2016). Characterisation and application of *Halomonas shantousis* SWA25, a halotolerant bacterium with multiple biogenic amine degradation activity, *Food Additives & Contaminants: Part A*, 33, 674-682. DOI: 10.1080/19440049.2016.1147086

Yongmei, L., Xiaohong, C., Mei, J., Xin, L., Rahman, N., Mingsheng, D., Yan, G. (2009). Biogenic amines in Chinese soy sauce. *Food Control*, 20, 593-597. DOI: 10.1016/j.foodcont.2008.08.020

Yoshida, A., Nakamura, A. (1982). Quantitation of histamine in fishes and fishes products by high performance liquid chromatography. *Journal of the Food Hygienic Society of Japan*. 23, 339-343. DOI: 10.3358/shokueishi.23.339

Yu, M. C., Yuan, J. M. (2002). Epidemiology of nasopharyngeal carcinoma. *Seminars in Cancer Biology*, 12, 421-429. DOI: 10.1016/s1044579x02000858

Yücel, Ü., Üren, A. (2008). Biogenic amines in Turkish type pickled cabbage: Effects of salt and citric acid concentration. *Acta Alimentaria*, 37, 115-122. DOI: 10.1556/AAlim.2007.0022

Zaman, M. Z., Bakar, F. A., Selamat, J., and Bakar, J. (2010). Occurrence of biogenic amines and amines degrading bacteria in fish sauce. *Czech Journal of Food Sciences*, 28, 440-449. DOI: 10.17221/312/2009-CJFS

Zaman, M. Z., Bakar, F. A., Jinap, S., Bakar, J. (2011). Novel starter cultures to inhibit biogenic amines accumulation during fish sauce fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 145, 84-91. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2010.11.031



Zaman, M. Z., Bakar, F. A., Selamat, J., Bakar, J., Ang, S. S., Chong, C. Y. (2014). Degradation of histamine by the halotolerant *Staphylococcus carnosus* FS19 isolate obtained from fish sauce. *Food Control*, 40, 58-63. DOI: 10.1016/j.foodcont.2013.11.031

Zee, J. A., Simard, R. E. (1981). Biogenic amines in Canadian, American, and European beers. *Canadian Institute of Food Science and Technology Journal*, 14, 119-120. DOI: 10.1016/S0315-5463(81)72722-6

Zeng, J., Wu, J., Chen, H., Ni, S. (2021). Review on biological degradation of biogenic amines in food. *Journal of Agricultural Science and Food Technology*, 7, 331-334. DOI: 10.17352/2455-815X.000127

Zhao, X., Yyng, L., Yu, Z., Peng, N., Xiao, L., Yin, D., Qin, B. (2008). Characterization of depth-related microbial communities in lake sediment by denaturing gradient gel electrophoresis of amplified 16S rRNA fragments. *Journal of Environmental Sciences*, 20, 224-230. DOI: 10.1016/s1001-0742(08)60035-2

Zheng, J., Wittouck, S., Salvetti, E., Franz, C. M. A. P., Harris, H. M. B., Mattarelli, P., O'Toole, P., Pot, B., Vandamme, P., Walter, J., Watanabe, K., Wuyts, S., Felis, G. E., Gänzle, M. G., Lebeer, S. (2020). A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*. *International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology*, 70, 2782-2858. DOI: 10.1099/ijsem.0.004107

## SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AMK	aminokyselina/y
BA	biogenní amin/y
BLAST	The Basic Local Alignment Search Tool
BMK	bakterie mléčného kvašení
DAO	diaminoxidáza/y
DNA	deoxyribonucleic acid (deoxyribonukleová kyselina)
HIM	histamin
HPLC	high-performance liquid chromatography (vysokoúčinná kapalinová chromatografie)
KAD	kadaverin
MALDI-TOF MS	Matrix Assisted Laser Desorp-tion/Ionization Time of Flight mass spectrometry (hmotnostní spektrometrie s laserovou desorpcí a ionizací za účasti matrice s průletovým analyzátozem)
MAO	monoaminoxidáza/y
PCR	polymerase chain reaction (polymerázová řetězová reakce)
PEA	phenylethylamin (fenylethylamin)
PLP	pyridoxal-5-fosfát
PUT	putrescin
TRY	tryptamin
TYM	tyramin

