



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Disertační práce

**Studium degradace biogenních aminů
v potravinách v závislosti na vybraných
technologických parametrech**

**Study of biogenic amines degradation in foodstuffs depending
on selected technological parameters**

Autor: Mgr. Lucie Klementová (roz. Berčíková)

Studijní program: P2901 Chemie a technologie potravin

Studijní obor: 2901V013 Technologie potravin

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

Konzultant: Mgr. Petra Jančová, Ph.D.

Zlín, leden 2024

Klíčová slova: *degradace biogenních aminů, bakterie mléčného kvašení, Lacticaseibacillus casei, HPLC*

Key words: *degradation of biogenic amines, lactic acid bacteria, Lacticaseibacillus casei, HPLC*

Poděkování:

Ráda bych poděkovala své školitelce prof. RNDr. Leoně Buňkové, Ph.D. za její odborné vedení, cenné rady, lidský přístup, podporu a veškerý čas, který mi věnovala během doktorského studia. Rovněž bych chtěla také poděkovat své konzultantce Mgr. Petře Jančové, Ph.D. a Ing. Khatantuul Purevdorj, Ph.D. za ochotu, pomoc a užitečné rady. Panu prof. Ing. Františku Buňkovi, Ph.D. bych chtěla poděkovat za pomoc při statistickém vyhodnocení výsledků a také za velmi užitečné rady při sepisování publikace a této práce.

Dále chci poděkovat celému kolektivu, kolegům a přátelům z Ústavu inženýrství ochrany životního prostředí FT UTB ve Zlíně za vytvoření pozitivního pracovního prostředí.

V neposlední řadě velké poděkování patří také mé rodině za neutichající podporu, motivaci a sílu v plnění si svých snů.

Tato práce vznikla za podpory interních grantů Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně (IGA/FT/2019/011, IGA/FT/2020/009, IGA/FT/2021/009, NAZV QK1710156).

ABSTRAKT

Předložená disertační práce se zabývá studiem degradace biogenních aminů v potravinách v závislosti na vybraných technologických parametrech. Hlavním cílem práce bylo zjistit a zmapovat, jak kombinace různých technologických parametrů ovlivňuje schopnost kmene *Lactocaseibacillus casei* CCDM 198 degradovat biogenní aminy jak za *in vitro* podmínek, tak v reálné potravine – v mléce. Pro tyto účely bylo sledováno 5 biogenních aminů, které se nejčastěji vyskytují v potravinách, a to konkrétně histamin, fenylethylamin, tyramin, putrescin a kadaverin. Jejich množství, respektive úbytek, bylo následně ve vzorcích kultivovaných s *Lactocaseibacillus casei* CCDM 198 za různých podmínek analyzováno pomocí HPLC/DAD po předchozí derivatizaci dansylchloridem. Dále bylo cílem práce dokázat přítomnost a aktivitu enzymu multicopperoxidázy u studovaného kmene a popsat případné změny v enzymatické aktivitě v závislosti na době kultivace.

Získané výsledky potvrzují schopnost kmene *Lactocaseibacillus casei* CCDM 198 odbourávat všechny studované biogenní aminy *in vitro* i v mléce. Zároveň byla zjištěna rozdílná schopnost bakterie *Lactocaseibacillus casei* CCDM 198 degradovat jednotlivé aminy při stejných technologických podmínkách v obou matricích (v médiu i v mléce). Maximální redukce jednotlivých biogenních aminů za studovaných kombinací podmínek ve srovnání s počáteční koncentrací na začátku kultivace (v čase 0) byla: úbytek histaminu o více než 70 % v bujónu a o 39 % v mléce, tyraminu o 69 % v bujónu a o 19 % v mléce, putrescinu o 67 % *in vitro* a o 48 % v mléce, kadaverinu o 73 % v bujónu a o 40 % v mléce, fenylethylaminu o 55 % *in vitro* a 32 % v mléce. U studovaného kmene byla také prokázána přítomnost enzymu multicopperoxidázy (MCO). Ke stanovení byly použity dvě metody (spektrofotometrické stanovení aktivity a detekce aktivity v nativním gelu) a dva substráty. Získané výsledky dokazují přítomnost a aktivitu MCO, subtypu lakázy, u *Lactocaseibacillus casei* CCDM 198. Kromě toho byla také zjištěna změna aktivity v závislosti na době kultivace. Nejvyšší enzymatická aktivita byla zjištěna po 48 hodinách kultivace, kdy byl zaznamenán nárůst aktivity o více než polovinu ve srovnání s počátečním časem.

ABSTRACT

This dissertation is focused on the study of the degradation of biogenic amines in food depending on selected technological parameters. The main aim of the current work is to find out how the combination of technological parameters affects the ability of the strain *Lacticaseibacillus casei* CCDM 198 to reduce biogenic amines *in vitro* and in a real food system – skimmed milk. For these purposes 5 biogenic amines that are most often found in food were chosen, namely histamine, phenylethylamine, tyramine, putrescine and cadaverine. The decrease of individual BAs over time was determined by HPLC/DAD after derivatization with dansylchloride. Furthermore, another aim of the work was to prove the presence of the multicopper oxidase enzyme in the studied strain and to describe possible changes in the enzymatic activity depending on the time of cultivation.

The obtained results confirm the ability of the strain *Lacticaseibacillus casei* CCDM 198 to degrade all studied biogenic amines in the culture medium and in milk. Moreover, a different ability of the strain *Lacticaseibacillus casei* CCDM 198 to degrade individual biogenic amines was found under the same technological conditions in both matrices. The maximum reduction of individual biogenic amines under the studied combinations compared to the initial concentration at time 0 was: histamine decrease by more than 70% in medium and by 39% in milk, tyramine by 69% in medium and by 19% in milk, putrescine by 67% in medium and by 48% in milk, cadaverine by 73% in medium and by 40% in milk, phenylethylamine by 55% in medium and 32% in milk. The presence of the multicopper oxidase enzyme (MCO) in the studied strain was also demonstrated. Two methods and two substrates were used to determine this enzyme activity. The obtained results prove the presence and activity of MCO, a laccase subtype, in *Lacticaseibacillus casei* CCDM 198. In addition, a change in activity depending on the time of cultivation was also detected. The highest enzymatic activity was found after 48 hours of cultivation, when an increase in activity by more than half compared to the initial time was recorded.

OBSAH

1.	SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	11
1.1	BIOGENNÍ AMINY – CHARAKTERISTIKA A ROZDĚLENÍ.....	11
1.2	VZNIK A FYZIOLOGICKÁ ROLE BIOGENNÍCH AMINŮ	12
1.3	DETOXIFIKAČNÍ SYSTÉM.....	13
1.4	TOXICITA BIOGENNÍCH AMINŮ.....	14
1.4.1	HISTAMIN	14
1.4.2	TYRAMIN.....	15
1.4.3	SEKUNDÁRNÍ BIOGENNÍ AMINY	16
1.5	BIOGENNÍ AMINY V POTRAVINÁCH.....	17
1.6	INDEX KVALITY.....	18
1.7	POTRAVINY S VYŠŠÍM OBSAHEM BIOGENNÍCH AMINŮ	19
1.7.1	RYBY A MOŘSKÉ PLODY	19
1.7.2	MLÉČNÉ PRODUKTY	20
1.7.3	MASO A FERMENTOVANÉ MASNÉ PRODUKTY.....	21
1.7.4	ALKOHOLICKÉ NÁPOJE	22
1.8	DETEKCE BIOGENNÍCH AMINŮ	23
1.8.1	VYSOKOÚČINNÁ KAPALINOVÁ CHROMATOGRRAFIE	23
1.9	FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ TVORBU BIOGENNÍCH AMINŮ	25
1.9.1	VOLNÉ AMINOKYSELINY	25
1.9.2	MIKROORGANISMY S DEKARBOXYLÁZOVOU AKTIVITOU.....	26
1.9.3	PODMÍNKY PRO RŮST MIKROORGANISMŮ	27
1.10	MIKROORGANISMY SE SCHOPNOSTÍ DEGRADOVAT AMINY	29
1.10.1	BAKTERIE MLÉČNÉHO KVAŠENÍ.....	30
1.11	ENZYMY PODÍLEJÍCÍ SE NA ODBOURÁVÁNÍ BA U BAKTERIÍ	31
1.11.1	AMINOXIDÁZY	32
1.11.2	LAKÁZY (MULTICOPPEROXIDÁZY).....	33
2.	MATERIÁL A PŘÍSTROJE	35
2.1	PŘÍSTROJE A VYBAVENÍ.....	35
2.2	MIKROORGANISMUS	35
2.3	KULTIVAČNÍ MÉDIA A ROZTOKY	36
2.3.1	KULTIVAČNÍ MÉDIUM	36
2.3.2	ROZTOK BIOGENNÍCH AMINŮ.....	36

2.3.3	PŘÍPRAVA ZÁSOBNÍHO ROZTOKU CYSTEINU	37
2.3.4	FYZIOLOGICKÝ ROZTOK	37
2.3.5	ROZTOKY PRO DERIVATIZACI DANSYLCHLORIDEM	37
2.3.6	ROZTOKY PRO EXTRAKCI ENZYMU	38
2.3.7	ROZTOKY PRO STANOVENÍ AKTIVITY SPEKTROFOTOMETRICKY	38
2.3.8	ROZTOK PRO STANOVENÍ KONCENTRACE PROTEINŮ METODOU BRADFORDOVÉ	38
2.3.9	ROZTOKY PRO NATIVNÍ ELEKTROFORÉZU A DETEKCI ENZYMU.....	38
3.	METODIKA	40
3.1	EXPERIMENT I – VLIV VYBRANÝCH FAKTORŮ NA REDUKČNÍ SCHOPNOST <i>LACTICASEIBACILLUS CASEI IN VITRO</i>	40
3.1.1	KULTIVACE MIKROORGANISMU ZA STUDOVANÝCH PODMÍNEK.....	40
3.1.2	STUDOVANÉ FAKTORY A ČASY ODBĚRŮ	40
3.1.3	PŘEDKOLONOVÁ DERIVATIZACE DANSYLCHLORIDEM.....	42
3.1.4	STANOVENÍ MNOŽSTVÍ BIOGENNÍCH AMINŮ POMOCÍ HPLC/DAD	43
3.2	EXPERIMENT II – VLIV VYBRANÝCH FAKTORŮ NA REDUKČNÍ SCHOPNOST <i>LACTICASEIBACILLUS CASEI</i> V REÁLNÉ POTRAVINĚ	45
3.2.1	KULTIVACE MIKROORGANISMU ZA VYBRANÝCH PODMÍNEK V MLÉČE A STANOVENÍ OBSAHU BIOGENNÍCH AMINŮ.....	45
3.3	EXPERIMENT III – DETEKCE ENZYMU MULTICOPPEROXIDÁZY...47	
3.3.1	EXTRAKCE	47
3.3.2	STANOVENÍ MNOŽSTVÍ PROTEINŮ DLE METODY BRADFORDOVÉ.....	47
3.3.3	STANOVENÍ PŘÍTOMNOSTI ENZYMU V POLYAKRYLAMIDOVÉM GELU	47
3.3.4	STANOVENÍ AKTIVITY ENZYMU SPEKTROFOTOMETRICKY	48
3.3.5	STATISTICKÉ VYHODNOCENÍ DAT.....	49
4.	VÝSLEDKY	50
4.1	VÝSLEDKY EXPERIMENTU I – VLIV VYBRANÝCH FAKTORŮ NA REDUKČNÍ SCHOPNOST <i>LACTICASEIBACILLUS CASEI IN VITRO</i>.....	50
4.1.1	VLIV FAKTORŮ NA REDUKCI HISTAMINU <i>IN VITRO</i>	50
4.1.2	VLIV FAKTORŮ NA REDUKCI TYRAMINU <i>IN VITRO</i>	56
4.1.3	VLIV FAKTORŮ NA REDUKCI PUTRESCINU <i>IN VITRO</i>	61
4.1.4	VLIV FAKTORŮ NA REDUKCI KADAVERINU <i>IN VITRO</i>	66
4.1.5	VLIV FAKTORŮ NA REDUKCI FENYLETHYLAMINU <i>IN VITRO</i>	71
4.1.6	VLIV CYSTEINU NA REDUKCI BIOGENNÍCH AMINŮ.....	76
4.2	VÝSLEDKY EXPERIMENTU II – VLIV TECHNOLOGICKÝCH PARAMETRŮ NA DEGRADAČNÍ SCHOPNOST <i>LACTICASEIBACILLUS CASEI</i> V MLÉČE	77

4.2.1	VLIV FAKTORŮ NA REDUKCI HISTAMINU A TYRAMINU V MLÉCE.....	77
4.2.2	VLIV FAKTORŮ NA REDUKCI PUTRESCINU, KADAVERINU A FENYLETHYLAMINU V MLÉCE	80
4.3	EXPERIMENT III – DETEKCE ENZYMU MULTICOPPEROXIDÁZY ..	84
4.3.1	STANOVENÍ PŘÍTOMNOSTI ENZYMU MULTICOPPEROXIDÁZY V GELU	84
4.3.2	SPEKTROFOTOMETRICKÉ STANOVENÍ AKTIVITY ENZYMU MULTICOPPEROXIDÁZY	84
5.	DISKUSE.....	86
6.	ZÁVĚR	92
7.	PŘÍNOS PRO VĚDU A PRAXI.....	94
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	95
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	111
	SEZNAM OBRÁZKŮ A TABULEK.....	113
	CURRICULUM VITAE.....	119
	VZDĚLÁNÍ.....	119
	PRAXE.....	120
	ÚČAST NA GRANTOVÝCH PROJEKTECH	120
	PŘEHLED PUBLIKAČNÍ ČINNOSTI.....	121
	KONFERENČNÍ PŘÍSPĚVKY.....	122
	PŘÍLOHA I:	123

CÍLE PRÁCE

V teoretické části předložené disertační práce bylo cílem vypracovat aktuální literární rešerši zaměřenou na charakterizaci biogenních aminů a možnosti jejich redukce v potravinách. Byly zpracovány poznatky o toxicitě biogenních aminů, přítomnosti v jednotlivých potravinách, faktorech ovlivňujících jejich produkci včetně možnosti využití mikroorganismů, které enzymaticky redukuje biogenní aminy v potravinách.

Cílem experimentální části disertační práce bylo nalézt potenciální bakteriální kmen schopný enzymaticky degradovat biogenní aminy v potravinách. K naplnění tohoto cíle předcházelo několik dílčích projektů:

- Sledování vlivu technologických parametrů na degradační schopnost vybraného bakteriálního kmene *in vitro*.
- Aplikace bakteriálního kmene do reálné potraviny a sledování vlivu technologických parametrů na degradační schopnost v konkrétní potravine.
- Detekce přítomnosti enzymu a stanovení enzymové aktivity multicopperoxidázy.
- Statistická analýza získaných výsledků.

ÚVOD

Kvalita a bezpečnost potravin může být ovlivněna zvýšenou přítomností biogenních aminů (BA). BA vznikají v potravinách převážně mikrobiální enzymatickou dekarboxylací příslušných aminokyselin. Zdravotní rizika pro konzumenty spočívají v negativních účincích, jako jsou bolesti hlavy, kopřivka, střevní potíže, zvýšený nebo snížený krevní tlak atd. Symptomy mohou mít různé stupně závažnosti v závislosti na množství příjmu exogenních biogenních aminů, na poměru jednotlivých aminů v potravinách, a především na zdravotním stavu konzumenta. Nefermentované potraviny lze obecně považovat za nízkorizikové v souvislosti s přítomností BA. Jejich nadměrný výskyt v těchto potravinách je způsoben nežádoucí mikrobiální aktivitou, která může být dána například nevhodnou manipulací či skladovací teplotou. Opačným případem jsou však fermentované výrobky, kdy přítomnost BA je převážně způsobena nezbytnými mikroorganismy, které jsou zodpovědné za fermentaci.

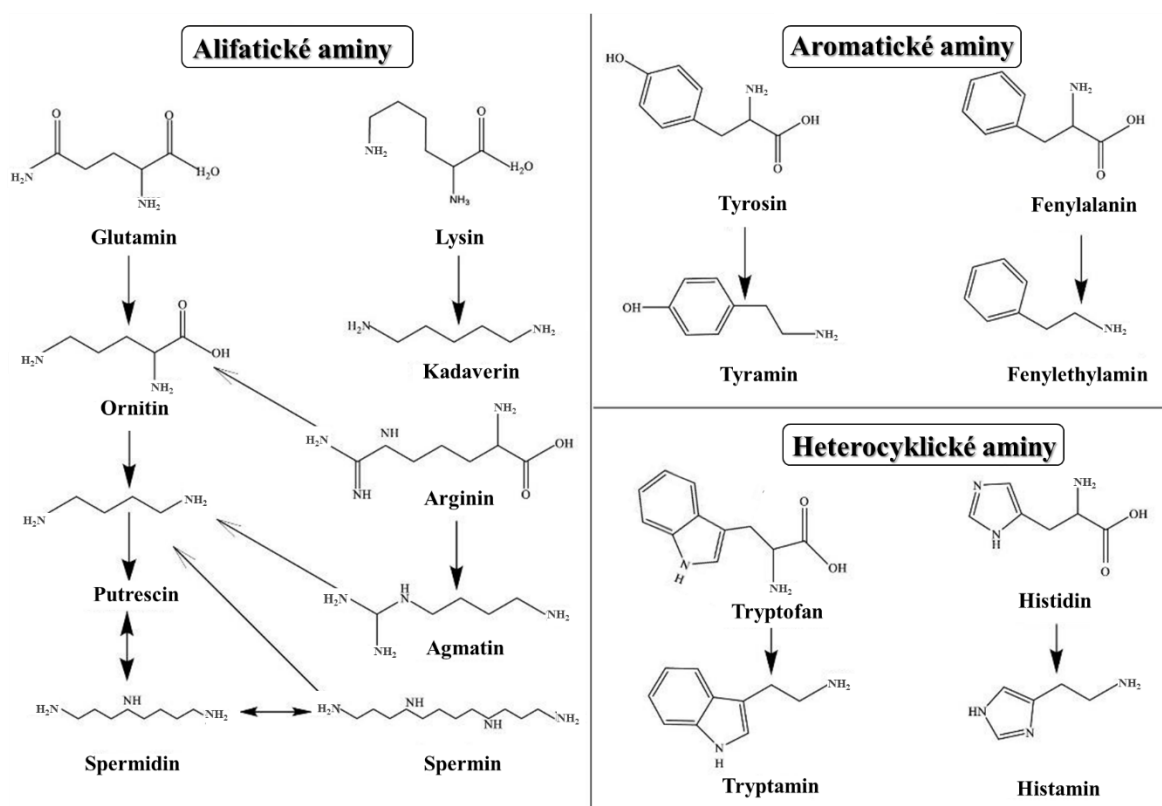
Bylo publikováno několik strategií redukujících hromadění BA v potravinách, a to například využití vhodných obalových technik, ošetření vysokým hydrostatickým tlakem, přidavek potravinářských přídatných látek inhibujících růst dekarboxyláza-pozitivních mikroorganismů atd. Vzhledem k tomu, že bylo zjištěno, že zvýšený výskyt BA bývá obecně detekován ve fermentovaných potravinách, a navíc některé mikroorganismy jsou schopné enzymaticky BA odbourávat, v současné době další vhodnou metodou se zdá být aplikace mikroorganismů, které nepodporují tvorbu BA a zároveň jsou schopné případně vzniklé BA v potravinách redukovat. Významné postavení v této problematice zauímají bakterie mléčného kvašení, které mají dlouhou historii bezpečného používání ve fermentačních procesech. Pro tyto účely je potřeba experimentálně nalézt a vytipovat vhodné kandidáty a ověřit jejich redukční schopnost v reálných potravinách. V neposlední řadě je také důležité pochopit a identifikovat enzymatický aparát u jednotlivých mikroorganismů podílejících se na degradaci BA.

1. SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

1.1 Biogenní aminy – charakteristika a rozdělení

Biogenní aminy (BA) jsou organické nízkomolekulární dusíkaté látky produkované rostlinami, živočichy, a především také mikroorganismy, které jsou součástí jejich metabolických a fyziologických procesů. Všechny BA mají jeden nebo více kladných nábojů a hydrofobní kostru. Z pohledu potravinářské mikrobiologie a pro účely této práce nejvýznamnějšími BA jsou histamin, tyramin, tryptamin, putrescin, kadaverin či fenylethylamin (Alvarez a Moreno-Arribas, 2014).

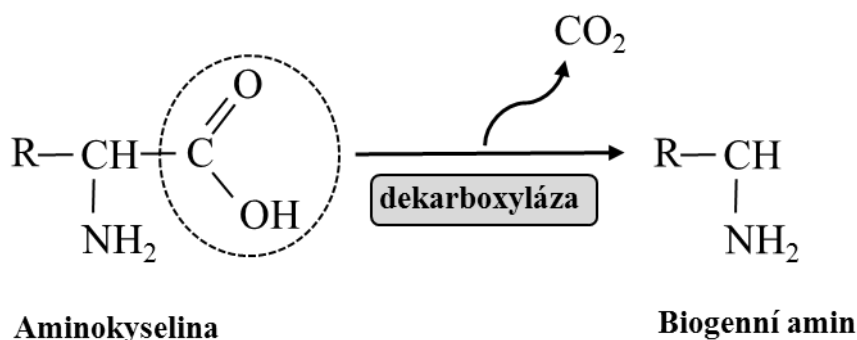
BA lze dělit podle chemického složení na: alifatické (např. putrescin, kadaverin), heterocyklické (např. histamin, tryptamin) a aromatické (např. tyramin, fenylethylamin). V závislosti na počtu aminoskupin se následně dělí na monoaminy (tyramin, fenylethylamin), diaminy (histamin, tryptamin, putrescin a kadaverin) a polyaminy (spermin, spermidin) (Santos, 1996; Alvarez a Moreno-Arribas, 2014). Některé publikace mezi polyaminy řadí i putrescin kvůli jeho roli prekurzoru obou „pravých“ polyaminů sperminu i spermidinu (Kalač, 2009). Strukturální vzorce nejběžnějších BA v potravinách a jejich prekurzorů jsou znázorněny na Obr. 1.1.



Obr. 1.1: Struktura nejběžnějších biogenních aminů v potravinách a jejich a prekurzorů produkované mikroorganismy (upraveno podle Li a Lu, 2020).

1.2 Vznik a fyziologická role biogenních aminů

Biogenní aminy vznikají především dekarboxylací příslušných aminokyselin enzymy dekarboxylázami. Dekarboxylázy jsou skupina enzymů, která selektivně působí na specifické aminokyseliny odstraněním karboxylové skupiny za vzniku odpovídajících aminů a uvolnění CO_2 . Ačkoliv BA mohou vznikat u všech organismů, největší a nejvýznamnější dekarboxylázová aktivita byla zjištěna u bakterií (Comas-Basté et al., 2020). Vznik BA enzymem dekarboxylázou je schematicky znázorněn na Obr. 1.2.



Obr. 1.2: Schéma dekarboxylace aminokyseliny enzymem dekarboxylázou za vzniku biogenního aminu a uvolnění oxidu uhličitého (upraveno podle Comas-Basté et al., 2020).