# SEZNAM TABULEK A OBRÁZKŮ

## Seznam tabulek

Tab. 1:	Charakteristika hlavních biogenních aminů.....	9
Tab. 2:	Biogenní aminy a jejich fyziologické a farmakologické účinky na organismus.....	14
Tab. 3:	Koncentrace BA v různých potravinách.....	19
Tab. 4:	Bakterie a biogenní aminy nalezené a izolované z různých potravin..	20
Tab. 5:	Mikroorganismy degradující BA.....	38
Tab. 6:	Seznam potravin a nápojů, u nichž se prováděl skrining na přítomnost mikroorganismů degradujících biogenní aminy .....	48
Tab. 7:	Podmínky PCR.....	50
Tab. 8:	Odběrové časy pro jednotlivé teploty kultivace kmene <i>B. subtilis</i> IB23.....	51
Tab. 9:	Odběrové časy pro jednotlivé teploty kultivace kmenů <i>B. subtilis</i> IB23 a <i>B. pumilus</i> IB26.....	52
Tab. 10:	Sledované vnější faktory při kultivaci kmenů <i>B. subtilis</i> IB23 a <i>B. pumilus</i> IB26.....	52
Tab. 11:	Gradientový eluční program pro HPLC.....	53
Tab. 12:	Výsledky identifikace izolovaných mikroorganismů získané metodou MALDI-TOF MS.....	55
Tab. 13:	Relativní pokles koncentrace biogenních aminů (rel. %) v čase u vybraných testovaných mikroorganismů.....	57

## Seznam obrázků

Obr. 1:	Struktura biogenních aminů a jejich prekurzory.....	11
Obr. 2:	Syntéza BA a jejich transport přes buněčnou membránu.....	12
Obr. 3:	Cesta přijatých biogenních aminů v intestinálním traktu člověka.....	13
Obr. 4:	Nitrosační proces u putrescinu, kadaverinu a tyraminu.....	18
Obr. 5:	Princip ELISA.....	37
Obr. 6:	Degradace kadaverinu kmenem <i>B. subtilis</i> IB23 v minerálním médiu za aerobních podmínek; A – pH 5, B – pH 6, C – pH 7, D – pH 8.....	60
Obr. 7:	Degradace kadaverinu kmenem <i>B. subtilis</i> IB23 v minerálním médiu za anaerobních podmínek; A – pH 5, B – pH 6, C – pH 7, D – pH 8....	61
Obr. 8:	Degradace fenylethylaminu kmenem <i>B. subtilis</i> IB23 v minerálním médiu za aerobních podmínek; A – pH 5, B – pH 6, C – pH 7, D – pH 8.....	62

- Obr. 9: *Degradace fenylethylaminu kmenem B. subtilis IB23 v minerálním médiu za anaerobních podmínek; A – pH 5, B – pH 6, C – pH 7, D – pH 8.....63*
- Obr. 10: *Degradace putrescinu kmenem B. subtilis IB23 v minerálním médiu za aerobních podmínek; A – pH 5, B – pH 6, C – pH 7, D – pH 8.....64*
- Obr. 11: *Degradace putrescinu kmenem B. subtilis IB23 v minerálním médiu za anaerobních podmínek; A – pH 5, B – pH 6, C – pH 7, D – pH 8.....64*
- Obr. 12: *Degradace histaminu kmenem B. subtilis IB23 v minerálním médiu za aerobních podmínek; A – pH 5, B – pH 6, C – pH 7, D – pH 8.....65*
- Obr. 13: *Degradace histaminu kmenem B. subtilis IB23 v minerálním médiu za anaerobních podmínek; A – pH 5, B – pH 6, C – pH 7, D – pH 8.....66*
- Obr. 14: *Degradace tyraminu kmenem B. subtilis IB23 v minerálním médiu za aerobních podmínek; A – pH 5, B – pH 6, C – pH 7, D – pH 8.....67*
- Obr. 15: *Degradace tyraminu kmenem B. subtilis za IB23 v minerálním médiu anaerobních podmínek; A – pH 5, B – pH 6, C – pH 7, D – pH 8.....67*
- Obr. 16: *Degradace tryptaminu kmenem B. subtilis IB23 v minerálním médiu bez přídavku soli a s 1 % NaCl; A, B – pH 5; C, D – pH 7; E, F – pH 8; A, C, E – 0 % NaCl; B, D, F – 1 % NaCl.....70*
- Obr. 17: *Degradace tryptaminu kmenem B. subtilis IB23 v minerálním médiu s 2 a 3 % NaCl; A, B – pH 5; C, D – pH 7; E, F – pH 8; A, C, E – 2 % NaCl; B, D, F – 3 % NaCl.....71*
- Obr. 18: *Degradace tryptaminu kmenem B. subtilis IB23 v nutrient broth; A – 0 % NaCl, B – 2 % NaCl.....71*
- Obr. 19: *Degradace fenylethylaminu kmenem B. subtilis IB23 v minerálním médiu bez přídavku soli a s 1 % NaCl; A, B – pH 5; C, D – pH 7; E, F – pH 8; A, C, E – 0 % NaCl; B, D, F – 1 % NaCl.....72*
- Obr. 20: *Degradace fenylethylaminu kmenem B. subtilis IB23 v minerálním médiu s 2 a 3 % NaCl; A, B – pH 5; C, D – pH 7; E, F – pH 8; A, C, E – 2 % NaCl; B, D, F – 3 % NaCl.....73*
- Obr. 21: *Degradace fenylethylaminu kmenem B. subtilis IB23 v nutrient broth; A – 0 % NaCl, B – 2 % NaCl.....74*
- Obr. 22: *Degradace putrescinu kmenem B. subtilis IB23 v minerálním médiu bez přídavku soli a s 1 % NaCl; A, B – pH 5; C, D – pH 7; E, F – pH 8; A, C, E – 0 % NaCl; B, D, F – 1 % NaCl.....75*
- Obr. 23: *Degradace putrescinu kmenem B. subtilis IB23 v minerálním médiu s 2 a 3 % NaCl; A, B – pH 5; C, D – pH 7; E, F – pH 8; A, C, E – 2 % NaCl; B, D, F – 3 % NaCl.....76*
- Obr. 24: *Degradace putrescinu kmenem B. subtilis IB23 v nutrient broth; A – 0 % NaCl, B – 2 % NaCl.....76*
- Obr. 25: *Degradace kadaverinu kmenem B. subtilis IB23 v minerálním médiu bez přídavku soli a s 1 % NaCl; A, B – pH 5; C, D – pH 7; E, F – pH 8; A, C, E – 0 % NaCl; B, D, F – 1 % NaCl.....77*