Fyziologická role BA u eukaryotických organismů je relativně dobře prozkoumána. Eukaryotické buňky přirozeně produkují BA, které působí například jako prekurzory pro syntézu hormonů, alkaloidů, nukleových kyselin a proteinů. Mají také pozitivní účinky na lidské tělo, kdy jsou zapojeny do ovlivňování lidské imunity, regulace duševní činnosti a zvýšení vaskulární aktivity. Polyaminy hrají zásadní roli v biologických procesech jako je buněčný růst a proliferace, stabilizace negativních nábojů DNA, transkripce RNA, regulace iontových kanálů, a to především blokováním draslíkových kanálů. Spermin a spermidin mají navíc antioxidační účinek, jehož mechanismus spočívá v chelataci kovů, která brání tvorbě hydroperoxidů a zpožďuje tvorbu sekundárních oxidačních sloučenin (Igarashi et al., 2001; Premont et al., 2001; Linares et al., 2011; Toro-Funes et al., 2013; Muñoz-Esparza et al., 2019).

Na druhou stranu fyziologická role biosyntézy BA u prokaryot není doposud zcela jednoznačně objasněna. Předpokládá se, že produkce BA u bakterií souvisí s obrannými mechanismy vůči kyselému prostředí. Dekarboxylázové enzymy, které mají optimální pH kolem 5,0, pomáhají obnovovat vnější pH, a tím zvyšují schopnost přežití bakterií v kyselém prostředí (Schelp et al., 2001; Rhee et al.,

2002). Navíc autoři Schelp et al. (2001) ve své studii prokázali, že enzym histidindekarboxyláza izolovaná z *Lactobacillus* 30a je aktivní pouze při nízkém pH. Neutrální až zásadité pH indukuje strukturální změny enzymu zabraňující navázání substrátu do aktivního místa. Při nízkém pH dochází k obnově struktury a enzym se stává opět aktivní (Moreno-Arribas a Lonvaud-Funel, 2001; Schelp et al., 2001; Linares et al., 2011). Syntéza BA u bakterií je také spojována se získáváním energie, kdy vzniklý produkt (biogenní amin) je zapojen do antiportového mechanismu aminokyselina/amin, což může vést ke generování protonové hybné síly. Například pro bakterie mléčného kvašení (LAB), které postrádají dýchací řetězec, by tento mechanismus mohl představovat zvýšení výtěžku ATP (Molenaar et al., 1993; Schelp et al., 2001; Linares et al., 2011).

1.3 Detoxifikační systém

Hladina biogenních aminů u člověka je udržována třemi primárními zdroji (Bardócz, 1995; Kalač, 2009):

- endogenní (de novo) biosyntézou,
- produkcí střevními mikroorganismy,
- příjmem z potravy.

Nejvýznamnějším a hlavním zdrojem biogenních aminů pro organismus je příjem z potravy. Ačkoliv jsou aminy nezbytné pro správné fungování organismu, vzhledem k tomu, že hlavní příjem BA pro člověka je exogenní, může docházet k jejich nadměrnému hromadění. Biogenní aminy jsou odbourávány přes detoxifikační systém prostřednictvím enzymů aminooxidáz: monoaminoxidáz (MAO), diaminoxidáz (DAO) a polyaminoxidáz (PAO) (Bardócz, 1995; Kalač, 2009).

U člověka jsou známy dvě degradační cesty histaminu zahrnující enzymy histamin-*N*-methyltransferázu (HNMT) a diaminoxidázu (DAO) nazývanou také histamináza. Tento enzym je zodpovědný za degradaci extracelulárního histaminu. Jedná se o homodimer se dvěma izoformami katalyzující oxidační deaminaci primární aminové skupiny histaminu. U člověka je jeho exprese omezena pouze na určité tkáně, a to zejména na tenké střevo, tlusté střevo, placentu a ledviny. Navíc DAO není specifický pouze pro histamin, ale může také metabolizovat další BA, jako jsou putrescin a kadaverin. Naproti tomu enzym HNMT je exprimován v široké škále lidských tkání a je vysoce selektivní

pro histamin. HNMT katalyzuje metylaci sekundární aminové skupiny histaminového imidazolového aromatického heterocyklu za účasti S-adenosylmethioninu, který je donorem methylové skupiny. Vzniklý produkt reakce je poté substrátem aminooxidázy (MAO nebo DAO) odpovídající za tvorbu *N*-methylimidazol acetaldehydu, který je nakonec enzymem aldehyddehydrogenázou (AD) redukován na *N*-methylimidazol-octovou kyselinu (Elmore et al., 2002; Finney et al., 2014; Fernández-Reina et al., 2018; Comas-Basté et al., 2020).

Degradační metabolismus polyaminů zahrnuje několik cest. Jednou z možností je přímá transformace sperminu na spermidin FAD závislým enzymem sperminoxidázou (SMO). Další cesta přeměny sperminu na spermidin (stejně jako spermidinu na putrescin) vyžaduje přítomnost spermidin/spermin *N*1-acetyltransferázy (SSAT). Vzniklý metabolit *N*-acetylspermin (resp. *N*-acetylspermidin) může být následně substrátem pro polyaminoxidázy (PAO) za vzniku 3-acetamidopropanalu, H₂O₂ a spermidinu (resp. putrescinu) (Fernández-Reina et al., 2018).

1.4 Toxicita biogenních aminů

Je velmi obtížné stanovit přesnou hranici toxicity BA, protože toxická dávka silně závisí na účinnosti detoxikačního mechanismu každého jedince. U zdravých osob dochází k dostatečně rychlé redukci potravou získaných biogenních aminů, avšak u osob s nízkou aktivitou aminooxidáz, která může být způsobena genetickou dysfunkcí, působením inhibitorů (např. antidepresiv, některých dalších léků, alkoholu) nebo nadměrného příjmu BA z potravy, dochází k jejich akumulaci a mohou mít následně negativní vliv na člověka a způsobit intoxikaci organismu. Obecně se jedná o bolesti hlavy, kopřivku, střevní potíže, zvýšený nebo snížený krevní tlak. Navíc některé aminy mohou vytvářet karcinogenní nitrosaminy (Santos, 1996; Ladero et al., 2010; Alvarez a Moreno-Arribas., 2014). Symptomy způsobené histaminem, tyraminem, putrescinem jsou schematicky shrnuté na Obr. 1.3. Toxické účinky mohou mít různé stupně závažnosti v závislosti na množství příjmu exogenních BA, na poměru jednotlivých aminů v potravině a na zdravotním stavu konzumenta. Přestože za potenciálně nejvíce nebezpečný je obecně považován histamin s tyraminem, ostatní aminy mohou zesilovat toxicitu a negativní účinky těchto aminů (Sarkadi, 2019). Z tohoto důvodu výskyt BA v potravinách a možnosti jejich redukce je předmětem intenzivního bádání a zájem o toto téma stále stoupá.

1.4.1 Histamin

Otrava histaminem, známá také pod názvem scombroidní otrava, byla poprvé popsána na konci 18. století. Histaminová intoxikace je spojována především

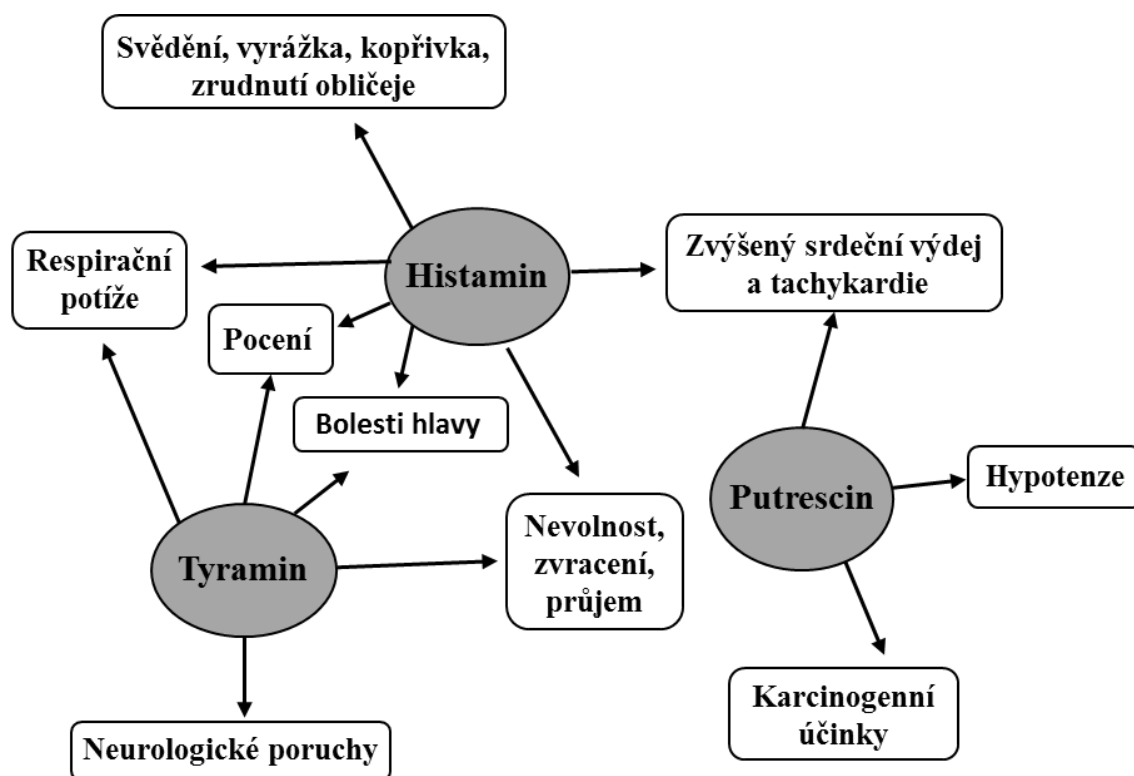
s konzumací ryb patřících do čeledí *Scombroidae* a *Scomberesocidae*, konkrétně makrely, tuňáka nebo sardinky. I přestože příjem 10 mg histaminu je obecně považován za bezpečné množství, u citlivých jedinců už množství 5–10 mg histaminu může vyvolat nežádoucí účinky (Taylor, 1986; Shalaby, 1996; Papageorgiou et al., 2018). Histamin je také jediný biogenní amin, jehož množství v potravinách je legislativně regulováno. Nařízení Evropské komise o mikrobiologických kritériích pro potraviny, nařizuje limity histaminu u ryb (zejména u čeledí *Scombridae*, *Clupeidae*, *Engraulidae*, *Coryfenidae*, *Pomatomidae*, *Scombresocidae*) na maximální množství 100 mg·kg⁻¹ u čerstvých ryb a 200 mg·kg⁻¹ u fermentovaných rybích produktů (EC č. 2073/2005; Nařízení Komise, 2005). Kromě zmíněných ryb však existují i jiné potraviny s vysokým výskytem histaminu, a to mimo jiné sýry nebo fermentované klobásy (Stratton et al., 1991; Shalaby, 1996). Intoxikace lidského organismu histaminem se může projevit příznaky jako je vyrážka, kopřivka, otok, nevolnost, bolest a křeče břicha, zvracení, průjem, bolest hlavy, dýchací obtíže a porucha oběhového systému související s hypotenzí a hypertenzí. Histamin se v lidském těle váže na 4 receptory H1, H2, H3 a H4 a spouští sled reakcí vedoucích k vedlejším účinkům. Tyto receptory jsou lokalizované v buněčných membránách dýchacího, kardiovaskulárního, gastrointestinálního a hematologicko/immunologického systému a v kůži. Například histaminem indukovaná kontrakce střeva způsobená vazbou na receptor H1 odpovídá za křeče v břiše, průjem a zvracení. Sekrece žaludeční kyseliny je regulována histaminem skrze receptory H2 umístěnými na parietálních buňkách. Naopak zarudnutí a svědění pokožky souvisí se stimulací sensorických a motorických neuronů, které jsou ovlivněny prostřednictvím receptorů H3. Poslední H4 je nejnověji objeveným receptorem, u kterého se předpokládá účast hlavně v prozánětlivých odpovědích (Karovičová a Kohajdová, 2005; Thangam et al., 2018).

1.4.2 Tyramin

Otravy tyraminem byly poprvé objeveny ve spojitosti s konzumací sýrů, a proto se otrava tyraminem označuje jako tzv. „cheese reaction“ nebo „cheese effect“. Tyramin má podobné negativními účinky na zdraví jedince jako histamin. Mezi příznaky otravy tyraminem se řadí bolesti hlavy, neurologické poruchy, nevolnost, zvracení, poruchy dýchání a hypertenze, nevolnost, průjem atd. (Bardócz, 1995; Karovičová a Kohajdová, 2005; Alvarez et al., 2014). V současné době z důvodu nedostatků informací neexistuje limit tyraminu v potravinách. Podle doporučení EFSA (Evropský úřad pro bezpečnost potravin) bezpečná hladina tyraminu v potravinách je 600 mg tyraminu pro zdravé jedince neužívající léky inhibitory monoaminoxidázy (MAOI), ale jen 50 mg tyraminu pro osoby užívající léky třetí generace MAOI, a dokonce pouze 6 mg tyraminu u osob užívající klasické MAOI léky (EFSA, 2011).

1.4.3 Sekundární biogenní aminy

Ostatní biogenní aminy jako je putrescin, kadaverin a fenylethylamin jsou obecně považovány za méně toxické a stejně jako u tyraminu není jasně definována limitní koncentrace těchto aminů v potravinách. Hlavní nebezpečí spočívá především ve skutečnosti, že putrescin a kadaverin mohou zesilovat negativní účinky ostatních aminů, a to především histaminu. Navíc tyto sekundární aminy v přítomnosti dusitanů mohou reagovat za vzniku nitrosaminů, které jsou silnými karcinogeny. Riziko tvorby nitrosaminů se zvyšuje konzumací potravin bohatých na BA a na dusitanové a dusičnanové soli, které se používají jako konzervační látky. Vznik karcinogenních látek je také podpořen případným zahříváním těchto potravin (Shalaby, 1996; Halász et al., 2004; Linares et al., 2011; Wójcik et al., 2021).

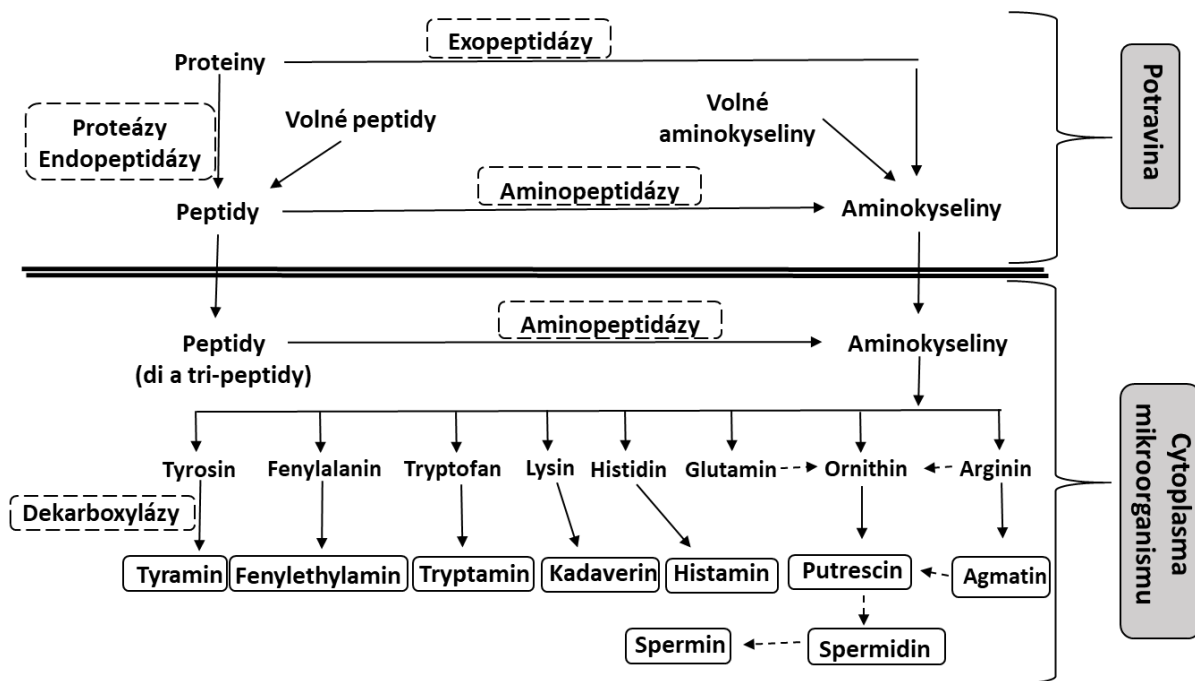


Obr. 1.3: Potencionálně nejvíce toxické biogenní aminy (histamin, tyramin, putrescin) a jejich negativní účinky na lidský organismus (upraveno podle Alvarez a Moreno-Arribas, 2014).

1.5 Biogenní aminy v potravinách

Nejběžnějšími biogenními aminy, které byly detekované v potravinách, jsou histamin, putrescin, kadaverin, tyramin, tryptamin, β -fenylethylamin, spermin a spermidin (Santos, 1996). Jejich výskyt je způsoben přítomností bakterií a jejich substrátově specifickými dekarboxylázovými enzymy lokalizovanými v cytoplazmě. U gramnegativních bakterií, stejně jako u člověka, je aktivita dekarboxyláz závislá na pyridoxal-5-fosfátu. Naopak u grampozitivních bakterií, které mohou být potenciálně přítomné ve střevech (např. *Lactobacillus* sp. a nové odvozené rody), je reakce katalyzována nehomologním enzymem závislým na pyruvoylu (Fernández-Reina et al., 2018).

Biosyntéza histaminu je katalyzována prostřednictvím enzymu histidindekarboxylázy, stejně tak kadaverin vzniká z lysinu pomocí lysindekarboxylázy. Naopak tyrosindekarboxyláza dává vznik dvou aminům. Může převádět aminokyseliny tyrosin a fenylalanin na tyramin, respektive fenylethylamin. Syntéza putrescinu může probíhat dvěma různými cestami z ornithinu nebo agmatinu v závislosti na produkční bakterii a enzymech, které vlastní. První možností je pomocí enzymu ornithindekarboxylázy, který katalyzuje přeměnu ornithinu na putrescin. Druhou variantou je biosyntéza z agmatinu, která probíhá dvěma odlišnými metabolickými cestami. První z nich je biosyntetická cesta, při níž je agmatin přímo přeměňován na močovinu a putrescin působením enzymu agmatinázy. Druhá cesta produkce z agmatinu vychází ze sekvenčního působení tří enzymů za vzniku putrescinu a vedlejšího produktu močoviny. Po produkci aminů v cytoplazmě následuje jejich vylučování mimo buňku prostřednictvím aktivního antiportního systému prekurzorová aminokyselina/biogenní amin. (Benkerroum, 2016; Doeun et al., 2017). Zjednodušené schéma vzniku biogenních aminů a uvolnění do potravin je popsáno na Obr. 1.4.



Obr. 1.4: Tvorba biogenních aminů v potravinách v důsledku mikrobiální enzymatické aktivity (upraveno podle Benkerroum, 2016).

1.6 Index kvality

Kontrola a sledování biogenních aminů lze využít jako ukazatele stupně čerstvosti u některých potravin nebo ke kontrole kvality během zpracování a vývoje potravin a nápojů. Čerstvé maso obsahuje velmi malé množství těchto sloučenin, avšak jejich koncentrace se v důsledku růstu bakterií může zvyšovat během doby skladování (Ruiz-Capillas a Herrero, 2019).

Existuje několik indexů kvality (BAI: Biogenic Amine Index). Touto problematikou se poprvé zabývali autoři Mietz a Karmas ve studii z roku 1978, kdy navrhli index pro ryby. Tento index kvality $BAI = \frac{\text{histamin} + \text{putrescin} + \text{kadaverin}}{1 + \text{spermidin} + \text{spermin}}$ je založen na zvýšení množství putrescinu, kadaverinu a histaminu a snížení množství sperminu se spermidinem během procesu skladování ryb. Obecně hodnota BAI nižší než 1 svědčí o velmi kvalitních rybách, zatímco hodnoty BAI vyšší než 10 naznačují rozklad produktu. Ukázalo se však, že v případě jiných potravin, jako jsou sýry, maso a masné výrobky, je irelevantní, především proto, že nezahrnuje hladiny tyraminu, hlavního biogenního aminu v těchto produktech (Mietz a Karmas, 1978).

O několik let později byl vytvořen alternativní BAI pro maso, který se skládá ze součtu putrescinu, kadaverinu, histaminu a tyraminu (Hernández-Jover et al., 1996). Vzhledem k tomu že je potřeba brát v potaz mnoho faktorů týkajících se

například povahy produktu (čerstvý, konzervovaný, upravená atmosféra, fermentovaný atd.), stanovit univerzální index biogenních aminů, který spolehlivě předpovídá kvalitu produktu, není jednoduché. Přesto však snaha využít individuálních nebo kombinaci různých aminů jako ukazatele kvality je stále aktuálním tématem (Du et al., 2002; Benner et al., 2003; Sarkadi, 2019; Ruiz-Capillas a Herrero, 2019).

1.7 Potraviny s vyšším obsahem biogenních aminů

Největším rizikem akumulace biogenních aminů v potravinách je skutečnost, že za určitých podmínek v důsledku nekontrolované mikrobiální aktivity se mohou hromadit ve vysokých koncentracích, které pak mnohonásobně překračují kapacitu detoxikačního mechanismu konzumenta. Teoreticky u všech potravin, které obsahují volné aminokyseliny nebo bílkoviny a jsou vystaveny podmínkám umožňující mikrobiální nebo biochemickou aktivitu, lze očekávat přítomnost BA. Množství a profil jednotlivých aminů se může lišit v závislosti na vnějších a vnitřních faktorech během výrobního procesu, jako jsou podmínky zrání, fyzikálně-chemické a proteolytické parametry, a také přítomnost a vývoj mikroflóry. Významný vliv hraje i původ produktu. Každá země má svá vlastní tradiční jídla, které se často liší, jak v mikrobiálních vlastnostech, tak ve způsobu výroby a v metodách zpracování. Kromě toho specifické klima pro danou zemi také ovlivňuje přítomnost biogenních aminů (Sarkadi, 2019; Papageorgiou et al., 2018).

Dále existují významné rozdíly ve složení biogenních aminů u fermentovaných a nefermentovaných potravin. Obecně lze nefermentované potraviny považovat za nízkorizikové v souvislosti s přítomností biogenních aminů. Nadměrný výskyt aminů u nefermentovaných potravin je známkou nežádoucí mikrobiální aktivity, která může být způsobena například nevhodnou manipulací a skladovací teplotou. Naopak produkty mikrobiální fermentace jako je víno, pivo, mléčné výrobky, fermentované masné výrobky atd., jsou brány k tohoto pohledu jako rizikovější, právě z důvodu přítomnosti nezbytných mikroorganismů. Dále obecně také platí, že potraviny rostlinného původu obsahují vysoké množství putrescinu, sperminu a spermidinu, ale podstatně nižší množství histaminu než potraviny pocházející z živočichů (Sarkadi, 2019; Papageorgiou et al., 2018).