Obr. 26:	Degradace kadaverinu kmenem <i>B. subtilis</i> IB23 v minerálním médiu s 2 a 3 % NaCl; A, B – pH 5; C, D – pH 7; E, F – pH 8; A, C, E – 2 % NaCl; B, D, F – 3 % NaCl.....	78
Obr. 27:	Degradace kadaverinu kmenem <i>B. subtilis</i> IB23 v nutrient broth; A – 0 % NaCl, B – 2 % NaCl.....	79
Obr. 28:	Degradace histaminu kmenem <i>B. subtilis</i> IB23 v minerálním médiu bez přídavku soli a s 1 % NaCl; A, B – pH 5; C, D – pH 7; E, F – pH 8; A, C, E – 0 % NaCl; B, D, F – 1 % NaCl.....	80
Obr. 29:	Degradace histaminu kmenem <i>B. subtilis</i> IB23 v minerálním médiu s 2 a 3 % NaCl; A, B – pH 5; C, D – pH 7; E, F – pH 8; A, C, E – 2 % NaCl; B, D, F – 3 % NaCl.....	81
Obr. 30:	Degradace histaminu kmenem <i>B. subtilis</i> IB23 v nutrient broth; A – 0 % NaCl, B – 2 % NaCl.....	81
Obr. 31:	Degradace tyraminu kmenem <i>B. subtilis</i> IB23 v minerálním médiu bez přídavku soli a s 1 % NaCl; A, B – pH 5; C, D – pH 7; E, F – pH 8; A, C, E – 0 % NaCl; B, D, F – 1 % NaCl.....	83
Obr. 32:	Degradace tyraminu kmenem <i>B. subtilis</i> IB23 v minerálním médiu s 2 a 3 % NaCl; A, B – pH 5; C, D – pH 7; E, F – pH 8; A, C, E – 2 % NaCl; B, D, F – 3 % NaCl.....	84
Obr. 33:	Degradace tyraminu kmenem <i>B. subtilis</i> IB23 v nutrient broth; A – 0 % NaCl, B – 2 % NaCl.....	84
Obr. 34:	Degradace tryptaminu kmenem <i>B. pumilus</i> IB26 v minerálním médiu bez přídavku soli a s 1 % NaCl; A, B – pH 5; C, D – pH 7; E, F – pH 8; A, C, E – 0 % NaCl; B, D, F – 1 % NaCl.....	87
Obr. 35:	Degradace tryptaminu kmenem <i>B. pumilus</i> IB26 v minerálním médiu s 2 a 3 % NaCl; A, B – pH 5; C, D – pH 7; E, F – pH 8; A, C, E – 2 % NaCl; B, D, F – 3 % NaCl.....	88
Obr. 36:	Degradace tryptaminu kmenem <i>B. pumilus</i> IB26 v nutrient broth; A – 0 % NaCl, B – 2 % NaCl.....	88
Obr. 37:	Degradace fenylethylaminu kmenem <i>B. pumilus</i> IB26 v minerálním médiu bez přídavku soli a s 1 % NaCl; A, B – pH 5; C, D – pH 7; E, F – pH 8; A, C, E – 0 % NaCl; B, D, F – 1 % NaCl.....	90
Obr. 38:	Degradace fenylethylaminu kmenem <i>B. pumilus</i> IB26 v minerálním médiu s 2 a 3 % NaCl; A, B – pH 5; C, D – pH 7; E, F – pH 8; A, C, E – 2 % NaCl; B, D, F – 3 % NaCl.....	91
Obr. 39:	Degradace fenylethylaminu kmenem <i>B. pumilus</i> IB26 v nutrient broth; A – 0 % NaCl, B – 2 % NaCl.....	91
Obr. 40:	Degradace putrescinu kmenem <i>B. pumilus</i> IB26 v minerálním médiu bez přídavku soli a s 1 % NaCl; A, B – pH 5; C, D – pH 7; E, F – pH 8; A, C, E – 0 % NaCl; B, D, F – 1 % NaCl.....	93
Obr. 41:	Degradace putrescinu kmenem <i>B. pumilus</i> IB26 v minerálním médiu s 2 a 3 % NaCl; A, B – pH 5; C, D – pH 7; E, F – pH 8; A, C, E – 2 % NaCl; B, D, F – 3 % NaCl.....	94

Obr. 42: Degradace putrescinu kmenem <i>B. pumilus</i> IB26 v nutrient broth; A – 0 % NaCl, B – 2 % NaCl.....	94
Obr. 43: Degradace kadaverinu kmenem <i>B. pumilus</i> IB26 v minerálním médiu bez přídavku soli a s 1 % NaCl; A, B – pH 5; C, D – pH 7; E, F – pH 8; A, C, E – 0 % NaCl; B, D, F – 1 % NaCl.....	95
Obr. 44: Degradace kadaverinu kmenem <i>B. pumilus</i> IB26 v minerálním médiu s 2 a 3 % NaCl; A, B – pH 5; C, D – pH 7; E, F – pH 8; A, C, E – 2 % NaCl; B, D, F – 3 % NaCl.....	96
Obr. 45: Degradace kadaverinu kmenem <i>B. pumilus</i> IB26 v nutrient broth; A – 0 % NaCl, B – 2 % NaCl.....	97
Obr. 46: Degradace histaminu kmenem <i>B. pumilus</i> IB26 v minerálním médiu bez přídavku soli a s 1 % NaCl; A, B – pH 5; C, D – pH 7; E, F – pH 8; A, C, E – 0 % NaCl; B, D, F – 1 % NaCl.....	98
Obr. 47: Degradace histaminu kmenem <i>B. pumilus</i> IB26 v minerálním médiu s 2 a 3 % NaCl; A, B – pH 5; C, D – pH 7; E, F – pH 8; A, C, E – 2 % NaCl; B, D, F – 3 % NaCl.....	99
Obr. 48: Degradace histaminu kmenem <i>B. pumilus</i> IB26 v nutrient broth; A – 0 % NaCl, B – 2 % NaCl.....	99
Obr. 49: Degradace tyraminu kmenem <i>B. pumilus</i> IB26 v minerálním médiu bez přídavku soli a s 1 % NaCl; A, B – pH 5; C, D – pH 7; E, F – pH 8; A, C, E – 0 % NaCl; B, D, F – 1 % NaCl.....	101
Obr. 50: Degradace tyraminu kmenem <i>B. pumilus</i> IB26 v minerálním médiu s 2 a 3 % NaCl; A, B – pH 5; C, D – pH 7; E, F – pH 8; A, C, E – 2 % NaCl; B, D, F – 3 % NaCl.....	102
Obr. 51: Degradace tyraminu kmenem <i>B. pumilus</i> IB26 v nutrient broth; A – 0 % NaCl, B – 2 % NaCl.....	103