1.7.1 Ryby a mořské plody

Mezi nejrizikovější se řadí mořské plody a ryby. Histamin, tyramin, kadaverin a putrescin jsou nejčastějšími BA nacházejících se v těchto potravinách. Hladiny aminů v čerstvě ulovených rybách jsou obecně nízké, například množství histaminu je obvykle pod $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$. Následně špatné zacházení s čerstvými

rybami (např. špatná teplota skladování) může vést k tvorbě aminů grampozitivními a gramnegativními bakteriemi, které se přirozeně nachází na kůži, žábrech nebo v zažívacím traktu a mohou se během porážky, vykuchávání a nechtěnému prasknutí a rozliti obsahu gastrointestinálního traktu dostat do svalové tkáně. Přítomnost konkrétních bakterií závisí na podmínkách přirozeného prostředí. Nejčastěji se jedná o *Enterobacteriaceae* zahrnující mezofilní a psychrotolerantní bakterie, jako jsou *Enterobacter*, *Morganella*, *Proteus* nebo *Hafnia*. Dále také *Pseudomonas* spp. a bakterie mléčného kvašení patřící do rodů *Lactobacillus* (a od něj odvozených nových rodů) a *Enterococcus* (Du et al., 2002; Emborg et al., 2006; Papageorgiou et al., 2018; Visciano et al., 2020). Navíc variabilita BA souvisí také s přítomností aminokyselin a převládajícím typem svaloviny. Ryba s převážně tmavým svalstvem bude obsahovat více histidinu, a tím pádem poté i více akumulovat histamin při zvýšené teplotě ve srovnání s bílými typem, který může naopak vykazovat vyšší koncentrace kadaverinu a putrescinu (Du et al., 2002). Díky tomu lze využít vybrané aminy jako indikátor kvality – viz kapitola 1.6 Index kvality. U hlavonožců (např. sépie nebo chobotnice) se pro detekci kvality používá agmatin, zatímco v případě korýšů, krevet a humrů je vhodnější putrescin a kadaverin (Benner et al., 2003; Prester et al., 2010; Sedaghati a Mooraki, 2019). Ve studii z roku 2015 (Bilgin a Gençcelep, 2015) byla zkoumána přítomnost jednotlivých BA v rybích produktech (konzervy sardinek, makrel, tuňáků a marinovaných ančoviček). Celková hladina biogenních aminů se pohybovala v rozmezí od 26,58 do 406,55 mg·kg⁻¹. Ve vzorcích syrových sladkovodních a mořských ryb a živočichů nabízených v restauracích v České republice bylo v určitých vzorcích nalezeno celkové množství BA přesahující množství 1000 mg·kg⁻¹, navíc s koncentrací histaminu, zákonem překračující limit, vyšší jak 200 mg·kg⁻¹ (Buňka et al., 2013).

1.7.2 Mléčné produkty

Mléko a mléčné výrobky patří mezi důležitou složku stravy člověka po celém světě. Vzhledem ke svému bohatému a vyváženému chemickému složení poskytuje dostatečné médium pro růst prakticky všech mikroorganismů, včetně těch, které produkují toxické metabolity. Biogenní aminy nejsou produkovány pouze mikrobiálními kontaminanty, ale také technologickou mikroflórou (bakterie mléčného kvašení, kvasinky a plísně) nezbytnou při fermentaci a / nebo zrání mléčných výrobků, které pak zvyšují celkové množství aminů v mléce, respektive mléčných výrobcích. Kromě toho obsah BA v mléčných výrobcích ovlivňuje i několik faktorů, včetně typu mléka, doby a podmínek zrání, typu ošetření mléka (např. pasterizace, homogenizace), pH, koncentrace NaCl, ale také přítomnost prekurzorových aminokyselin, které mohou být přirozeně přítomny v mléce ve volném stavu nebo mohou být uvolněny hydrolýzou z mléčných

proteinů (Gardini et al., 2001; Novella-Rodríguez et al., 2003; Papageorgiou et al., 2018; Mahmoudzadeh et al., 2022).

Bylo publikováno mnoho studií zabývajících se produkcí BA v sýrech (Valsamaki et al., 2000; Novella-Rodríguez et al., 2003; Fernández et al., 2006; Fernández et al., 2007; Linares et al., 2011). Jedná se především o tyramin s histaminem a kadaverinem, ale i ostatní aminy, jako jsou putrescin, tryptamin a fenylethylamin. Obsah jednotlivých aminů závisí především na typu sýru, a také na výrobním procesu. Právě čas zrání je kritickým faktorem, kdy delší doba vede k proteolýze sýra, čímž se zvyšuje dostupnost aminokyselin, které mohou být dekarboxylovány mikrobiálními enzymy za vzniku BA. Novella-Rodríguez et al. (2003) ve své studii porovnávali obsah biogenních aminů u nezrajících a zrajících typů sýru. Na základě výsledků autoři dospěli k závěru, že množství všech aminů bylo vyšší u zrajících než u nezrajících sýrech, kdy hlavními aminy ve zrajícím sýru byly tyramin, kadaverin a putrescin. Navíc bylo dokázáno, že variabilita aminů může být rozdílná nejen u jednotlivých druhů, ale dokonce i mezi různými částmi stejného sýra (Novella-Rodríguez et al., 2003).

1.7.3 Maso a fermentované masné produkty

Další důležitou složkou stravy člověka je maso a masné výrobky. Ačkoliv čerstvé maso je přirozeným zdrojem substrátu pro tvorbu BA, obsahuje pouze malé množství těchto aminů vznikajících v průběhu skladování, kdy případné nadměrné množství lze využít jako indikátor kvality a čerstvosti. Opačný případ jsou však fermentované masné výrobky, které mohou představovat zdravotní rizika především kvůli hromadění tyraminu, histaminu, putrescinu a kadaverinu. Obecně se jedná o výrobky, ve kterých lze nalézt značné množství BA v důsledku použití vstupních surovin, kontaminace, nevhodných podmínek při zpracování a skladování, přítomnost mikroorganismů odpovědné za fermentační procesy (Sarkadi, 2019; Papageorgiou et al., 2018). Například autoři Papavergou et al. (2012) ve své publikaci dokázali přítomnost tyraminu v rozmezí 0 až 510 mg·kg⁻¹, putrescinu (0 až 505 mg·kg⁻¹), histaminu (0 až 515 mg·kg⁻¹) a kadaverinu (0 až 690 mg·kg⁻¹) v suchých fermentovaných uzeninách.

Také zdroj masa hraje důležitou roli ve výsledném profilu a koncentraci aminů. Autoři publikace z roku 2014 zkoumali změny v koncentraci biogenních aminů ve vzorcích evropských uzenin vyrobených z koňského, hovězího a krůtího masa po 28 dnech skladovaných při 4 °C. Největší množství BA bylo zjištěno v krůtích klobásách, kdy byla detekována přítomnost putrescinu o množství 285 mg·kg⁻¹, histaminu 263 mg·kg⁻¹ a celkové množství všech zkoumaných biogenních aminů dosahovalo 730 mg·kg⁻¹. V hovězích klobásách bylo naměřeno maximální množství 500 mg·kg⁻¹ celkových biogenních aminů (nejvíce zastoupený byl

putrescin $278 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), ale pouze $130 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ celkových aminů v koňských produktech (Rabie et al., 2014).

1.7.4 Alkoholické nápoje

Rizikovými produkty z pohledu akumulace BA jsou také alkoholické nápoje, především víno, pivo. Stejně jako u ostatních produktů existují rozdíly ve variabilitě obsahu aminů, které jsou ovlivněny výrobním procesem, časem a skladovacími podmínkami, kvalitou surovin (chmel, slad, hrozny) a možnou mikrobiální kontaminací během výroby. Bylo také zjištěno významné rozdíly mezi výrobními šaržemi alkoholických nápojů (Lonvaud-Funel, 2001; Landete et al., 2005; Spano et al., 2010; Doeun et al., 2017; Poveda, 2019; Lorencová et al., 2020).

Ve víně bylo identifikováno několik aminů (především histamin, tyramin a putrescin) s celkovou koncentrací v rozmezí od $\text{ng}\cdot\text{l}^{-1}$ do přibližně $50 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ v závislosti na kvalitě a druhu vína (Spano et al., 2010; Doeun et al., 2017). Podle autorů Henríquez-Aedo et al. (2012) detekovaná množství celkových BA v bílém víně jsou nižší ve srovnání s červeným vínem.

V případě piva byl zjištěn výskyt histaminu, kadaverinu, putrescinu a tyraminu, ale i spermidinu, fenylethylaminu a sperminu, které lze přirozeně nalézt ve sladu či chmelu. Bylo prokázáno, že delší doba skladování produktu může podporovat tvorbu BA v pivu. V roce 2020 byla provedena rozsáhlá studie vyhodnocující výskyt 8 biogenních aminů ve 115 různých vzorcích piva vyrobených v pivovarech v České republice. Bylo zjištěno, že se na konci data minimální trvanlivosti došlo ke zvýšení koncentrace BA. U více než 30 % testovaných vzorků byl detekován celkový obsah BA v rozmezí $50\text{--}100 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ a dokonce u 18 % vzorků celkové množství BA přesahovalo $100 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$. Nejčastěji detekovaným BA ve všech testovaných vzorcích s nejvyššími koncentracemi byl tyramin (Lorencová et al., 2020).

I když jsou v alkoholických nápojích hlášeny nižší hladiny biogenních aminů ve srovnání s ostatními uvedenými potravinami, kvůli synergickým účinkům mezi BA a alkoholem se mohou objevit negativní účinky už v rozmezí 8 až $20 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ u histaminu, 25 až $40 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ v případě tyraminu a při $3 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ u fenylethylaminu (Poveda, 2019; Mahmoudzadeh et al., 2022).

1.8 Detekce biogenních aminů

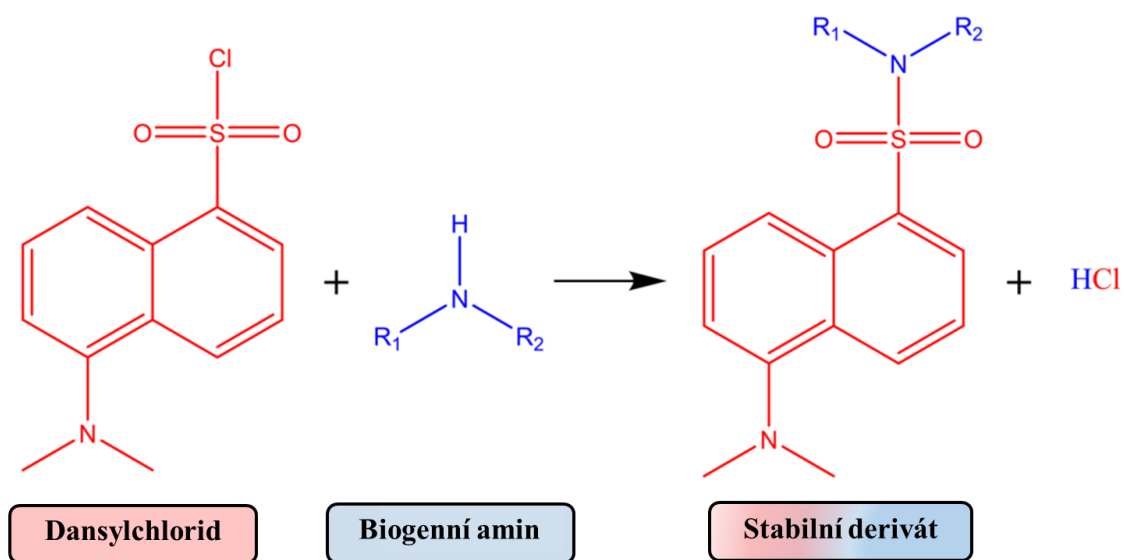
Z hlediska kontroly kvality a bezpečnosti potravin a také pro určení potenciálního toxického účinku BA je důležité znát hladinu jednotlivých BA. Detekci aminů v konkrétních potravinách komplikuje několik skutečností. Naříklad silně polární charakter aminů má za následek vyšší rozpustnost ve vodě než v často používaných organických rozpouštědlech, ale i složitost matrice vzorku či variabilní rozsah koncentrací, který je často velmi nízký. V neposlední řadě detekci aminů ovlivňuje i přítomnost potenciálně interferujících sloučenin a výskyt několika biogenních aminů současně (Önal, 2007; Papageorgiou et al., 2018). Prvním krokem, který může negativně ovlivnit výtěžnost je samotná extrakce aminů z potravin vhodnými extrakčními rozpouštědly. Bylo publikováno mnoho studií, které pro extrakci využívají různých rozpouštědel, jako je kyselina chlorovodíková, kyselina trichloroctová, kyselina trichloroctová, kyselina chloristá, kyselina methansulfonová a další organická rozpouštědla (Smělá et al., 2004; Cinquina et al., 2004; Pastore et al., 2005; Önal, 2007). Pro analýzu a kvantifikaci byla navržena celá řada metod jako je chromatografie na tenké vrstvě (TLC), iontoměničová chromatografie (IEC), plynová chromatografie (GC), vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) nebo kapilární zónová elektroforéza (CZE), ale také enzymová imunoanalýza (Pastore et al., 2005; Dadáková et al., 2009; Ahmad et al., 2020; Papageorgiou et al., 2018).

1.8.1 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

V současné době nejběžnější a nejrozšířenější technikou pro stanovení BA je vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) s různým typem detektoru (nejčastěji fluorescenční, UV a elektrochemický), obvykle s kolonou C18 s reverzní fází a mobilní fází acetonitril/voda (65–90 % acetonitril). Výhodou HPLC je možnost analýzy široké škály BA v různých matricích s vysokou citlivostí a rozlišením, velkou všestranností a relativně jednoduchým zpracováním vzorků. Navíc se jedná o uznanou referenční metodu schválenou Evropskou komisí (EC č. 2073/2005; Nařízení Komise, 2005). Protože biogenní aminy nevykazují uspokojivou absorpci záření ve viditelné nebo ultrafialové oblasti spektra, a ani nevykazují fluorescenci, obvykle pro samotnou analýzu je potřeba provést předkolonovou nebo pokolonovou derivatizaci vzorků, která zvyšuje selektivitu a citlivost detekce (Vidal-Carou et al., 2003). Jako derivatizační činidla se nejběžněji používají o-ftalaldehyd (OPA) (Papavergou et al., 2012) a dansylchlorid (Dadáková et al., 2009), případně dabsylchlorid, benzoyl chlorid, fluorescein, 9-fluorenylmethylchlorformiát nebo naftalen-2,3-dikarboxaldehyd a jiné. OPA je jedno z fluorogenních činidel, jehož hlavní nevýhody spočívají v tom, že reaguje pouze s primárními aminy v přítomnosti redukčního činidla (N-acetylcytein nebo 2-merkptoethanol) a vzniklé fluorescenční deriváty nejsou příliš stabilní. Na rozdíl od OPA,

dansylchlorid reaguje jak s primárními, tak i se sekundárními aminoskupinami a poskytuje velmi stabilní produkty (Loukou a Zotou, 2003; Dadáková et al., 2009; Proestos et al., 2008). Reakce dansylchloridu s BA je znázorněna na Obr. 1.5.

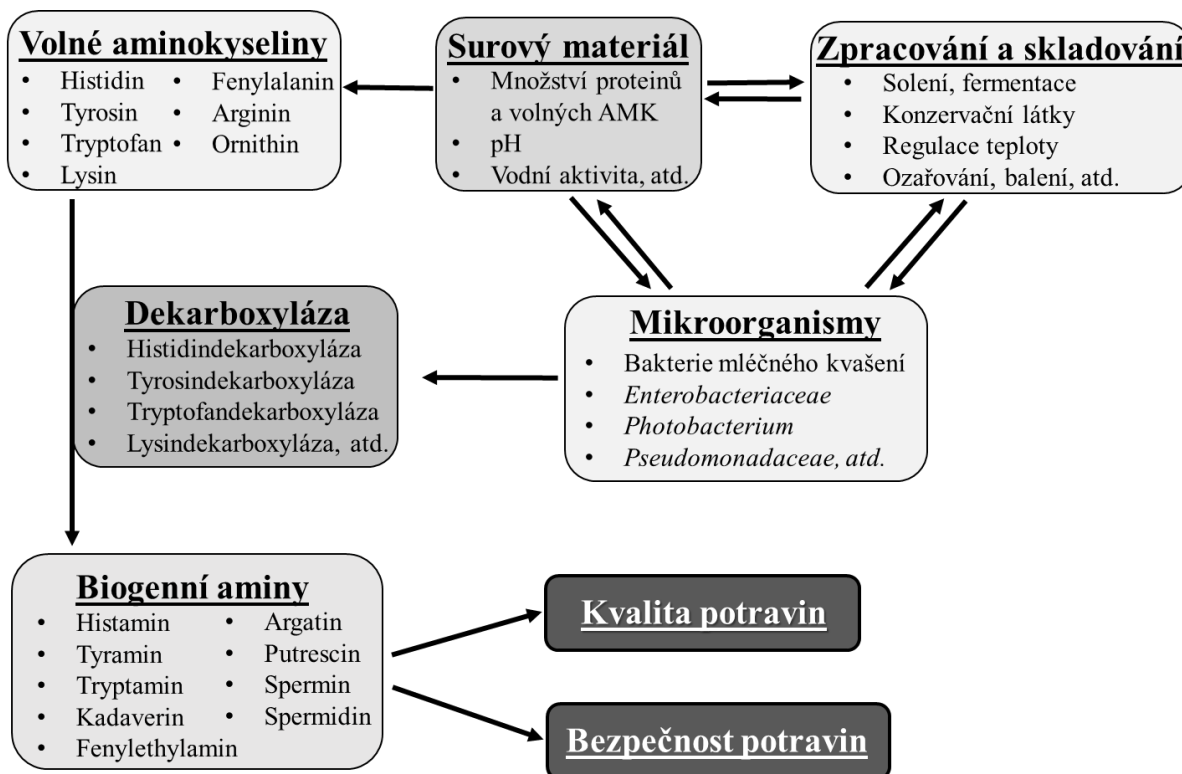
Pokroky v oblasti kapalinové chromatografie umožňují využití moderních separačních technik jako je UPLC (Ultra Performance Liquid Chromatography). Analýza BA UPLC ve srovnání s HPLC má mnoho výhod, včetně zkrácení doby analýzy, menší spotřeby rozpouštědla a zvýšení maximální kapacity díky použití velmi vysokým tlakům (až 1000 bar) a krátkých kolon (5 cm) s velikostí částic <2 μm (Nguyen et al., 2007; Dadáková et al., 2009).



Obr. 1.5: Reakce derivatizačního činidla dansylchloridu s biogenním aminem za vzniku stabilního derivátu (upraveno podle Mantoanelli et al., 2020).

1.9 Faktory ovlivňující tvorbu biogenních aminů

Tvorba biogenních aminů je ovlivněna a závisí na několika faktorech, jako je přítomnost prekurzorových aminokyselin, přítomnost mikroorganismů s dekarboxylázovou aktivitou a vhodné podmínky pro růst těchto mikroorganismů. Tyto faktory jsou dány vstupním surovým materiálem, zpracováním a skladováním potravin (Ruiz-Capillas a Herrero, 2019). Vztah mezi jednotlivými faktory a tvorbou biogenních aminů je popsán na Obr 1.6.



Obr. 1.6: Faktory ovlivňující tvorbu biogenních aminů v potravinách (upraveno podle Ruiz-Capillas a Herrero, 2019).

1.9.1 Volné aminokyseliny

Jedním z limitujících faktorů pro syntézu BA je dostupnost volných aminokyselin, které jsou stavebními kameny všech bílkovin, peptidů a mnoha dalších sloučenin. Volné aminokyseliny se v potravině vyskytují běžně nebo jsou výsledkem proteolytických reakcí během zpracování či skladování. Bylo publikováno několik studií zabývajících se vlivem doby zrání sýrů na množství BA (Valsamaki et al., 2000; Galgano et al., 2001; Fernández et al., 2006;

Komprda et al., 2007). Po dobu zrání dochází k proteolýze kaseinu, a tím k uvolňování aminokyselin, které mohou být následně mikrobiálně dekarboxylovány na BA (Linares et al., 2011). V publikaci z roku 2006 autoři studovali španělský modrý sýr zrající po dobu 90 dnů. V prvních dnech zrání byla koncentrace prekurzorových aminokyselin velmi nízká a BA nebyly detekovány. Po 15 dnech byla pozorována zvýšená koncentrace aminokyselin a poté byla prokázána i přítomnost BA v sýru (Fernández et al., 2006).

1.9.2 Mikroorganismy s dekarboxylázovou aktivitou

Existuje mnoho mikroorganismů schopných produkovat biogenní aminy. Jedná se o grampozitivní a gramnegativní bakterie, ale i některé kvasinky. V průběhu několika desítek let byly provedeny rozsáhlé studie a bylo zveřejněno mnoho publikací zabývajících se identifikací mikroorganismů produkujících BA v potravinách. Jedná se o bakteriální druhy mnoha rodů, jako jsou např. *Bacillus*, *Citrobacter*, *Clostridium*, *Klebsiella*, *Escherichia*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Streptococcus thermophilus*, *Shigella*, *Photobacterium*, *Hafnia alvei*, *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia* spp., ale právě i bakterie mléčného kvašení *Lactobacillus* (a nové rody odvozené od rodu *Lactobacillus*), *Pediococcus* a *Streptococcus* aj. (Durlu-Özkaya et al., 2001; Pessione et al., 2005; Kung et al., 2007; Pircher et al., 2007; Gezginc et al., 2013; Doeun et al., 2017).

Hlavními producenty jsou však grampozitivní bakterie, a to hlavně některé kmeny bakterií mléčného kvašení (LAB). Jsou přítomny v přirozené mikrobiotě vstupní suroviny (např. mléka) nebo jsou nezbytnou součástí startérových a doplňkových kultur u fermentovaných potravin. Za producenta zejména tyraminu a histaminu v jogurtu byl identifikován *Streptococcus thermophilus* (Gezginc et al., 2013). Izoláty z vína bývalého rodu *Lactobacillus* 30a a w53 byly označeny za producenty histaminu, putrescinu a kadaverinu (Pessione et al., 2005). Produkce histaminu v sójovém fermentovaném produktu miso je způsobena *Staphylococcus pasteurii*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus subtilis* a *Bacillus megaterium* (Kung et al., 2007). Jedná se o poměrně probádanou problematiku a bylo publikováno nespočet publikací, které identifikují bakterie produkující aminy v různých potravinách (Pessione et al., 2005; Fernández et al., 2007; Kung et al., 2007; Linares et al., 2011; Gezginc et al., 2013; Doeun et al., 2017).

1.9.3 Podmínky pro růst mikroorganismů

Růst bakterií je závislý na řadě podmínek. Jednou z možných strategií pro kontrolu koncentrace biogenních aminů je zvolit vhodné podmínky během zpracování a skladování, které regulují mikrobiální růst nebo inhibují dekarboxylázovou aktivitu. Mezi hlavní faktory se obecně řadí teplota, pH, aktivita vody, dostupnost kyslíku, koncentrace NaCl, některé přídatné či konzervační látky, konkurenceschopnost mezi mikroorganismy nebo vhodné metody balení či ozařování. Vhodná kombinace metod s ohledem na danou potravinu poté může eliminovat množství aminů a zajistit vyšší bezpečnost potraviny (Naila et al., 2010; Chong et al., 2011).

Chlazení a mražení

Nejběžnější a také nejvíce studovanou metodou, která ovlivňuje produkci BA, je regulace teplotou. Nízké teploty zpomalují mikrobiální růst a zamezují tvorbě aminů, kdy za dostatečnou je považována teplota nižší než 5 °C. Naopak skladovací teplota vyšší než 5 °C jejich růst v potravinách může podporovat, což má za následek zvýšení proteolýzy ve svalové tkáni, zvýšení enzymové aktivity dekarboxyláz. Autoři Klausen a Lund (1986) ve své studii uvádějí, že množství histaminu, kadaverinu, putrescinu a spermidinu ve sledi a makrele skladovaných při 10 °C je 2–20krát vyšší než ve vzorcích skladovaných při 2 °C za stejnou dobu. K podobným výsledkům dospěli i autoři jiné studie, kde detekovali nižší hladinu putrescinu, tyraminu a kadaverinu v sýru eidamského typu zrajícím při 5 °C ve srovnání s teplotou 10 °C (Buňková et al., 2010).

Skladování při nízkých a mrazírenských teplotách proto přispívá ke zlepšení kvality a delší trvanlivosti produktů (Callejón et al., 2015; Ruiz-Capillas a Herrero, 2019). Avšak vzhledem k tomu, že některé bakterie (např. *Photobacterium* spp.) mohou produkovat biogenní aminy i při teplotách nižších než 5 °C, nebo chlazení nemusí být dostupné, nelze tuto strategii globálně aplikovat na všechny potraviny (Emborg et al., 2006).

Vliv pH

Hodnota pH prostředí je dalším významným faktorem ovlivňující růst mikroorganismů a aktivitu enzymů. Optimální hodnota pH a tolerance vůči němu je specifická pro daný organismus. Bylo zjištěno, že optimální hodnoty dekarboxyláz jsou v rozmezí 4,0 – 5 (Moreno-Arribas a Lonvaud-Funel, 2001; Schelp et al., 2001; Rhee et al., 2002). Navíc nízké pH pravděpodobně ovlivňuje expresi genu kódující dekarboxylázy. Zvýšená produkce tyraminu u *Enterococcus durans* byla vyvolána indukcí exprese genů dekarboxylázy (*tdcA*) při nízkém pH. V případě neutrálního pH prostředí k expresi nedocházelo. Podobně indukované jsou i geny zapojené do produkce tyraminu a putrescinu u bakterie *L. brevis* (Linares et al., 2009, 2012).

Přídavné a konzervační látky

Další možností, jak regulovat přítomnost aminů je aplikace přídavných a konzervačních látek. Přidávání chloridu sodného je běžnou metodou sloužící k regulaci růstu patogenů a zamezení kažení potravy, kterou lze aplikovat i pro redukci BA. Bylo publikováno několik studií dokazujících snížení množství aminů pomocí chloridu sodného v různých potravinách (Chander et al., 1989; Sumner et al., 1990; Gardini et al., 2001; Roseiro et al., 2006; Linares et al., 2012). Dále bylo také prokázáno, že látky jako zázvor, česnek, cibule, červená paprika, hřebíček, skořice, ale i cukr a glycin zpomalují produkci biogenních aminů (Shakila et al., 1995; Bover-Cid et al., 2001; Mah a Hwang 2009; Mah et al., 2009; Naila et al., 2010).

Ozařování

Ozařování je jednou z metod umožňujících prodloužení trvanlivosti potravin bez použití přídavných chemických látek. Nejčastěji se využívá gama záření. Jde o bezpečnou metodu schválenou ve více jak 50 zemích (do 10 kGy), která se využívá k ošetření několika druhů potravin, jako jsou masné výrobky, ryby, mořské plody a čerstvá zelenina (WHO, 1994; Rabie et al., 2010). Primární mechanismus účinku ionizujícího záření spočívá v deaktivaci mikroorganismu poškozením nukleových kyselin (Farkas, 2006; Chong et al., 2011).

V roce 2004 byla provedena rozsáhlá studie na toto téma. Autoři článku prokázali degradaci BA v modelovém systému (vodní roztok) v rozmezí 5 až 100 % během ozáření při 2,5; 5; 10; 20 a 25 kGy (Kim et al., 2004). Další publikace popisují účinky záření na jednotlivé potraviny. K redukci aminů došlo v mletém vepřovém a hovězím mase, ve feferonkových klobásách nebo ve fermentované sójové pastě (Kim et al., 2005a, 2005b; Min et al., 2007; Naila et al., 2010). Nevýhodou je, že vyšší dávky záření mohou ovlivňovat organoleptické vlastnosti potravin (Schirmer et al., 2009).

Balení

Populární technikou konzervace je balení v modifikované atmosféře. Principem je změna složení plynu, který obklopuje balený potravinářský výrobek. Obvykle se využívá kyslík, dusík a oxid uhličitý a jejich společné kombinace (Chong et al., 2011).

Významný vliv na redukci biogenních aminů má oxid uhličitý. Jedná se o plyn s bakteriostatickými a fungistatickými vlastnostmi a může zpomalovat růstovou křivku mikroorganismů s dekarboxylázovou aktivitou. Na druhou stranu schopnost produkce aminů je ověřena jak u anaerobních, tak i aerobních bakterií. Navíc bylo zjištěno, že enzym histidindekarboxyláza je více účinný v nepřítomnosti kyslíku, zatímco histamináza (enzym schopný oxidovat histamin) je účinná v aerobním prostředí (Kapeller-Adler, 1941). Z tohoto důvodu je velmi

obtížné přesně určit složení plynu, a zajistit rovnováhu mezi mikrobiální růstem a aktivitou enzymů (Naila et al., 2010; Chong et al., 2011).

Aplikace mikroorganismů

Další strategie spočívá nejen v ovlivňování tvorby aminů, ale také ve schopnosti řízeně odbourávat už vytvořené aminy. Mezi tyto metody řadíme aplikaci startérových nebo doplňkových kultur (Ruiz-Capillas a Herrero, 2019; Visciano et al., 2020).

Při výrobě fermentovaných potravin se ke vstupní surovině obvykle přidává startérová kultura. Důvodem je urychlení procesu fermentace, získání lepší skladovatelnosti a žádoucích strukturních a organoleptických vlastností (Leroy a De Vuyst, 2004). Komerční startérové kultury nejčastěji využívají směs kmenů bakterií mléčného kvašení, stafylokoků a mikrokoků (Hugas a Monfort, 1997). Avšak tyto kultury mohou být producenty biogenních aminů. Vzhledem k tomu, že během fermentace je tvorba biogenních aminů často ovlivněna těmito kulturami, je snaha nelézt vhodnější kandidáty (Chong et al., 2011). První možností je aplikace bakterií, které nejsou schopné dekarboxylovat aminokyseliny na biogenní aminy, případně bakterií s nízkou dekarboxylázovou aktivitou. Druhou možností je výběr bakterií s aminooxidujícími enzymy, které naopak aktivně přispívají k redukci aminů. Existují také bakterie, které splňují obě tyto podmínky (Naila et al., 2010).

1.10 Mikroorganismy se schopností degradovat aminy

Spolu se vzrůstajícím trendem aplikace startérových a doplňkových kultur při výrobě fermentovaných produktů je vhodné vybírat takové mikroorganismy, které jsou schopné degradovat biogenní aminy. Tyto bakterie však vyžadují optimální růstové podmínky, aby mohly dominovat nad bakteriemi produkujícími biogenní aminy a kontaminanty (Xu et al., 2010; Naila et al., 2010).

Existuje velké množství publikací zabývajících se identifikací aminooxidujících mikroorganismů. V roce 1998 byl proveden screening potravinových izolátů na schopnost degradovat tyramin a histamin *in vitro*. Autoři článku uvádí aktivitu enzymu tyraminoxidáza u kmenů *Pediococcus acidilactici*, *Rhodococcus* sp., *Arthrobacter* sp., *Micrococcus* sp., *Brevibacterium linens*, a *Geotrichum candidum*. V případě laktobacilů (a nových rodů odvozených od nich) nebyla prokázána významná degradace histaminu ani tyraminu (Leuschner et al., 1998). V pozdějších publikacích však byly publikovány studie s odlišným tvrzením týkající se laktobacilů a reklasifikovaných rodů – viz podkapitola 1.10.1 Bakterie mléčného kvašení.

V současné době bylo nalezeno nespočet mikroorganismů podílejících se na odbourávání aminů v modelovém systému nebo v potravinách. Konkrétně

se jedná například o *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus carnosus*, *Staphylococcus xylosus*, *Staphylococcus intermedius*, *Lacticaseibacillus casei* (dříve *Lactobacillus casei*), *Lactiplantibacillus plantarum* (dříve *Lactobacillus plantarum*), *Lentilactobacillus hilgardii* (dříve *Lactobacillus hilgardii*), *Kocuria varians* nebo *Micrococcus varians* či *Pediococcus acidilactici* (Martuscelli et al., 2000; Gardini et al., 2002; Zaman et al., 2010, 2011; Herrero-Fresno et al., 2012; Capozzi et al., 2012; Alvarez a Moreno-Arribas, 2014; Callejón et al., 2014; Eom et al., 2015).

1.10.1 Bakterie mléčného kvašení

Významné postavení ve strategiích zabývajících se redukcí BA zaujímají bakterie mléčného kvašení (LAB). Jedná se o heterogenní skupinu, která má společné morfologické, metabolické a fyziologické znaky. Bakterie zahrnuté ve skupině jsou grampozitivní, nesporulující, anaerobní (ale aerotolerantní) koky nebo tyčinky produkující kyselinu mléčnou jako hlavní konečný produkt během fermentace sacharidů (Salminen et al., 2004).

LAB mají dlouhou historii bezpečného použití ve fermentačních procesech, jsou součástí přirozené mikrobioty fermentovaných potravin a také střevního mikrobiotu člověka. Výhodou je i skutečnost, že drtivá většina má status „Generally Recognized As Safe“ (GRAS) podle amerického Úřadu pro kontrolu potravin a léčiv (FDA) a Evropský úřad pro bezpečnost potravin (EFSA) rovněž udělil status „Qualified Presumption of Safety“ (QPS) velkému množství LAB zařazených do rodů *Carnobacterium*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus* a bývalého rodu *Lactobacillus* reklasifikovaného do 25 nových rodů (EFSA, 2020; Barcenilla et al., 2022). Kromě toho LAB produkují různé mikrobicidní sloučeniny včetně organických kyselin, diacetylu, reuterinu a mikrobiálních proteinů bakteriocinů, které také těmto LAB pomáhají soutěžit s nefermentujícími mikroby a inhibovat růst aminoprodukcujících mikroorganismů. Další výhodou jsou jejich probiotické vlastnosti (Gálvez et al., 2010; Özogul a Hamed, 2018).

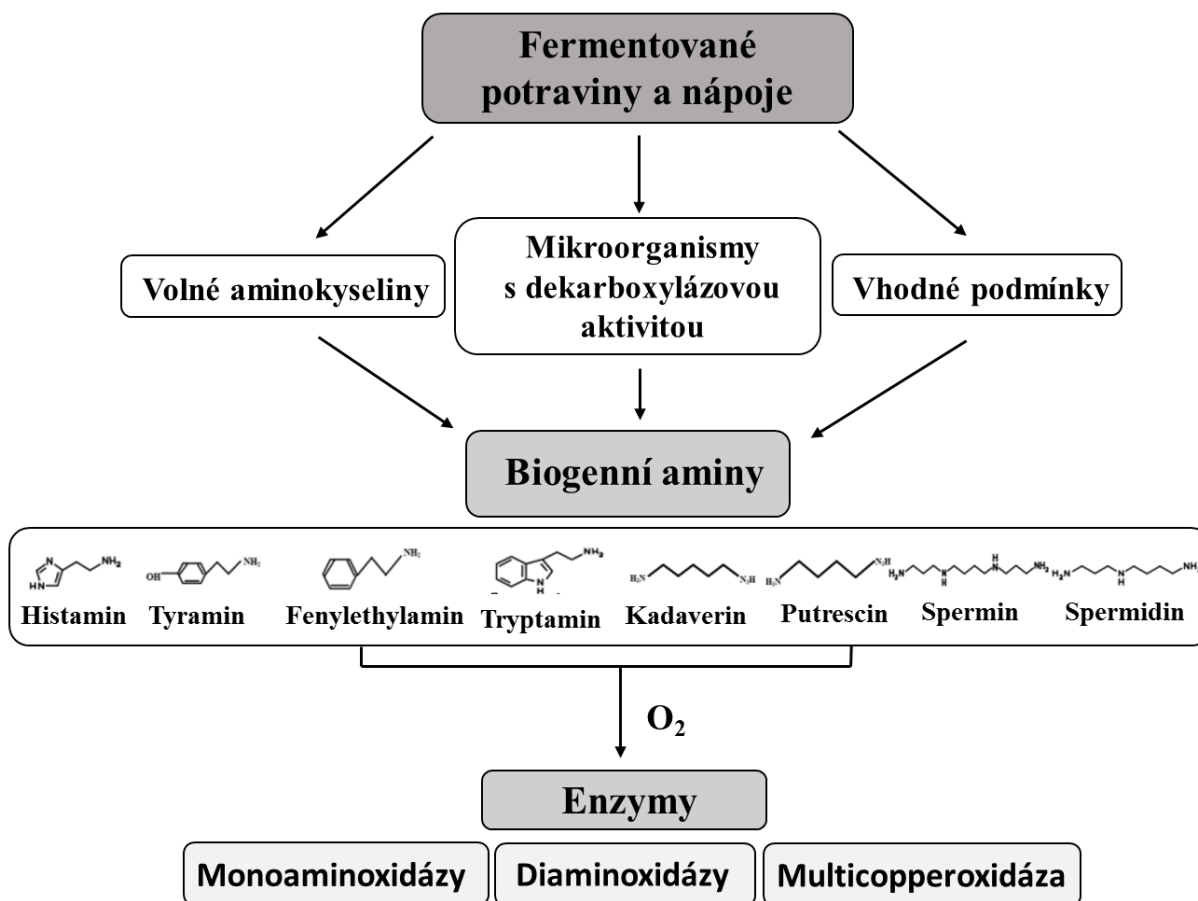
Byly nalezeny kmeny *Latilactobacillus sakei* (dříve *Lactobacillus sakei*) izolovaných z rybí pasty, které jsou schopné rozložit histamin v modelovém systému a fermentované rybí kaši (Dapkevicius et al., 2000). Za degradéry byly také označeny některé kmeny *Lacticaseibacillus casei* (dříve *Lactobacillus casei*) a *Lactiplantibacillus plantarum* (dříve *Lactobacillus plantarum*) získané z fermentovaných klobás (Fadda et al., 2001). Herrero-Fresno et al. (2012) identifikovali (sekvenováním 16S rRNA) 17 izolátů ze sýrů, které byly schopny degradovat tyramin a histamin v bujónu, jako kmeny *Lacticaseibacillus casei*. U dvou kmenů (*Lacticaseibacillus casei* 4aEM76 a 5b) dokázali snížení akumulace BA až o 40 % v modelu minisýru podobného Cabrales.

Callejón et al. v roce 2014 provedli rozsáhlou studii zabývající se degradací BA bakteriemi mléčného kvašení izolovaných z vína. 40 kmenů z celkových 76 testovaných kmenů vykazovalo degradační aktivitu vůči směsi BA (tyraminu, histaminu a putrescinu) v nativním gelu. Pozitivní reakce byly zjištěny u některých kmenů z druhu *Enterococcus faecium*, *Levilactobacillus brevis* (dříve *Lactobacillus brevis*), *Secundilactobacillus collinoides* (dříve *Lactobacillus collinoides*), *Lactobacillus delbrueckii*, *Companilactobacillus farciminis* (dříve *Lactobacillus farciminis*), *Lentilactobacillus hilgardii* (dříve *Lactobacillus hilgardii*), *Liquorilactobacillus mali* (dříve *Lactobacillus mali*), *Lacticaseibacillus paracasei* (dříve *Lactobacillus paracasei*), *Lactiplantibacillus pentosus* (dříve *Lactobacillus pentosus*), *Lactiplantibacillus plantarum* (dříve *Lactobacillus plantarum*), *Liquorilactobacillus vini* (dříve *Lactobacillus vini*), *Pediococcus acidilactici*, *Pediococcus parvulus* a *Pediococcus pentosaceus*. Vybrané kmeny následně autoři testovali v médiu a ve víně. Největší degradační schopnost ve víně vykazoval kmen *Lactiplantibacillus plantarum*, kdy došlo k degradaci histaminu a tyraminu až o 30 %, putrescinu až o 41 % po 1 týdnu (Callejón et al., 2014).

Avšak, což potvrzuje i výše uvedená studie z roku 2014, ne všechny LAB dokážou BA degradovat. Například některé kmeny patřící k druhům *Levilactobacillus brevis* (dříve *Lactobacillus brevis*) a *Lentilactobacillus hilgardii* (dříve *Lactobacillus hilgardii*) jsou producenty BA (Landete et al., 2007; Herrero-Fresno et al., 2012; Li a Lu, 2020).

1.11 Enzymy podílející se na odbourávání BA u bakterií

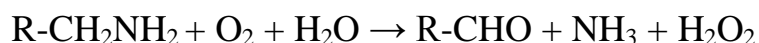
Ačkoliv enzymatická redukce aminů u člověka je dobře charakterizována, množství informací týkajících se identifikace mikrobiálního mechanismu redukce biogenních aminů v potravinách je velmi vzácná. Většina dosavadních studií tyto enzymatické aktivity připisovala především monoaminoxidázám (MAO) a diaminoxidázám (DAO). Toto tvrzení ve své studii vyvrátili autoři Callejón et al. (2014), kteří dokázali přítomnost enzymu multicopperoxidázy (MCO), která je také schopná degradovat BA u bakterií mléčného kvašení. Teoretický model znázorňující vztah mezi degradujícími enzymy a BA je popsán na Obr. 1.7.



Obr. 1.7: Předpokládaný vztah mezi biogenními aminy a enzymy, které je degradují a faktory ovlivňující jejich tvorbu ve fermentovaných potravinách a nápojích (upraveno podle Li a Lu, 2020).

1.11.1 Aminooxidázy

Aminooxidázy (AO) patří do třídy oxidoreduktáz, která zahrnuje rozšířenou skupinu monoaminoxidázy obsahující flavin (MAO) a diaminoxidázy (DAO). AO za přítomnosti molekulárního kyslíku rozkládají BA na odpovídající aldehyd, amoniak a peroxid vodíku podle následující rovnice (Li a Lu, 2020):



První poznatky o AO nacházejících se v mikroorganismech pochází ze 70. let 20. století, kdy tým vědců Yamada et al. (1965a, 1965b, 1967) purifikovali a charakterizovali aminooxidázu z *Aspergillus niger*, putrescinoxidázu z *Kocuria rosea* (dříve *Micrococcus rubens*) a tyraminoxidázu z *Micrococcus luteus* (dříve *Sarcina lutea*). Dále byla popsána membránově vázaná monoaminoxidáza katalyzující degradaci tyraminu, oktopaminu, dopaminu a norepinefrinu u gramnegativních bakterií (Murooka et al., 1979). U *Aspergillus niger* byla

nalezena a identifikována nová monoaminoxidáza, které je prototypem dvou savčích isoform MAO-A a MAO-B (Schilling et al., 1995). Sekiguchi et al. (2004) purifikovali a identifikovali histaminoxidázu z aktinobakterie *Arthrobacter crystallopoietes* KAIT-B-007. V roce 2015 v další publikaci byla charakterizována putrescinoxidáza izolovaná z *Kocuria varians* LTH 1540. Autoři práce zjistili, že optimální teplota a pH je 45 °C a 8,5. V případě substrátové specifity enzym dokázal oxidovat diaminy (putrescin a kadaverin), v menší míře také polyaminy (spermidin), avšak nedegradoval monoaminy (Callejón et al., 2015).

1.11.2 Lakázy (multicopperoxidázy)

Dalšími degradačními enzymy jsou lakázy, které se řadí do rozmanité skupiny multicopperoxidáz rozšířených především u hub, vyšších rostlin a bakterií. Jejich katalytické centrum obsahuje čtyři reaktivní atomy mědi, což jim dává charakteristickou modrou barvu (Riva, 2006). Tyto enzymy zprostředkovávají oxidaci široké škály substrátů např. fenolů, jako jsou methoxyfenoly, polyfenoly a nefenolových substrátů, včetně aromatických aminů, arylaminů, anilinů, thiolů a některých kovových komplexů kyanidů za současné redukce molekulárního kyslíku na vodu. U hub jsou lakázy součástí enzymatických drah řady fyziologických rolí, včetně morfogeneze, interakce patogenní houby s rostlinným hostitelem, obrany proti stresu a degradace ligninu. U rostlin se nachází ve dřevě, kde se účastní biosyntézy ligninu (Bao et al., 1993; Thurston, 1994; Giardina et al., 2010). Vzhledem k jejich široké enzymové specifitě jsou zapojeny v biotechnologických aplikacích, konkrétně při zpracování papíru a celulózy, v textilním a petrochemickém průmyslu nebo bioremediaci kontaminovaných půd a detoxikaci průmyslových odpadních vod. Navíc se označují za ekologické enzymy, díky tomu, že produkují jako jediný vedlejší produkt vodu (Riva, 2006; Callejón et al., 2017).

I přestože jsou enzymy MCO v přírodě široce rozšířeny, možnost jejich využití při redukci biogenních aminů v potravinách byla publikována až v roce 2014. Callejón et al. (2014) prokázali přítomnost MCO u *Lactiplantibacillus plantarum* (dříve *Lactobacillus plantarum*) a *Pediococcus acidilactici* izolovaných z vín a označili je za enzymy odpovědné za eliminaci BA. Autoři v pozdějších publikacích purifikovali a následně identifikovali a charakterizovali tyto enzymy, které specifikovali jako lakázy. Enzymy vykazovaly spektroskopické vlastnosti charakteristické pro multicopperoxidázy - intenzivní modré zabarvení, absorpční maximum při 590 nm a aktivitu vůči typickým lakázovým substrátům, a to 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonové kyselině) (ABTS) a 2,6-dimethoxyfenolu (DMP). Rekombinantní lakáza z *Lactiplantibacillus plantarum* J16 (CECT 8944) o molekulové hmotnosti kolem 62,5 kDa měla optimální pH pro katalýzu substrátu ABTS 3,5 a substrátu DMP 7,0. Optimální

pH u rekombinantní lakázy z *Pediococcus acidilactici* CECT 5930 (Lpa5930) o molekulové hmotnost 60 kDa bylo pro ABST okolo hodnoty pH 4. V obou studiích byla zkoumána degradační schopnost enzymu vůči biogenním aminům tyraminu, putrescinu a histaminu. Oba enzymy vykazovaly velmi podobnou katalytickou schopnost vůči tyraminu. Optimální teplota pro degradaci tyraminu lakázou z *Lactiplantibacillus plantarum* byla 28 °C, avšak degradační aktivita byla prokázána i při 4 °C (snížení tyraminu o 44 %). Optimální hodnota pH byla 4 a 9,5. Stejně optimální hodnoty byly zjištěny i pro rekombinantní lakázu z *Pediococcus acidilactici* (optimální pH 4 a 9,5, optimální teplota 28 °C). Rozdíl byl zjištěn v substrátové specifitě, kdy rekombinantní enzym lakáza z *Pediococcus acidilactici* není zjevně schopná degradovat histamin a putrescin, na rozdíl od rekombinantní lakázy z *Lactiplantibacillus plantarum*, která navíc katalyzuje oxidaci histaminu a putrescinu, přičemž nejlepším aminovým substrátem je stále tyramin (Callejón et al., 2016, 2017).