# CURRICULUM VITAE

## Osobní údaje

---

**Jméno a příjmení:** Mgr. Irena Butor  
**Datum narození:** 14. 02. 1990  
**Kontaktní adresa:** Mláďí 1563, Vsetín 755 01  
**E-mail:** butor.irena@gmail.com

## Dosažené vzdělání

---

- 2014 – dosud** Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta technologická  
– doktorské studium v oboru Technologie potravin,  
téma doktorské práce: Studium degradace biogenních aminů
- 2012 – 2014** Masarykova univerzita, Brno, Fakulta přírodovědecká  
– navazující magisterské studium v oboru Speciální biologie,  
směr Mikrobiologie a molekulární biotechnologie
- 2009 – 2012** Masarykova univerzita, Brno, Fakulta přírodovědecká  
– bakalářské studium v oboru Obecná biologie,  
směr Mikrobiologie

## Znalosti

---

**Jazykové znalosti:** Angličtina – dosažená úroveň B2  
**Počítačové znalosti:** MS Windows, Internet, MS Office - pokročilý uživatel  
**Řidičský průkaz:** sk. B

## Odborná příprava a zkušenosti

---

Účast na grantových projektech

2017 GAČR No. 17-09594S – Redukce obsahu biogenních aminů v modelových systémech

IGA/FT/2017/003

Možnosti snížení výskytu nežádoucích látek v potravinách a v životním prostředí

IGA/FT/2016/012

Výzkum procesů ovlivňujících kvalitu potravin a stav životního prostředí

IGA/FT/2015/005

Pokročilé chemické a biochemické metody v ochraně životního prostředí

IGA/FT/2014/013

Nepříznivé látky a faktory v životním prostředí a v potravinách

## SEZNAM PUBLIKACÍ

Butor, I., Jančová, P., Purevdorj, K., Klementová, L., Kluz, M., Huňová, I., Pištěková, H., Buňka, F., Buňková, L. (2023). Effect of Selected Factors Influencing Biogenic Amines Degradation by *Bacillus subtilis* Isolated from Food. *Microorganisms*, 11, 1091. DOI: 10.3390/microorganisms11041091

Klementová, L., Butor, I., Jančová, P., Bábková, D., Buňka, F., Buňková, L. (2023). Reduction of histamine, putrescine and cadaverine by the bacteria *Lactocaseibacillus casei* depending on selected factors in the real condition of the dairy product. odesláno do redakce *Food Microbiology*

Pachlová, V., Buňková, L., Flasarová, R., Salek, R. N., Dlabajová, A., Butor, I., Buňka, F. (2018). Biogenic amine production by nonstarter strains of *Lactobacillus curvatus* and *Lactobacillus paracasei* in the model system of Dutch-type cheese. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*, 97, 230-235. DOI: 10.1016/j.lwt.2018.07.045.

Pleva, P., Cabáková, V., Butor, I., Pachlová, V., Buňková, L. (2018). Biogenic amines content in the fermented Asian food in the Czech Republic. *Potravinářstvo*, 12, 292-298. DOI: 10.5219/896.

Butor, I., Pištěková, H., Purevdorj, K., Jančová, P., Buňka, F., Buňková, L. (2017). Biogenic amines degradation by microorganisms isolated from cheese. *Potravinářstvo*, 11, 302-308. DOI: 10.5219/736.