V současné době roste zájem o lakázy a mikroorganismy disponující těmito enzymy pro potenciální aplikaci v potravinářském průmyslu. Avšak dostupné publikace poukazují na skutečnost, že bakteriální MCO vykazují širokou substrátovou specifitu a jejich optimální pH a teplota se liší v závislosti na jednotlivých substrátech včetně BA. Navíc vyplývá, že katalytická schopnost lakáz vůči stejným BA je u jednotlivých mikroorganismů odlišná (Callejón et al., 2016, 2017; Li et al., 2020; Olmeda et al., 2021; Ni et al., 2022; Tepkasikul et al., 2022; Wang et al., 2022). Z těchto důvodů použití těchto enzymů v praxi je stále omezené. Před reálnou aplikací konkrétního kmene LAB je vždy nutné experimentálně analyzovat jeho degradační schopnost za specifických podmínek, které jsou dané konkrétní potravinovou maticí.

2. MATERIÁL A PŘÍSTROJE

2.1 Přístroje a vybavení

Analytické váhy Denver Instrument SI - 64A (USA); Aseptický laminární box Telstar (Španělsko); Automatické mikropipety Eppendorf Research (Německo); Bio Vortex V1 Biotech (Česká republika); běžné laboratorní sklo a pomůcky využívané v mikrobiologických a biochemických laboratořích, Centrifuga Eppendorf Mini Spin plus (Německo); Centrifuga Jouan MR23i (USA); Centrifuga Hettich Rotanta 460 R (Německo); Centrifuga laboratorní chlazená HERMLE Z 300 K (Hermle Labor Technik); Elektroforetická aparatura vertikální Mini-PROTEAN Tetra Cell (Česká republika); Filtry Millex GS Filter Unit 0,22 μm (Merck, Německo); Chromatografický systém Agilent 1260 Infinity II s detektorem diodového pole a fluorescenčním detektorem (USA); kolona Agilent Zorbax RRHD Eclipse Plus C18 s parametry 50 x 3,0 mm, s velikostí částic 1,8 μm (USA); Kombinovaná chladnička Beko (Turecko); Laboratorní sterilizátor Wolf SANoclav (Německo); Laboratorní váhy 440-47N KERN (Německo); pH metr inoLab pH/ION 735 se skleněnou elektrodou SenTix 81 (Německo); Mikrovlnná trouba Electrolux (ČR); TECAN Sunrise TW/TC (Tecan, Männedorf, Švýcarsko); Termostat BT 120 (Česká republika); Třepačka Vortex GENIE 2 200 V MO-BIO Laboratories, Inc. (USA).

2.2 Mikroorganismus

Pro studium degradace biogenních aminů byl zvolen bakteriální kmen *Lactocaseibacillus casei* (dříve *Lactobacillus casei*) CCDM 198 získaný ze Sbírký mlékárenských mikroorganismů Laktoflora (Culture Collection of Dairy Microorganisms – CCDM). Testovaný kmen byl vybrán na základě předcházejícího screeningu, ve kterém vykazoval největší degradační schopnost v kultivačním médiu za optimálních podmínek ve srovnání s ostatními zkoumanými degradéry.

Zmražená lyofilizovaná bakteriální kultura byla za sterilních podmínek přenesena do sterilního MRS bujónu a ponechána k anaerobní kultivaci po dobu 24 h při 30 ± 1 °C. Po 24 hodinách bylo inokulum bakterie křížovým roztěrem přeočkováno na Petriho misku s tuhým MRS agarem. Před jednotlivými metodami byl studovaný kmen z tuhé půdy asepticky resuspendován v MRS bujónu a 24 h anaerobně kultivován při 30 ± 1 °C.

2.3 Kultivační média a roztoky

2.3.1 Kultivační médium

MRS bujón

Pro potřeby disertační práce byl jako kultivační médium použit MRS (De Man, Rogosa and Sharpe) bujón o dvou různých koncentracích: s koncentrací doporučenou výrobcem (úplný MRS bujón) a s modifikovanou poloviční koncentrací (neúplný MRS bujón). Požadované množství MRS broth (Merck, Německo) bylo naváženo a rozpuštěno v 1 l destilované H₂O (Tabulka 2.1) a následně sterilizováno v autoklávu při 120 °C do dobu 20 minut.

MRS agar

52,2 g MRS broth (Merck, Německo) spolu s 20 g agaru (HiMedia, Indie) bylo rozpuštěno ve 1000 ml destilované vodě a sterilizováno v autoklávu (121 °C, 20 minut).

Tabulka 2.1 Množství MRS broth pro přípravu kultivačního média

Kultivační médium	Množství MRS broth (g)	Destilovaná H ₂ O (ml)
MRS bujón (úplný)	52,2	1000
MRS bujón (neúplný)	26,1	1000

zkratky: MRS-De Man, Rogosa and Sharpe

2.3.2 Roztok biogenních aminů

Podle Tabulky 2.2 byl připraven 20x koncentrovaný zásobní roztok biogenních aminů. Jednotlivé biogenní aminy histamin, fenylethylamin, tyramin, putrescin, kadaverin (všechny Sigma-Aldrich, Německo), byly naváženy a rozpuštěny v 1 l destilované vody a vzniklý roztok následně autoklávován (120 °C, 20 minut).

Tabulka 2.2 Množství jednotlivých biogenních aminů pro přípravu 1 l roztoku 1x koncentrovaný a 20x koncentrovaný

Biogenní aminy	1x koncentrovaný (g)	20 x koncentrovaný (g)
Tyramin	0,2	4
Putrescin	0,2	4
Kadaverin	0,2	4
Histamin	0,2	4
Fenylethylamin	0,2	4

2.3.3 Příprava zásobního roztoku cysteinu

5 g L-cysteinu hydrochlorid (Sigma-Aldrich, Německo) bylo rozpuštěno ve 100 ml destilované vody a sterilizováno mikrofiltrací přes stříkačkový filtr s porozitou 0,22 μm .

2.3.4 Fyziologický roztok

1,7 g NaCl (Lach-Ner, ČR) bylo rozpuštěno v 200 ml destilované vody a sterilizováno v autoklávu (121 $^{\circ}\text{C}$, 20 minut).

2.3.5 Roztoky pro derivatizaci dansylchloridem

Roztok dansylchloridu

1,6 g dansylchloridu (Merck, Německo) bylo rozpuštěno v 320 ml acetonu (CHROMASOLV Plus, for HPLC, $\geq 99,9\%$, Sigma-Aldrich, Německo). Roztok byl připraven vždy čerstvý před samotnou derivatizací.

Karbonátový pufr o pH 9,2

Do 230 ml roztoku A byl postupně přidáván roztok B do ustálení pH 9,2. Z takto upraveného pufru o požadovaném pH bylo odlito 240 ml a přisypáno 79,92 g K_2CO_3 (Merck, Německo). Karbonátový pufr byl připraven vždy čerstvý v den derivatizace.

Roztok A: $0,5 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1} \text{ NaHCO}_3$ (Merck, Německo) v destilované vodě.

Roztok B: $0,5 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1} \text{ Na}_2\text{CO}_3$ (Merck, Německo) v destilované vodě.

Vnitřní standard

250 mg 1,7-heptandiamin (Sigma-Aldrich, Německo) bylo rozpuštěno v 500 ml 0,6 mol·l⁻¹ HClO₄ (Merck, Německo).

2.3.6 Roztoky pro extrakci enzymu

Zásobní 0,2 mol·l⁻¹ sodnofosfátového pufru o pH 7,4

6,240 g NaH₂PO₄·2H₂O (Sigma-Aldrich, Německo) bylo rozpuštěno v cca 100 ml destilované vody, upraveno pH na 7,4 pomocí NaOH (Sigma-Aldrich, Německo) a doplněno do objemu 200 ml. Zásobní roztok byl uchováván při 4 °C a využíván pro přípravu 50 mmol·l⁻¹ sodnofosfátového pufru o pH 7,4.

50 mmol·l⁻¹ sodnofosfátový pufr o pH 7,4 s PMSF

Do 100 ml 50 mmol·l⁻¹ sodnofosfátového pufru o pH 7,4 bylo přidáno 17 mg PMSF (Sigma-Aldrich, Německo). Roztok byl uchováván v lednici.

2.3.7 Roztoky pro stanovení aktivity spektrofotometricky

100 mmol·l⁻¹ pufr octanu sodného o pH 4

0,82 g octanu sodného (CH₃COONa, Sigma-Aldrich, Německo) bylo rozpuštěno v destilované vodě, upraveno pH na požadovanou hodnotu a doplněno do objemu 100 ml. Pufr byl skladován při 4 °C.

2.3.8 Roztok pro stanovení koncentrace proteinů metodou Bradfordové

50 mg Coomassie Brilliant Blue G-250 (Sigma-Aldrich, Německo) bylo přidáno do 25 ml 95 % methanolu (Sigma-Aldrich, Německo) a 50 ml 85% H₃PO₄ (Merck, Německo) a doplněno do objemu 500 ml.

2.3.9 Roztoky pro nativní elektroforézu a detekci enzymu

Roztok 50 mmol·l⁻¹ Tris-HCl o pH 6,8

1,2114 g Tris (Sigma-Aldrich, Německo) bylo rozpuštěno v 100 ml vody, upraveno pH na 6,8 pomocí HCl (Merck, Německo) a doplněno vodou na 200 ml. Připravený roztok byl uchováván v lednici.

Pufr do zaostřovacího/stacking gelu

3,03 g Tris (Sigma-Aldrich, Německo) bylo rozpuštěno ve 40 ml vody, pH upraveno na 6,8 pomocí HCl (Merck, Německo) a doplněno destilovanou vodou na 50 ml. Uchováno se při 4 °C.

Pufr do dělicího/running gelu

36,33 g Tris (Sigma-Aldrich, Německo) bylo rozpuštěno ve 150 ml destilované vody, pH upraveno na 8,8 pomocí HCl (Merck, Německo) a doplněno vodou na 200 ml. Pufr byl uchováván při 4 °C.

Roztok 10% persíranu amonného

0,1 g APS (Sigma-Aldrich, Německo) bylo rozpuštěno v 1 ml vody. Roztok byl vždy připraven čerstvý v potřebném množství.

Elektrodový pufr pro nativní elektroforézu

6,055 g Tris (Sigma-Aldrich, Německo) a 28,823 g glycinu (Sigma-Aldrich, Německo) bylo rozpuštěno v 1 l vody, a doplněno vodou na 2 l. Roztok byl uchováván při 4 °C.

100 mmol·l⁻¹ acetátový pufr octanu sodného o pH 4 s 10 mmol·l⁻¹ 2,6-dimethoxyfenolu (DMP)

0,82 g octanu sodného (CH₃COONa, Sigma-Aldrich, Německo) bylo rozpuštěno v destilované vodě, přidáno 154,16 mg 2,6-dimethoxyfenolu (DMP, Sigma-Aldrich, Německo), upraveno pH a doplněno do objemu 100 ml. Pufr byl skladován při 4 °C.

3. METODIKA

3.1 Experiment I – Vliv vybraných faktorů na redukční schopnost *Lacticaseibacillus casei in vitro*

V rámci experimentu I byl studován vliv vybraných faktorů na redukční schopnost bakterie *Lacticaseibacillus casei* CCDM 198 *in vitro*. Všechny metody v rámci experimentu I jsou popsány v následujících podkapitolách a schematicky znázorněné na konci kapitoly na Obr. 3.1.

3.1.1 Kultivace mikroorganismu za studovaných podmínek

Do 7 ml MRS bujónu se studovanými faktory byla zaočkována 24hodinově narostlá bakteriální kultura tak, aby počáteční koncentrace buněk v bujónu byla $5,9 \pm 0,2 \log \text{CFU} \cdot \text{ml}^{-1}$. Mikroorganismus byl kultivován v MRS bujónu za studovaných podmínek a odebírán v příslušných časových intervalech tak, jak je blíže popsáno v kapitole 3.1.2 Studované faktory a časy odběrů. Jako kontrola (čas 0 h) sloužil bujón s biogenními aminy, který nebyl zaočkován bakterií. Odběry byly prováděny ve třech paralelních zkumavkách, v případě kontroly (čas 0 h) ve dvou. V případě sad s obsahem cysteinu byl navíc před zaočkováním bakterií přidán cystein o koncentraci 1 % (w/v) (Sigma-Aldrich, Německo).

V experimentálně zvolených časech byly vzorky postupně odebírány a následně centrifugovány (4600 otáček/min, 7 minut). Z každé zkumavky bylo odebráno 650 μl supernatantu do dvou mikrozkuvek a přidáno 1,2 $\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ HClO_4 v poměru 1:1 (Merck, Německo). Takto upravené vzorky byly zamrazeny při $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ a skladovány pro následující experimenty (3.1.3 Předkolonová derivatizace dansylchloridem a 3.1.4 Stanovení množství biogenních aminů pomocí HPLC/DAD).

3.1.2 Studované faktory a časy odběrů

Byly zkoumány následující faktory a jejich společné kombinace (dohromady 72 kombinací) *in vitro* pro přiblížení možných reálných podmínek během výroby fermentovaných produktů:

- pH $7,0 \pm 0,1$; $6,2 \pm 0,1$ a $5,4 \pm 0,1$
- teplota $11 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$; $23 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ a $30 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$
- koncentrace každého BA $0,2 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ a $0,4 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$
- dostupnost živin v kultivačním médiu (úplný MRS bujón – MRS; a MRS bujón s neúplným obsahem živin – $\frac{1}{2}$ MRS)
- přídavek cysteinu o výsledné koncentraci 1 % (w/v)

Vzorky byly průběžně odebírány v jednotlivých experimentálně určených časech – viz. Tabulka 3.1. V Tabulka 3.2 jsou popsány konkrétní podmínky pro jednotlivé testované sady faktorů.

Tabulka 3.1 Časy odběrů vzorků pro sledované teploty

teplota	čas odběru (h)								
11 °C	0	48	96	144	192	240	288	336	
23 °C	0	12	24	30	36	48	72	96	
30 °C	0	8	12	24	28	32	36	48	72

Tabulka 3.2 Popis jednotlivých sad s kombinacemi zkoumaných faktorů v MRS médiu.

sada	teplota (°C)	pH	kultivační médium	BA (g·l⁻¹)	cystein
1.	11, 23, 30	5,4	MRS	0,2	×
2.	11, 23, 30	5,4	MRS	0,2	přít.
3.	11, 23, 30	5,4	MRS	0,4	×
4.	11, 23, 30	5,4	MRS	0,4	přít.
5.	11, 23, 30	5,4	½ MRS	0,2	×
6.	11, 23, 30	5,4	½ MRS	0,2	přít.
7.	11, 23, 30	5,4	½ MRS	0,4	×
8.	11, 23, 30	5,4	½ MRS	0,4	přít.
9.	11, 23, 30	6,2	MRS	0,2	×
10.	11, 23, 30	6,2	MRS	0,2	přít.
11.	11, 23, 30	6,2	MRS	0,4	×
12.	11, 23, 30	6,2	MRS	0,4	přít.
13.	11, 23, 30	6,2	½ MRS	0,2	×
14.	11, 23, 30	6,2	½ MRS	0,2	přít.

sada	teplota (°C)	pH	kultivační médium	BA (g·l ⁻¹)	cystein
15.	11, 23, 30	6,2	½ MRS	0,4	×
16.	11, 23, 30	6,2	½ MRS	0,4	přít.
17.	11, 23, 30	7,0	MRS	0,2	×
18.	11, 23, 30	7,0	MRS	0,2	přít.
19.	11, 23, 30	7,0	MRS	0,4	×
20.	11, 23, 30	7,0	MRS	0,4	přít.
21.	11, 23, 30	7,0	½ MRS	0,2	×
22.	11, 23, 30	7,0	½ MRS	0,2	přít.
23.	11, 23, 30	7,0	½ MRS	0,4	×
24.	11, 23, 30	7,0	½ MRS	0,4	přít.

Zkratky: přít. – kultivační médium s přidavkem cysteinu o výsledné koncentraci 1 %; × – kultivační médium bez cysteinu; MRS – úplný MRS bujón; ½ MRS – MRS bujón se sníženým (polovičním) množstvím živin

3.1.3 Předkolonová derivatizace dansylchloridem

Vhledem k tomu, že biogenní aminy neabsorbují záření v UV/VIS oblasti spektra, před samotným stanovením množství biogenních aminů pomocí HPLC je potřeba vzorky nejprve zderivatizovat. Jako derivatizační činidlo byl použit dansylchlorid, který vytváří při pokojové teplotě stabilní barevné produkty, které je možné detekovat při vlnové délce 254 nm.

Derivatizace dansylchloridem byla provedena podle metodiky publikované v článku Dadáková et al. (2009). Do derivatizační nádoby byl napipetován 1 ml vzorku, 100 µl vnitřního standardu a 1,5 ml karbonátového pufru o pH 11,1 – 11,2. Následně byl přidán 1 ml roztoku dansylchloridu a celý obsah byl ponechán 20 h ve tmě na třepače. Po této době bylo přidáno 200 µl roztoku prolinu o koncentraci 0,9 mol·l⁻¹ (Merck, Německo) a vzorky byly ponechány další 1 h ve tmě za neustálého třepání. Po uplynutí 1 hodiny byly připipetovány 3 ml heptanu (CHROMASOLV, pro HPLC, ≥ 99%; Sigma-Aldrich, Německo) a celý obsah byl ručně třepán po dobu 3 minut. 1 ml horní heptanové vrstvy obsahující biogenní aminy byl přenesen do malých vialek a obsah byl odpařen při teplotě 65 °C pod proudem dusíku. Vzniklý odparek byl rozpuštěn

v 1,5 ml acetonitrilu (CHROMASOLV Plus, pro HPLC, $\geq 99,9\%$, Sigma-Aldrich, Německo) a uchován při teplotě $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ do samotné analýzy.

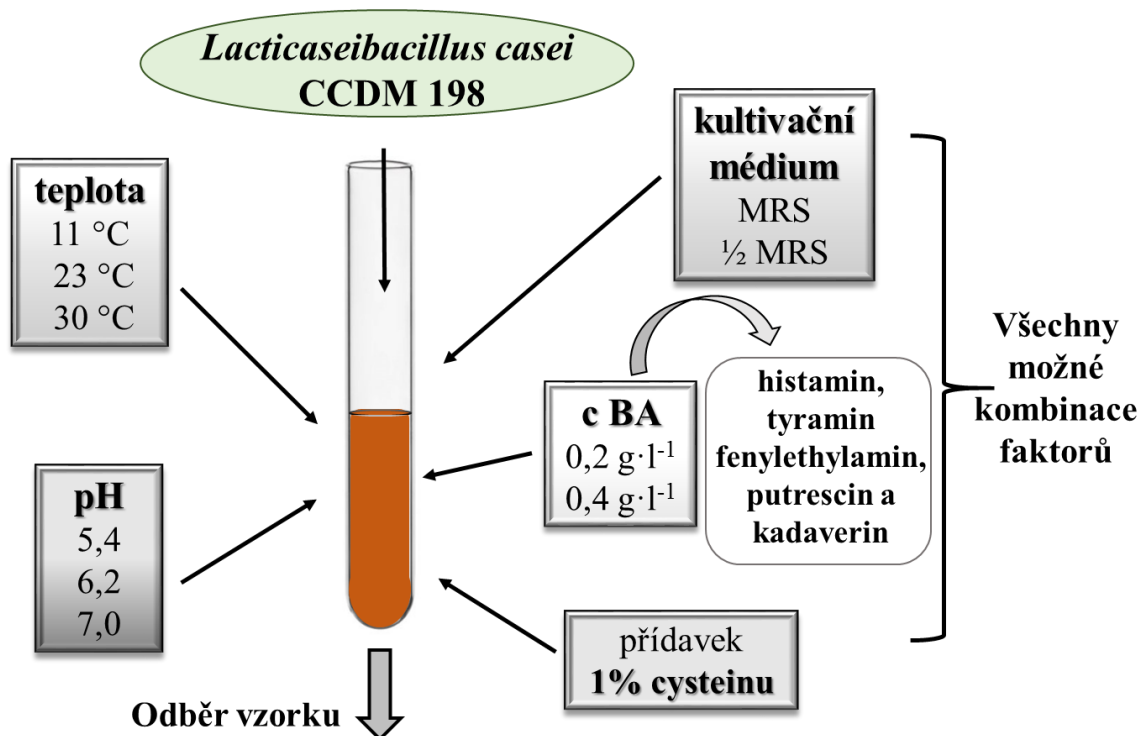
3.1.4 Stanovení množství biogenních aminů pomocí HPLC/DAD

Zderivatizované vzorky podle kapitoly 3.1.3 Předkolonová derivatizace dansylchloridem byly před samotnou analýzou zfiltrovány přes stříkačkový filtr s porozitou $0,22\text{ }\mu\text{m}$. Standardy pro HPLC byly použity: histamin, fenylethylamin, tyramin, putrescin dihydrochlorid, kadaverin, spermin, tryptamin, 1,7-diaminoheptan (všechny Sigma-Aldrich, Německo). Koncentrace biogenních aminů byly analyzovány podle publikace Smělá et al. (2004) pomocí HPLC/DAD – gradientová eluce (10% acetonitril ve vodě/acetonitril, Tabulka 3.3) na koloně Agilent Zorbax RRHD Eclipse Plus C18 s parametry $50 \times 3,0\text{ mm}$, s velikostí částic $1,8\text{ }\mu\text{m}$ (Agilent, Palo Alto, USA), průtokem kolonou $0,450\text{ ml/min}$ a teplotou $30\text{ }^{\circ}\text{C}$. Pro detekci byl použit detektor diodového pole (DAD) (vlnová délka 254 nm). Získané výsledky byly vyhodnoceny pomocí softwaru Agilent OpenLab Data Analysis. Degradace jednotlivých BA v čase byla vyjádřena jako relativní obsah jednotlivých BA v % (vztaženo k původní koncentraci v čase 0).

Tabulka 3.3 Gradientový eluční program využívaný při analýze biogenních aminů metodou HPLC.

čas (min)	10% acetonitril ve vodě (%)	acetonitril (%)
0,0	39	61
0,1	39	61
1,4	30	70
2,5	17	83
4,0	0	100
9,5	0	100
11,5	39	61
15,5	39	61

Kultivace mikroorganismu za studovaných podmínek v médiu



teplota	čas odběru (h)								
11 °C	0	48	96	144	192	240	288	336	
23 °C	0	12	24	30	36	48	72	96	
30 °C	0	8	12	24	28	32	36	48	72

Derivatizace a analýza pomocí HPLC/DAD

Obr. 3.1: Schématické shrnutí metodického postupu při studiu vlivu vybraných faktorů na redukční schopnosti bakterie *Lacticaseibacillus casei* CCDM 198 v kultivačním MRS bujónu.

3.2 Experiment II – Vliv vybraných faktorů na redukční schopnost *Lacticaseibacillus casei* v reálné potravíně

V rámci disertační práce byla také zjišťována schopnost bakteriálního kmene *Lacticaseibacillus casei* CCDM 198 redukovat všech 5 studovaných biogenních aminů v závislosti na kombinaci faktorů v reálné potravíně. Zkoumanou reálnou potravínou bylo mléko (UHT, odstředěné 0,3% Progolaktos), které je výchozí surovinou při výrobě fermentovaných mléčných výrobků, jako jsou například sýry, ve kterých byly detekovány biogenní aminy. Schématické znázornění metod v rámci tohoto experimentu je uvedeno na konci kapitoly na Obr. 3.2.

3.2.1 Kultivace mikroorganismu za vybraných podmínek v mléce a stanovení obsahu biogenních aminů

Zaočkování a kultivace studované bakterie v mléce bylo metodicky provedeno stejně jako u kultivace *in vitro*. V Tabulce 3.4 jsou uvedeny jednotlivé sady obsahující studované faktory v mléce a jejich společné kombinace (celkem 27 možných kombinací):

- pH $7,0 \pm 0,1$; $6,2 \pm 0,1$ a $5,4 \pm 0,1$
- teplota 11 ± 1 °C; 23 ± 1 °C a 30 ± 1 °C
- koncentrace každého BA $0,2 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$

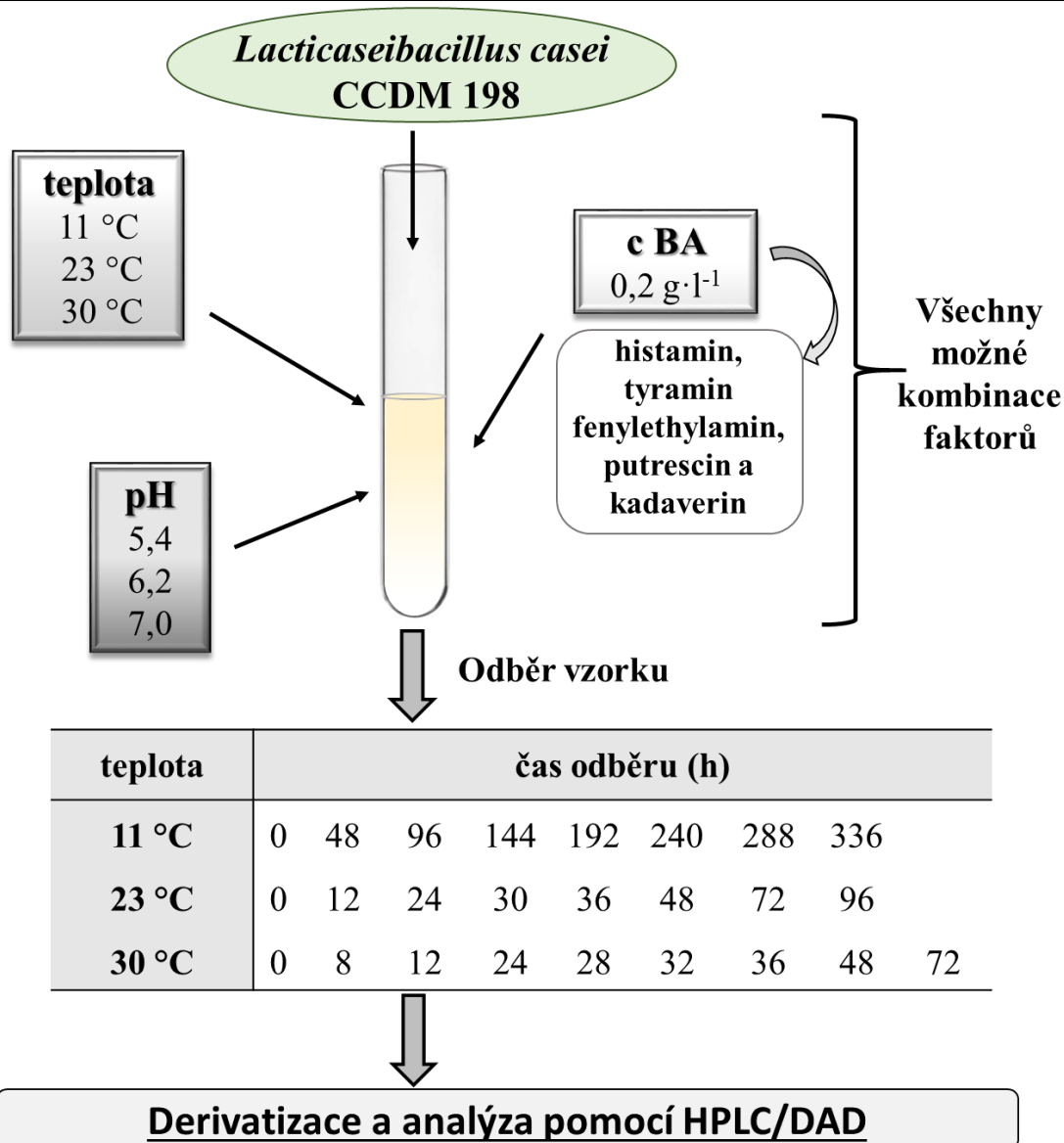
Tabulka 3.4 Sady pro studium degradace BA v mléce.

sada	teplota (°C)	pH	kultivační médium	BA ($\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$)
1.	11, 23, 30	5,4	mléko	0,2
2.	11, 23, 30	5,4	mléko	0,2
3.	11, 23, 30	5,4	mléko	0,2
4.	11, 23, 30	6,2	mléko	0,2
5.	11, 23, 30	6,2	mléko	0,2
6.	11, 23, 30	6,2	mléko	0,2
7.	11, 23, 30	7,0	mléko	0,2
8.	11, 23, 30	7,0	mléko	0,2
9.	11, 23, 30	7,0	mléko	0,2

Intervaly odběru pro jednotlivé teploty zaočkovaného mléka byly totožné s časy odběru za *in vitro* podmínek tak, jak je uvedeno v Tabulce 3.1. Vzorčky byly zcentrifugovány (4600 otáček/min, 7 minut), k supernatantu byla přidána 1,2 mol·l⁻¹ HClO₄ v poměru 1:1 (Merck, Německo) a vzorky byly zamrazeny při -80 °C.

Stanovení množství jednotlivých biogenních aminů bylo provedeno metodou HPLC po předchozí derivatizaci dansylchloridem podle metodiky v kapitolách 3.1.3 Předkolonová derivatizace dansylchloridem a 3.1.4 Stanovení množství biogenních aminů pomocí HPLC/DAD.

Kultivace mikroorganismu za studovaných podmínek v mléce



Obr. 3.2: Schématické shrnutí metodického postupu při studiu vlivu vybraných faktorů na redukční schopnosti bakterie *Lactocaseibacillus casei* CCDM 198 v mléce.

3.3 Experiment III – detekce enzymu multicopperoxidázy

Experiment III byl zaměřen na detekci enzymu multicopperoxidázy (MCO) zodpovědného za degradaci biogenních aminů u *Lactocaseibacillus casei* CCDM 198. Byly zvoleny dvě metody detekce, a to stanovení přítomnosti enzymu v polyakrylamidovém gelu a aktivity enzymu spektrometricky po předchozí kultivaci v čase 0, 24, 48 a 72 h při teplotě 30 ± 1 °C. Detekce enzymu a stanovení enzymové aktivity bylo optimalizováno a zavedeno podle metodik uvedených ve studiích Callejón et al. (2014, 2017).

3.3.1 Extrakce

50 ml bakteriální kultury v MRS bujónu narostlé přes noc (při 30 ± 1 °C) s počátečním počtem buněk $5,9 \pm 0,2$ log CFU·ml⁻¹ bylo zcentrifugováno (6 500 otáček/min, 20 minut) a následně byl pelet dvakrát promyt 25 ml 50 mmol·l⁻¹ sodnofosforečnanovým pufrům o pH 7,4 a resuspendován ve 500 µl stejného pufru s přidavkem 1 mmol·l⁻¹ fenylmethylsulfonylfluoridu (PMSF). Lýze buněk byla provedena 1 g skleněných kuliček (Sigma-Aldrich, Německo): 3 cykly po 3 minutách, mezi cykly byly vzorky chlazeny 5 minut v ledu. Po centrifugaci (12 000 otáček/min, 15 minut) byl supernatant použit ke studiu enzymu metodami popsány v kapitolách 3.3.3 Stanovení přítomnosti enzymu v polyakrylamidovém gelu a 3.3.4 Stanovení aktivity enzymu spektrofotometricky. Koncentrace proteinů byla stanovena metodou Bradfordové (3.3.2 Stanovení množství proteinů dle metody Bradfordové).

3.3.2 Stanovení množství proteinů dle metody Bradfordové

Pro stanovení koncentrace celkových proteinů ve vzorku byla použita metoda Bradfordové (Bradford, 1976). Do jednotlivých jamek 96 jamkové mikrotitrační destičky bylo napipetováno 45 µl deionizované vody, 5 µl bezbuněčného extraktu nebo v případě kalibračního standardu hovězí sérový albumin (BSA) o příslušné koncentraci a přidáno 200 µl činidla Bradfordové. Následně po 10minutové inkubaci při laboratorní teplotě byla změřena absorbance při 595 nm.

Koncentrace kalibračních standardů BSA: 0,025; 0,05; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0 mg·ml⁻¹

3.3.3 Stanovení přítomnosti enzymu v polyakrylamidovém gelu

Přítomnost enzymu MCO u *Lactocaseibacillus casei* CCDM 198 byla studována z bezbuněčného extraktu získaného po předchozí kultivaci v čase 0, 24, 48 a 72 hodin. Byla provedena nativní elektroforéza v polyakrylamidovém gelu

skládající se 4% zaostřovacího a 8% dělicího gelu. Složení obou gelů je popsáno v Tabulce 3.5. Vzorek byl smíchán se vzorkovacím pufrům (10% glycerol, 50 mmol·l⁻¹ Tris-HCl, pH 6,8, bromfenolová modř) a nanesen do jamek gelu. Napětí pro průchod vzorku zaostřovacím gelem při průběhu elektroforézy bylo 50 V, napětí pro průchod vzorku dělicím gelem bylo 80 V. Po dobu separace byla aparatura umístěna v lednici (teplota 4 °C).

Po elektroforéze byl gel umístěn do 100 mmol·l⁻¹ acetátového pufru o pH 4 s 10 mmol·l⁻¹ 2,6-dimethoxyfenolu (DMP; Sigma-Aldrich, Německo). Po 5 minutách byl roztok nahrazen novým stejným pufrům obsahujícím navíc 1 mmol·l⁻¹. CuSO₄. Přítomnost enzymu MCO byla prokázána oranžově žlutým zbarvením v místě enzymu.

Tabulka 3.5 Složení a objemy jednotlivých roztoků pro přípravu gelu (4% zaostřovacího a 8% dělicího). Objemy roztoků jsou uvedeny v ml.

typ gelu	AA/BIS 30%/0,8%	tris HCl 1,5 M, pH 8,8	tris HCl 0,5 M, pH 6,8	destilovaná voda	TEMED	APS
4% zaostřovací	0,325	-	0,625	1,475	0,005	0,05
8% dělicí	1,3	1,25	-	2,3	0,005	0,075

zkratky: AA/BIS - poměr akrylamidu a *N,N'*-methylbisakrylamidu, APS - peroxydisíran amonný, TEMED - *N,N,N',N'*-tetramethylethyldiamin

3.3.4 Stanovení aktivity enzymu spektrofotometricky

Aktivita MCO byla stanovena monitorováním nárůstu absorbance při 420 nm během oxidace substrátu ABTS (Sigma-Aldrich, USA). Měření reakční směsi 20 μl vzorku (bezbuňčný extrakt), 160 μl 100 mmol·l⁻¹ octanového pufru o pH 4 a 20 μl 5 mmol·l⁻¹ ABST (Sigma-Aldrich, Německo) bylo prováděno v 96 jamkových mikrotitračních destičkách na přístroji TECAN In-finite M200 PRO po dobu 12 minut. Jednotka enzymové aktivity byla vyjádřena jako množství enzymu potřebného k oxidaci 1 μmol ABTS za minutu. Vypočítaná enzymová aktivita byla poté vynesena jako procentuální relativní aktivita vztažena k maximální enzymatické aktivitě 100 % ve studovaných časech (0, 24, 48 a 72 h).

3.3.5 Statistické vyhodnocení dat

Pro statistické zpracování byly použity následující statistické metody: Dean Dixonův test (Q-test) pro vyloučení odlehlých hodnot, parametrická analýza rozptylu (ANOVA) pro porovnání středních hodnot testovaných skupin, nebo její neparametrické varianty (Wilcoxonův test a Kruskal-Wallisův test). Data byla vyhodnocena za pomoci softwaru Unistat® 6.5 (software Unistat, London, UK) s hladinou významnosti 0,05.

4. VÝSLEDKY

4.1 Výsledky experimentu I – Vliv vybraných faktorů na redukční schopnost *Lacticaseibacillus casei in vitro*

V předkládané disertační práci prvním cílem bylo zmapovat vliv vybraných technologických faktorů na schopnost testované kultury *Lacticaseibacillus casei* CCDM 198 degradovat vybrané biogenní aminy *in vitro*. Degradovanými aminy byly histamin, tyramin, fenylethylamin, kadaverin a putrescin. Testovanými faktory byly rozdílná teplota kultivace (11 °C; 23 °C a 30 °C), rozdílné pH kultivačního média (pH 5,4; 6,2 a 7,0), počáteční koncentrace jednotlivých BA (0,2 g·l⁻¹ a 0,4 g·l⁻¹), množství dostupných živin (úplné složení MRS bujónu – MRS; a neúplné složení MRS bujónu – ½ MRS) a čas kultivace (interval 0-72 hodin; 0-96 hodin resp. 0-336 hodin). Neúplný MRS bujón je MRS bujón připravený z poloviční navážky, která je doporučena výrobcem, a tedy se jedná o kultivační médium, které má o polovinu nižším množstvím živin. Úbytek koncentrace aminů v čase byl detekován metodou HPLC/DAD s předkolonovou derivatizací dansylchloridem. Naměřené koncentrace aminů jsou vyjádřeny v relativních procentech (rel. %) vztažené k původní koncentraci v čase 0 (100 %). Získané výsledky jsou rozděleny do následujících podkapitol podle jednotlivých BA. Poslední podkapitola shrnuje experimentálně získaná data zabývající se vlivem cysteinu na redukční schopnost *L. casei* CCDM 198 *in vitro*.

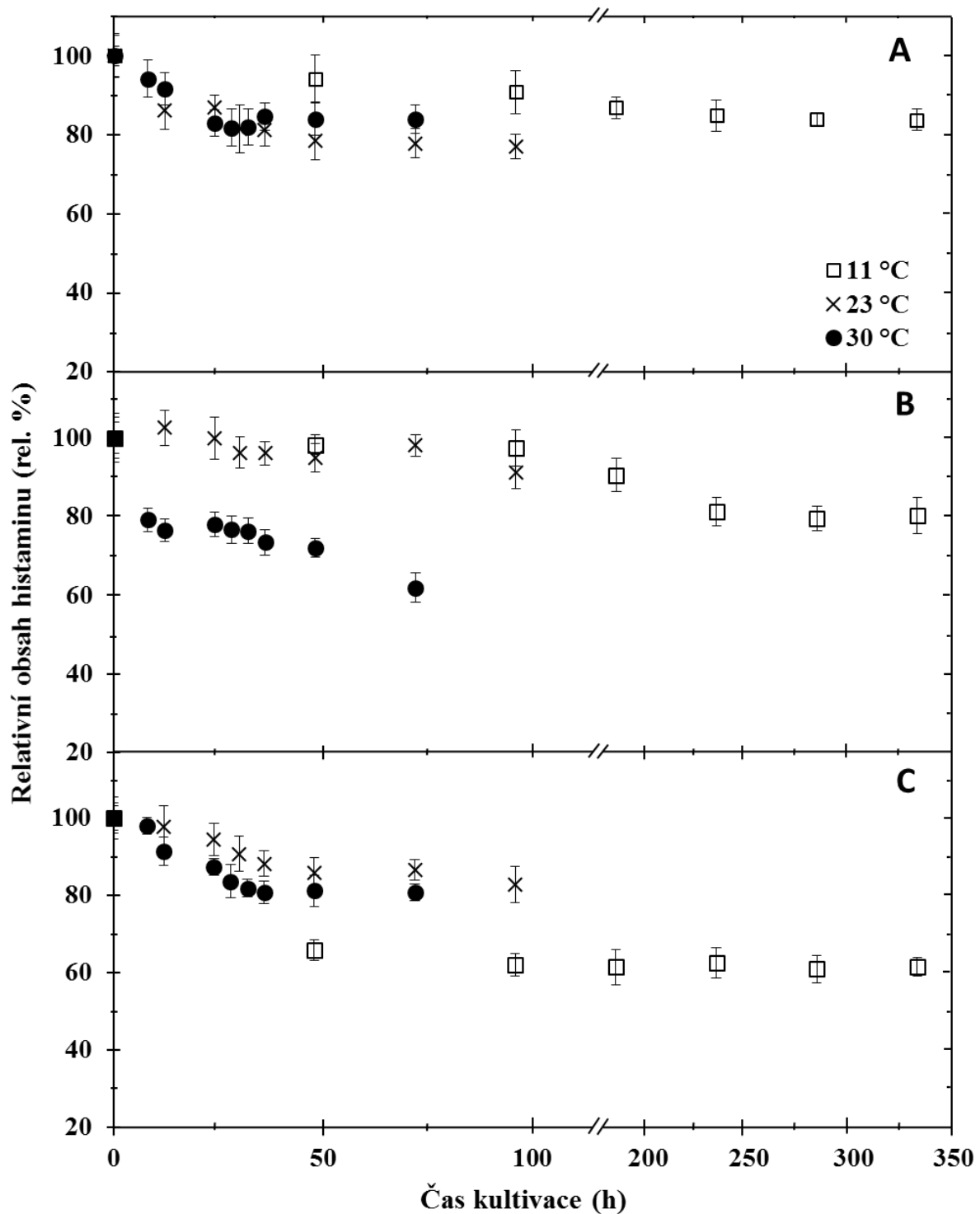
4.1.1 Vliv faktorů na redukci histaminu *in vitro*

Histamin je uváděný jako nejrizikovější biogenní amin vyskytující se v potravinách. Následující část výsledků se proto zabývá schopností bakterie *L. casei* CCDM 198 redukovat histamin v čase v závislosti na složení kultivačního média, na inkubační teplotě, pH média a na počáteční koncentraci aminu.

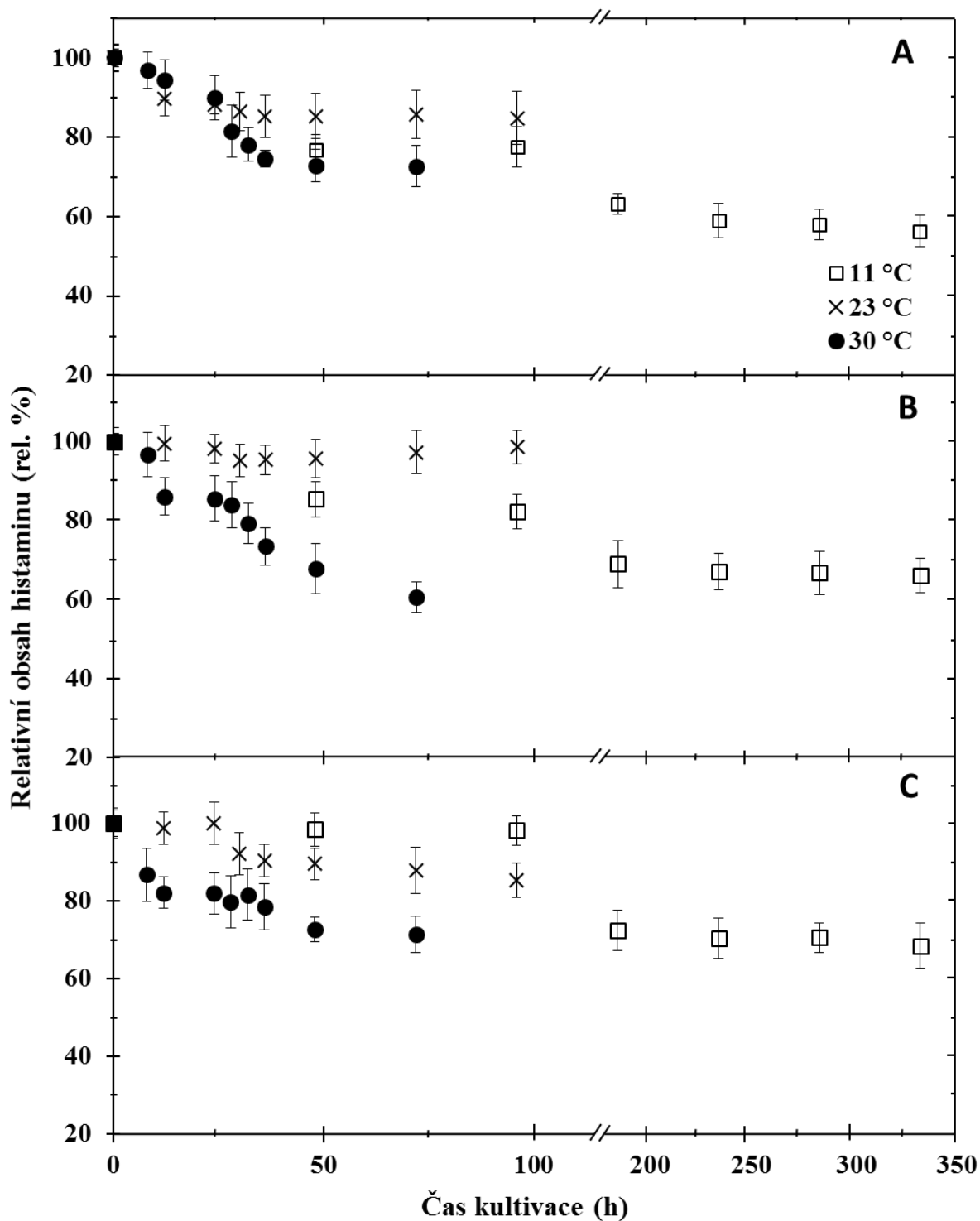
Nejprve byl zmapován vývoj histaminu v úplném MRS bujónu (Obr. 4.1 a 4.2). Obr. 4.1 popisuje celý vývoj relativního obsahu (rel. %) v úplném MRS bujónu při počáteční koncentraci histaminu 0,2 g·l⁻¹. Při teplotě 11 °C nejvyšší redukce histaminu byla zjištěna v médiu o pH 7. Za těchto podmínek došlo k signifikantnímu ($P < 0,05$) snížení histaminu už po 48 hodinách a do konce kultivace došlo k maximální redukci téměř o 40 %. Při zbylých dvou testovaných pH hodnotách redukce histaminu na konci kultivace byla okolo 20 %. Kultivační teplota 30 °C také podporovala degradační schopnosti studované bakterie. Nejvhodnějším prostředím při této teplotě bylo médium o pH 6,2, ve kterém bakterie *L. casei* CCDM 198 po 72 hodinách enzymaticky odbourávala histamin téměř o 40 %. Teplota 23 °C byla nejméně vhodnou teplotou ze studovaných teplot v úplném MRS bujónu, kdy maximální redukce histaminu dosahovala pouze 23 % při všech testovaných pH hodnotách. Na Obr. 4.2 je znázorněn průběh

degradace histaminu v úplném MRS bujónu při počáteční koncentraci $0,4 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$. Jak je patrné z grafů k nejvýznamnějšímu snížení histaminu ($P < 0,05$) došlo v médiu o pH 5,4 a teplotě $11 \text{ }^\circ\text{C}$. Významná redukce byla zjištěna už po 48 hodinách kultivace, kdy došlo ke snížení o více než 23 % a následně o více než 43 % na konci doby kultivace (po 336 hodinách) ve srovnání s počáteční koncentrací v čase 0. Koncentrace histaminu měla signifikantní vliv ($P < 0,05$) na redukcí histaminu, kdy redukce histaminu s nižší počáteční koncentrací nepřesáhla přes 17 % za stejných podmínek. Stejně jako u nižší počáteční koncentrací při teplotě $30 \text{ }^\circ\text{C}$ docházelo k významné redukci při všech studovaných teplotách v rozmezí od 28 % do 40 %. Nejméně vhodnou teplotou za těchto podmínek byla opět teplota $23 \text{ }^\circ\text{C}$.

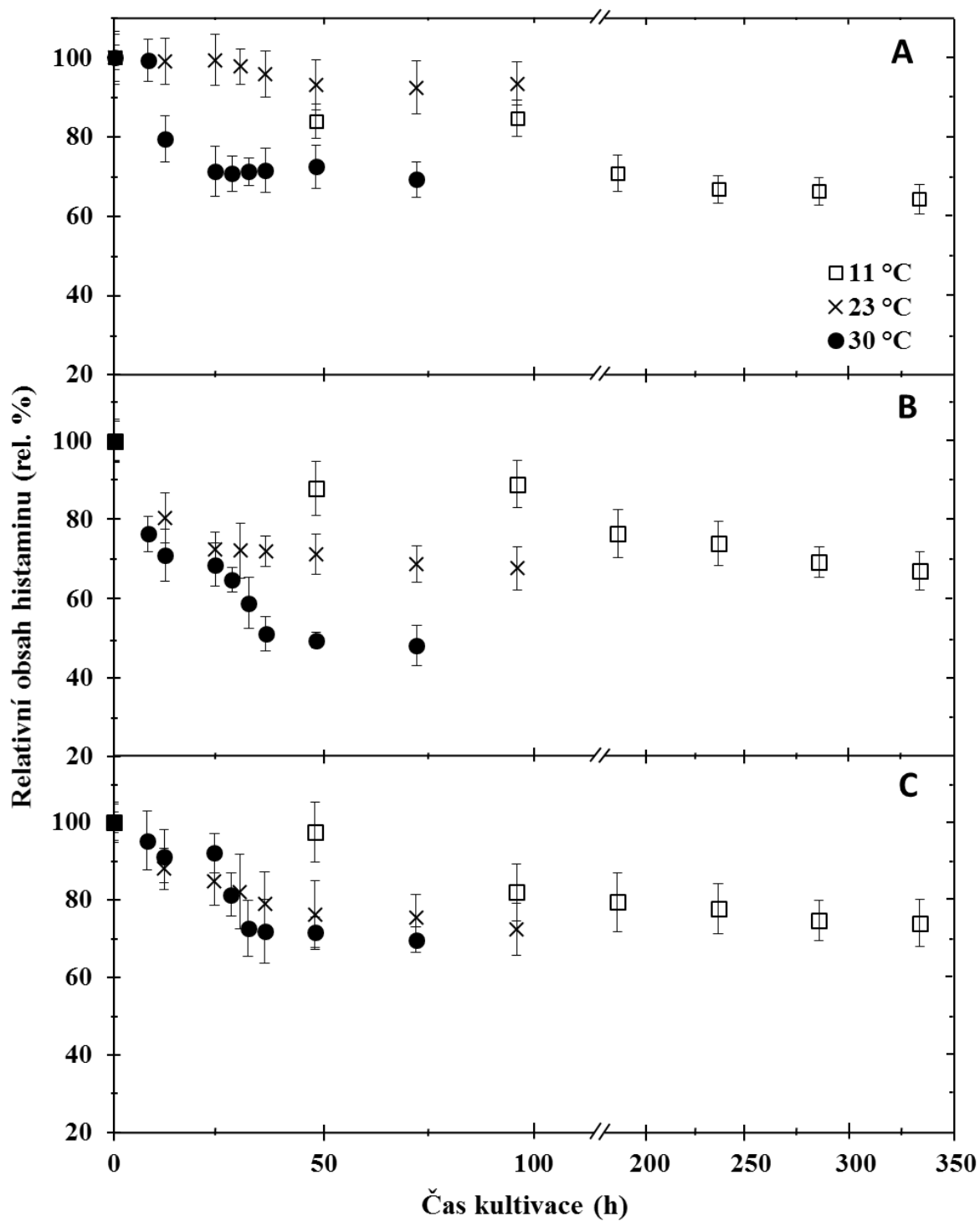
Vliv faktorů na redukční schopnost *L. casei* CCDM 198 *in vitro* byla také sledována v kultivačním médiu s neúplným složením živin (1/2 MRS). Výsledky jsou graficky shrnuty na Obr. 4.3 a 4.4. Výsledky naznačují, že *L. casei* CCDM 198 dosáhl signifikantně ($P < 0,05$) vyššího úbytku histaminu v neúplném médiu při nižší počáteční koncentraci (Obr. 4.3), kdy nejvýznamnější degradace byla detekována při teplotě $30 \text{ }^\circ\text{C}$. Po 72hodinové kultivaci došlo ke snížení množství o více než 51 % v médiu o pH 6,2 a o 30 % při zbylých dvou zkoumaných hodnotách (pH 5,4 a 7,0). Další signifikantní snížení bylo zaznamenáno při teplotě $11 \text{ }^\circ\text{C}$. Bakteriální kultura *L. casei* CCDM 198 snížila koncentraci histaminu téměř o 36 % nezávisle na pH ve srovnání v čase 0. K významné redukci došlo i při zkoumané teplotě $23 \text{ }^\circ\text{C}$ v médiu o pH 6,2 (snížení o více než 32 %) a pH 7,0 (snížení o více než 27 %) na konci kultivace (po 96 hodinách). Jak lze vyčíst z Obr. 4.4 při vyšší počáteční koncentraci nebyl ve většině případů detekován úbytek histaminu o více než 20 %, s výjimkou následujících kombinací podmínek: kultivační teplota $11 \text{ }^\circ\text{C}$ a $23 \text{ }^\circ\text{C}$ v médiu o pH 6,4 a teplota $30 \text{ }^\circ\text{C}$ v médiu o pH 5,4 (úbytek přibližně o 24 %).



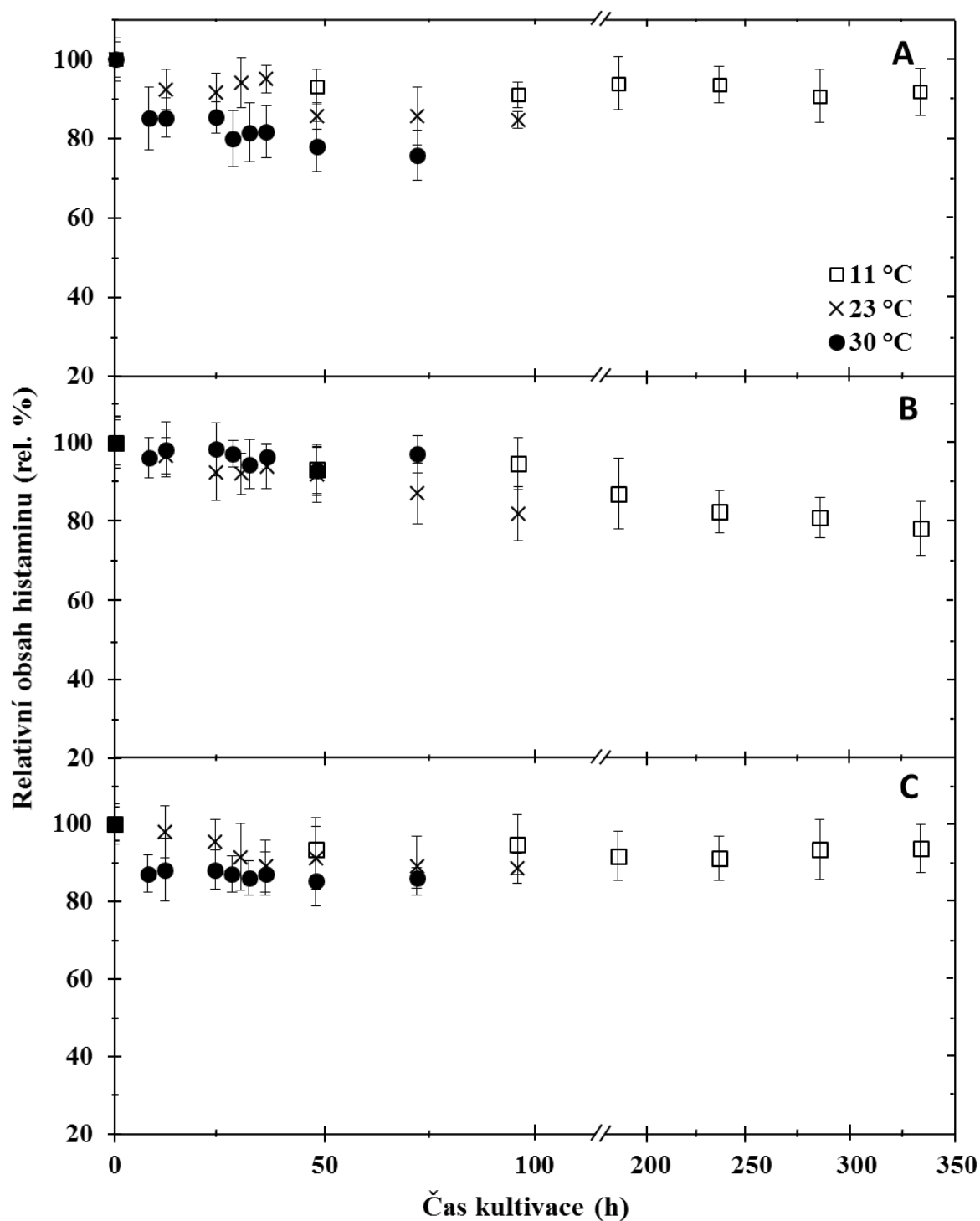
Obr. 4.1: Vývoj relativního obsahu histaminu (rel. %) při degradaci bakterií *Lactocaseibacillus casei* CCDM 198 v úplném MRS bujónu s počáteční koncentrací histaminu $0,2 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ v závislosti na době kultivace (h) pro inkubační teploty $11 \text{ }^\circ\text{C}$, $23 \text{ }^\circ\text{C}$ a $30 \text{ }^\circ\text{C}$; počáteční relativní obsah histaminu v čase nula byl vždy 100 %. Inkubace byla prováděna při pH = 5,4 (části A), pH = 6,2 (části B) a pH = 7,0 (části C). Výsledky jsou prezentovány pomocí průměrů a standardních odchylek (sloupce; n = 6).



Obr. 4.2: Vývoj relativního obsahu histaminu (rel. %) při degradaci bakterií *Lacticaseibacillus casei* CCDM 198 v úplném MRS bujónu s počáteční koncentrací histaminu $0,4 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ v závislosti na době kultivace (h) pro inkubační teploty $11 \text{ }^\circ\text{C}$, $23 \text{ }^\circ\text{C}$ a $30 \text{ }^\circ\text{C}$; počáteční relativní obsah histaminu v čase nula byl vždy 100 %. Inkubace byla prováděna při pH = 5,4 (části A), pH = 6,2 (části B) a pH = 7,0 (části C). Výsledky jsou prezentovány pomocí průměrů a standardních odchylek (sloupce; $n = 6$).



Obr. 4.3: Vývoj relativního obsahu histaminu (rel. %) při degradaci bakterií *Lactocaseibacillus casei* CCDM 198 v neúplném MRS bujónu s počáteční koncentrací histaminu $0,2 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ v závislosti na době kultivace (h) pro inkubační teploty $11 \text{ }^\circ\text{C}$, $23 \text{ }^\circ\text{C}$ a $30 \text{ }^\circ\text{C}$; počáteční relativní obsah histaminu v čase nula byl vždy 100 %. Inkubace byla prováděna při $\text{pH} = 5,4$ (části A), $\text{pH} = 6,2$ (části B) a $\text{pH} = 7,0$ (části C). Výsledky jsou prezentovány pomocí průměrů a standardních odchylek (sloupce; $n = 6$).



Obr. 4.4: Vývoj relativního obsahu histaminu (rel. %) při degradaci bakterií *Lactocaseibacillus casei* CCDM 198 v neúplném MRS bujónu s počáteční koncentrací histaminu $0,4 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ v závislosti na době kultivace (h) pro inkubační teploty $11 \text{ }^\circ\text{C}$, $23 \text{ }^\circ\text{C}$ a $30 \text{ }^\circ\text{C}$; počáteční relativní obsah histaminu v čase nula byl vždy 100 %. Inkubace byla prováděna při $\text{pH} = 5,4$ (části A), $\text{pH} = 6,2$ (části B) a $\text{pH} = 7,0$ (části C). Výsledky jsou prezentovány pomocí průměrů a standardních odchylek (sloupce; $n = 6$).

4.1.2 Vliv faktorů na redukci tyraminu *in vitro*

Dalším zkoumaným biogenním aminem byl tyramin. Po histaminu se uvádí jako druhý potenciálně nejnebezpečnější především ve spojitosti s konzumací sýrů. Vývoj relativního obsahu tyraminu (rel. %) *in vitro* v závislosti na čase kultivace, teplotě, pH kultivačního média, složení kultivačního média a na počáteční koncentraci tyraminu je graficky znázorněn na Obr. 4.5-4.8.

Ze získaných výsledků vyplývá, že degradační schopnost bakteriálního kmene *L. casei* CCDM 198 enzymaticky odbourávat tyramin za studovaných podmínek *in vitro* ve většině případů nezpůsobila větší úbytek než 20 % s výjimkou kultivace za následujících podmínek:

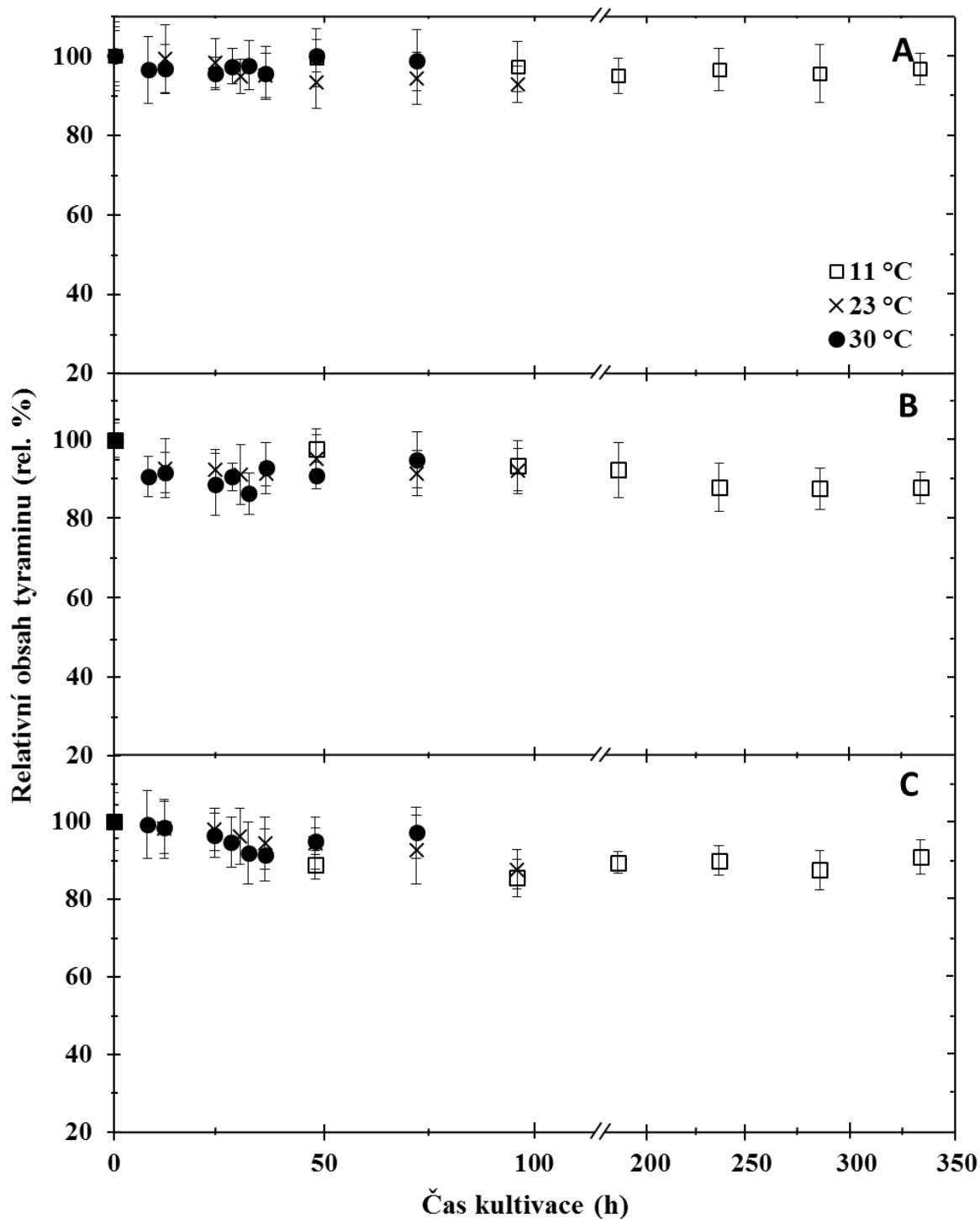
a) Kultivace v úplném MRS bujónu (Obr. 4.5 a 4.6):

- v MRS bujónu o pH 6,2 s počáteční koncentrací tyraminu $0,4 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ při kultivační teplotě $23 \text{ }^\circ\text{C}$ a $30 \text{ }^\circ\text{C}$.
- v MRS bujónu o pH 7,0 také s vyšší počáteční koncentrací tyraminu ($0,4 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$) při teplotě kultivace $11 \text{ }^\circ\text{C}$.

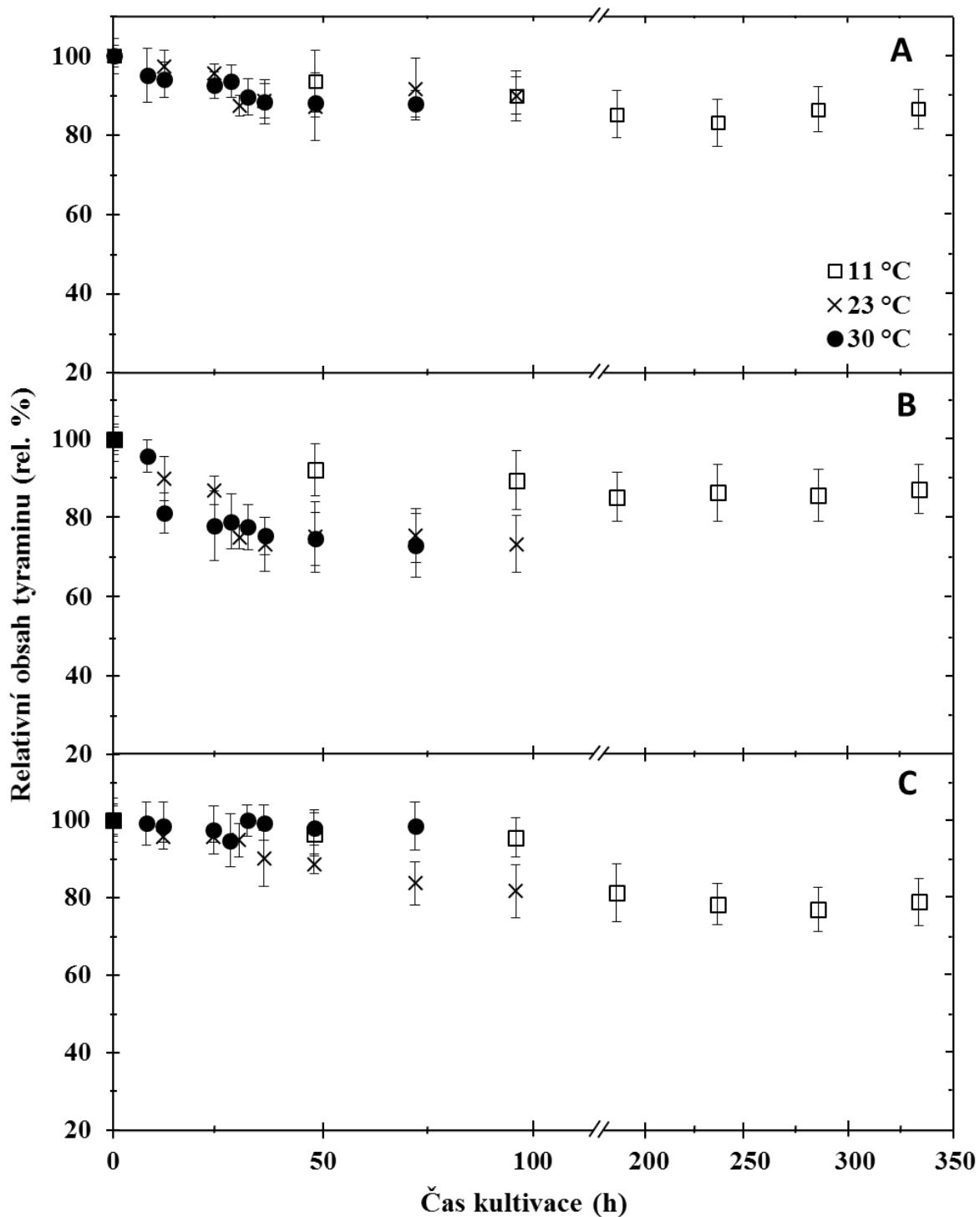
b) Kultivace v neúplném MRS bujónu (Obr. 4.7 a 4.8):

- v MRS bujónu o pH 5,4 a teplotě $30 \text{ }^\circ\text{C}$ s počáteční koncentrací tyraminu $0,2 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$.
- v MRS bujónu o pH 6,2 při teplotách $23 \text{ }^\circ\text{C}$ a $30 \text{ }^\circ\text{C}$ opět při počáteční koncentraci tyraminu $0,2 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$.

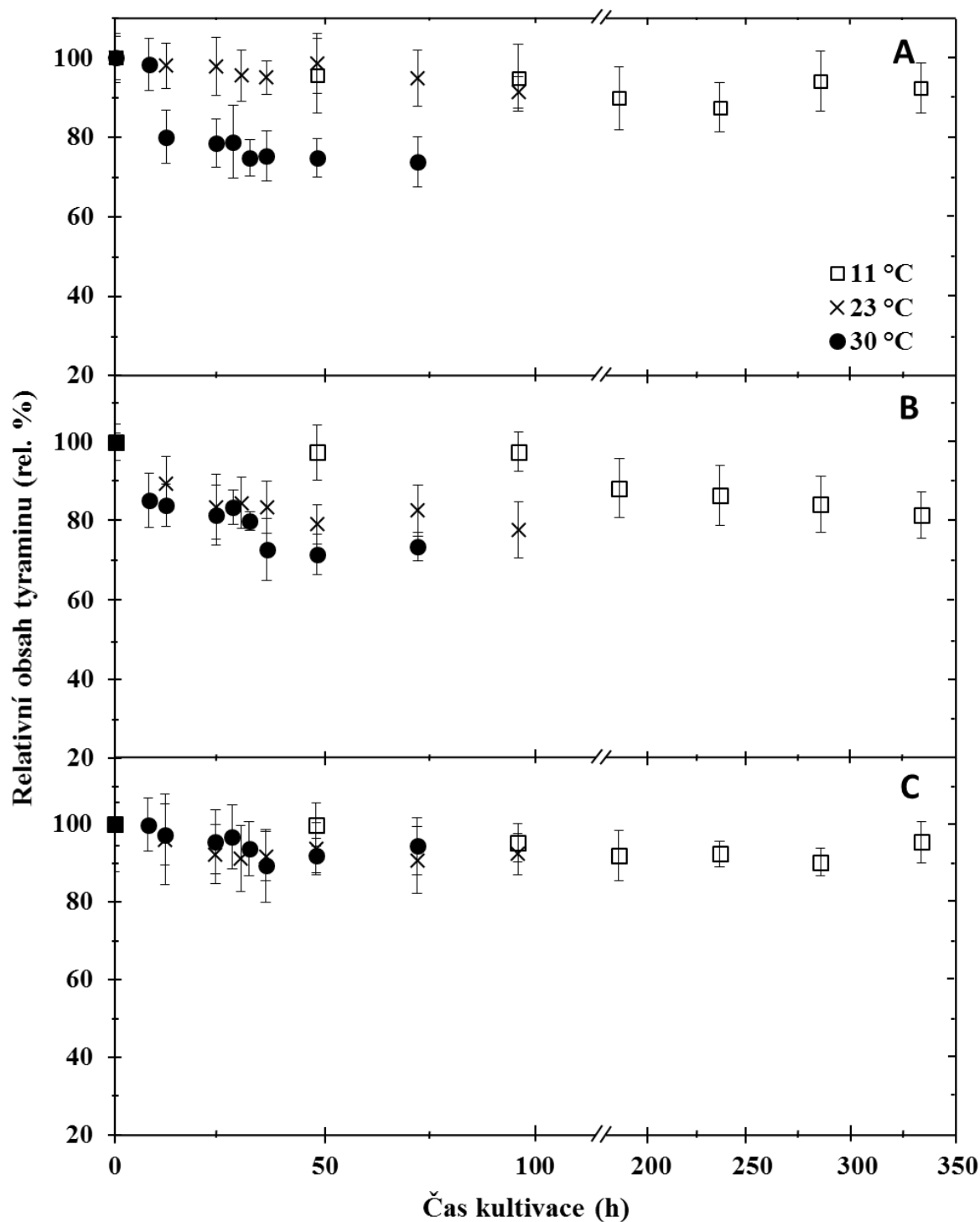
Avšak i za těchto výše uvedených podmínek nebyl zaznamenán vyšší úbytek tyraminu než o 27 % ve srovnání s počáteční koncentrací na začátku kultivace v čase 0.



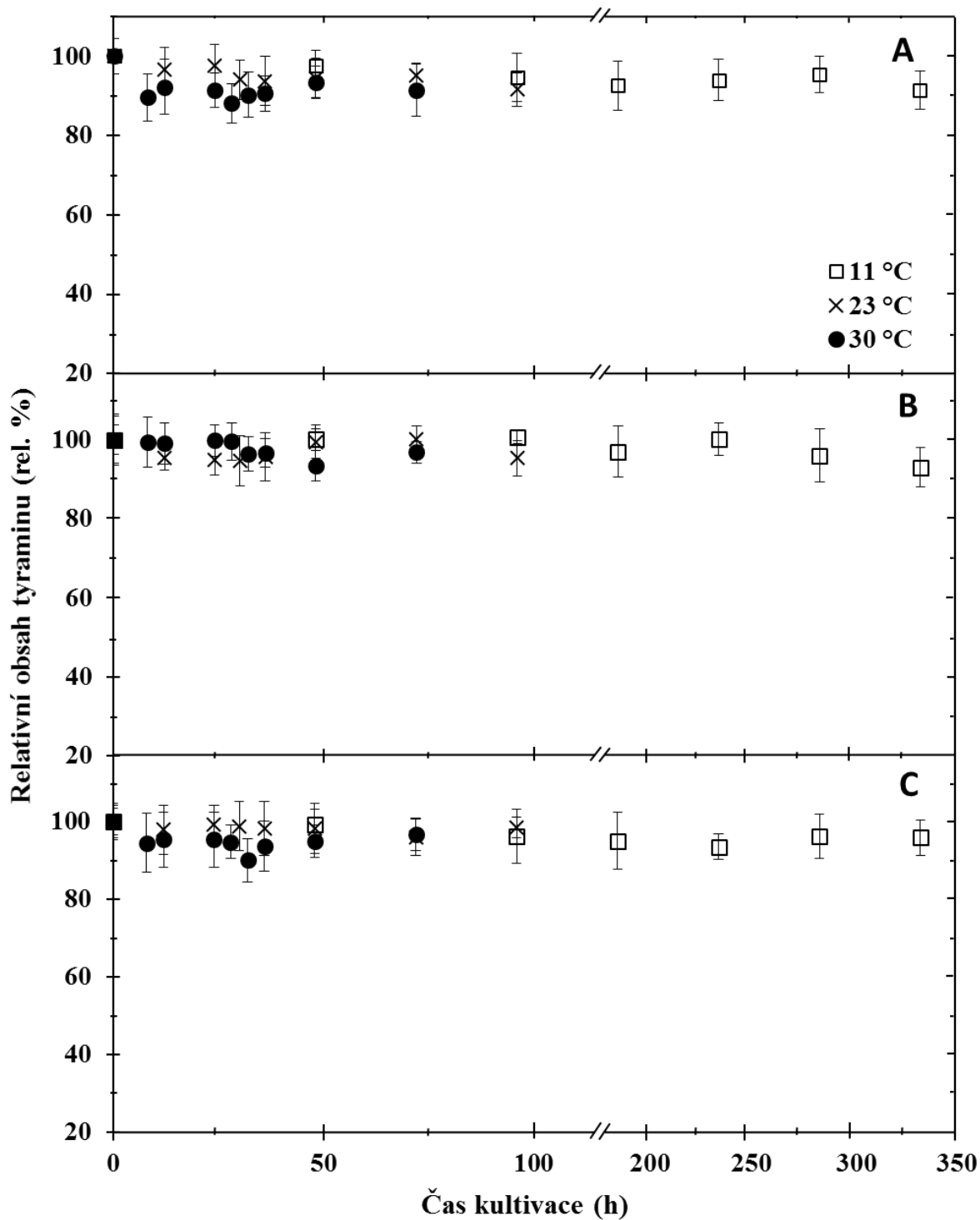
Obr. 4.5: Vývoj relativního obsahu tyraminu (rel. %) při degradaci bakterií *Lacticaseibacillus casei* CCDM 198 v úplném MRS bujónu s počáteční koncentrací tyraminu $0,2 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ v závislosti na době kultivace (h) pro inkubační teploty $11 \text{ }^\circ\text{C}$, $23 \text{ }^\circ\text{C}$ a $30 \text{ }^\circ\text{C}$; počáteční relativní obsah histaminu v čase nula byl vždy 100 %. Inkubace byla prováděna při pH = 5,4 (části A), pH = 6,2 (části B) a pH = 7,0 (části C). Výsledky jsou prezentovány pomocí průměrů a standardních odchylek (sloupce; n = 6).



Obr. 4.6: Vývoj relativního obsahu tyraminu (rel. %) při degradaci bakterií *Lactocaseibacillus casei* CCDM 198 v úplném MRS bujónu s počáteční koncentrací tyraminu $0,4 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ v závislosti na době kultivace (h) pro inkubační teploty $11 \text{ }^{\circ}\text{C}$, $23 \text{ }^{\circ}\text{C}$ a $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$; počáteční relativní obsah histaminu v čase nula byl vždy 100 %. Inkubace byla prováděna při $\text{pH} = 5,4$ (části A), $\text{pH} = 6,2$ (části B) a $\text{pH} = 7,0$ (části C). Výsledky jsou prezentovány pomocí průměrů a standardních odchylek (sloupce; $n = 6$).



Obr. 4.7: Vývoj relativního obsahu tyraminu (rel. %) při degradaci bakterií *Lactocaseibacillus casei* CCDM 198 v neúplném MRS bujónu s počáteční koncentrací tyraminu $0,2 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ v závislosti na době kultivace (h) pro inkubační teploty $11 \text{ }^\circ\text{C}$, $23 \text{ }^\circ\text{C}$ a $30 \text{ }^\circ\text{C}$; počáteční relativní obsah tyraminu v čase nula byl vždy 100 %. Inkubace byla prováděna při $\text{pH} = 5,4$ (části A), $\text{pH} = 6,2$ (části B) a $\text{pH} = 7,0$ (části C). Výsledky jsou prezentovány pomocí průměrů a standardních odchylek (sloupce; $n = 6$).



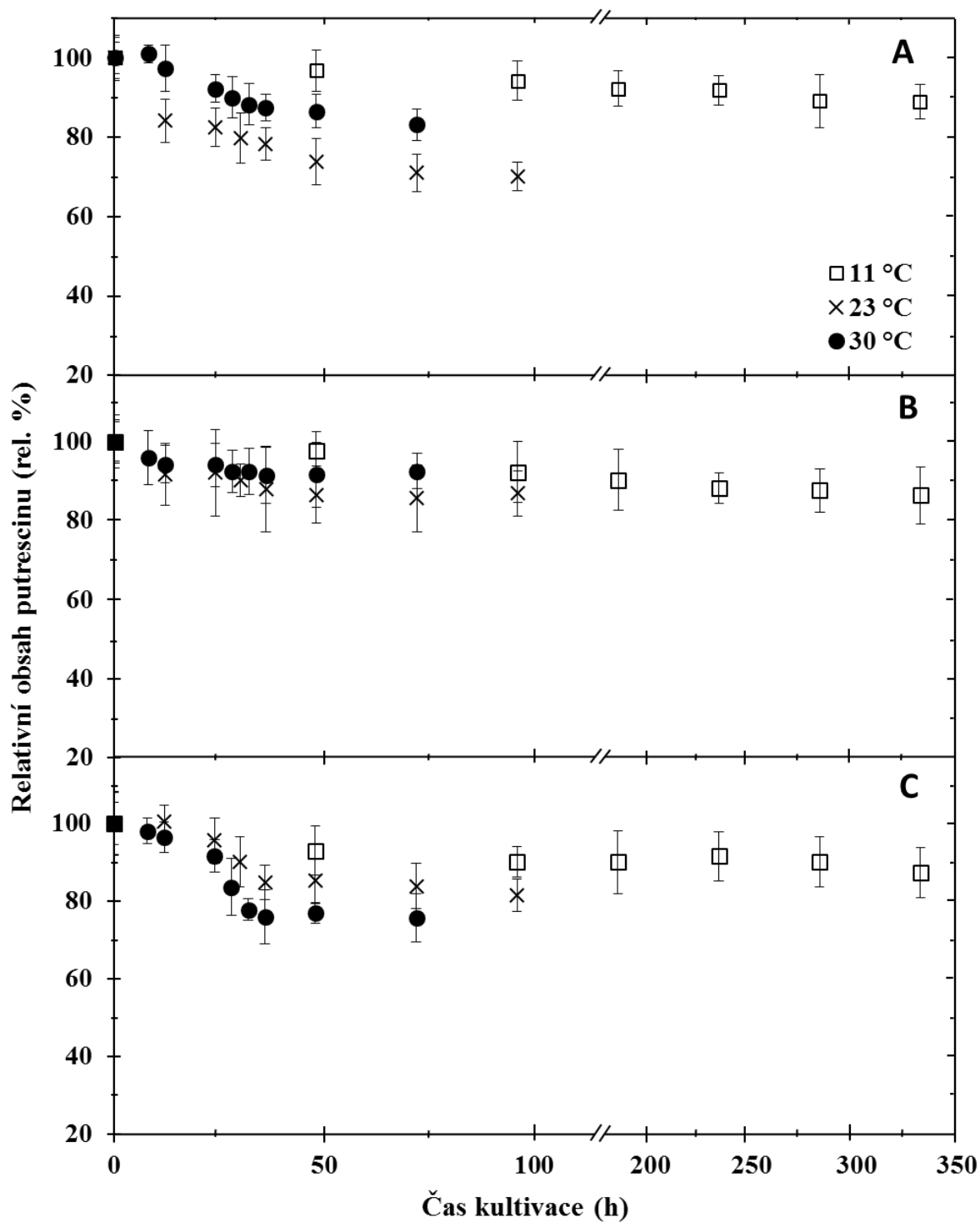
Obr. 4.8: Vývoj relativního obsahu tyraminu (rel. %) při degradaci bakterií *Lactocaseibacillus casei* CCDM 198 v neúplném MRS bujónu s počáteční koncentrací tyraminu $0,4 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ v závislosti na době kultivace (h) pro inkubační teploty 11 °C, 23 °C a 30 °C; počáteční relativní obsah tyraminu v čase nula byl vždy 100 %. Inkubace byla prováděna při pH = 5,4 (části A), pH = 6,2 (části B) a pH = 7,0 (části C). Výsledky jsou prezentovány pomocí průměrů a standardních odchylek (sloupce; n = 6).

4.1.3 Vliv faktorů na redukci putrescinu *in vitro*

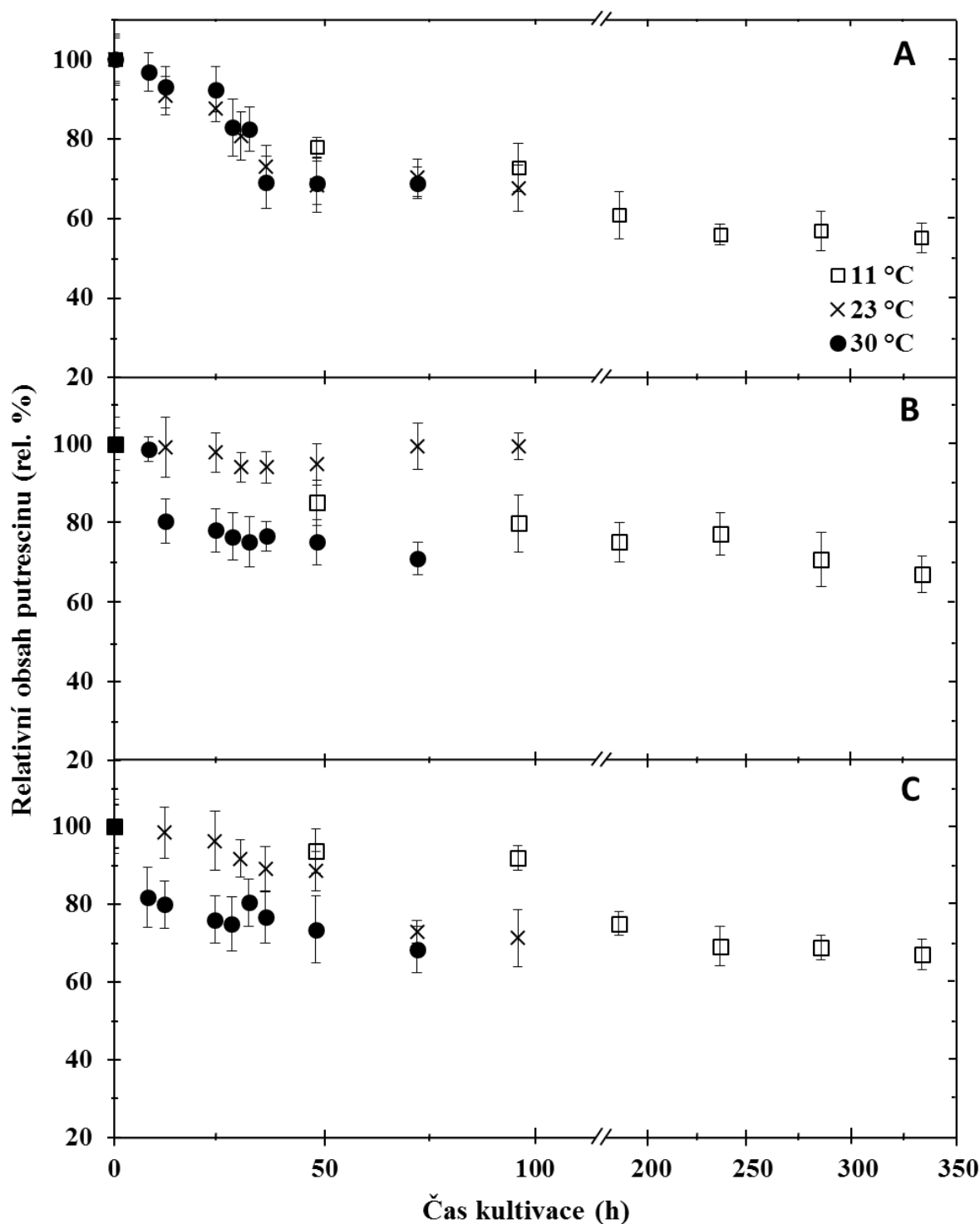
Redukční schopnost bakteriálního kmene *L. casei* CCDM 198 byla *in vitro* mapována i vůči biogennímu aminu putrescinu. Studovanými faktory bylo opět rozdílné složení kultivačního média, inkubační teplota, pH média, počáteční koncentrace putrescinu a čas odběru. Relativní obsah putrescinu (rel. %) v čase v závislosti na studovaných faktorech *in vitro* popisují grafy na Obr. 4.9-4.12. Stejně jako v předchozích případech každý Obr. 4.9-4.12 obsahuje jednotlivé grafy, které jsou rozděleny podle pH kultivačního média.

Vliv faktorů na redukci putrescinu v úplném MRS bujónu je znázorněn na Obr. 4.9 a 4.10. Získané výsledky dokazují redukci putrescinu bakterií *L. casei* CCDM 198 v průběhu inkubace při všech studovaných teplotách v úplném MRS bujónu, kdy nejvyšší redukce při jednotlivých teplotách byly dosaženy při vyšší počáteční koncentraci putrescinu ($0,4 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$). Nejvyšší úbytek za studovaných podmínek v úplném MRS bujónu byl naměřen během kultivační teploty $11 \text{ }^\circ\text{C}$. Při této teplotě *L. casei* CCDM 198 na konci inkubace snížil putrescin téměř o 45 % při pH 5,4 a téměř o 33 % při pH 6,2 a 7. Při nižší počáteční testované koncentraci ($0,2 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$) úbytek putrescinu nepřesáhl 13 %. Při kultivační teplotě $23 \text{ }^\circ\text{C}$ nejvyšší redukce byla naměřena v médiu také s vyšší počáteční koncentrací putrescinu (maximální úbytek přes 32 %), avšak pouze v médiu o pH 5,4 a 7,0. Naopak v kultivačním médiu o pH 6,2 bakteriální kmen *L. casei* CCDM 198 putrescin neredukoval ($P < 0,05$). Během kultivační teploty $30 \text{ }^\circ\text{C}$ bylo detekováno snížení putrescinu o více než 31 % v kultivačním médiu s počáteční koncentrací putrescinu $0,4 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ při všech testovaných hodnotách pH kultivačního média.

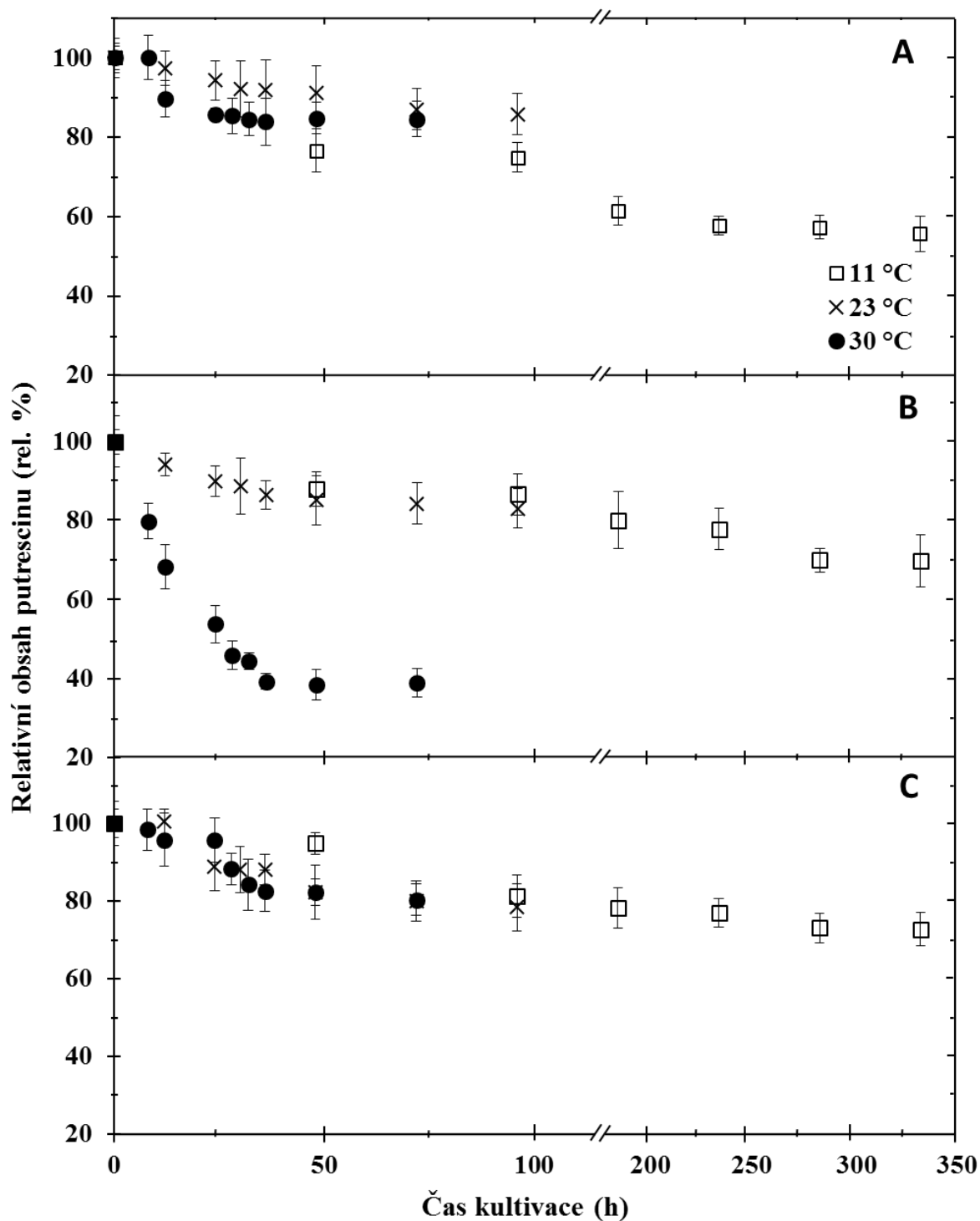
Naopak nižší počáteční koncentrace putrescinu ($0,2 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$) byla vhodnější pro *L. casei* CCDM 198 při podmínkách v kultivačním médiu se sníženým množstvím živin (v neúplném MRS bujónu; Obr. 4.11). Nejsignifikantnější úbytek putrescinu za těchto podmínek byl zaznamenán při teplotě $30 \text{ }^\circ\text{C}$ v médiu o pH 6,2 s počáteční koncentrací aminu $0,2 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$. Už po 12 hodinách byl zaznamenán úbytek putrescinu téměř o 32 % a po dalších 24 hodinách bylo snížení o více jak 60 % ve srovnání s časem 0 (100 %) s tím, že do konce kultivace, resp. v časech odběru 36 hodin – 72 hodin, už k dalšímu významnému úbytku putrescinu nedocházelo. Teplota $11 \text{ }^\circ\text{C}$ také podporovala redukční schopnost zkoumané bakterie, kdy snížení koncentrace na konci kultivace bylo v rozmezí od 27 % až po 44 %. Nejméně vhodné podmínky pro redukci putrescinu bakterií *L. casei* CCDM 198 byly detekovány při teplotě $23 \text{ }^\circ\text{C}$. Kombinace všech zkoumaných faktorů při této teplotě dosahovaly maximální redukce pouze o 21 %. V neúplném MRS bujónu při vyšší zkoumané počáteční koncentraci putrescinu ($0,4 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$) redukce při testovaných podmínkách nepřesáhla 27 % (Obr. 4.12).



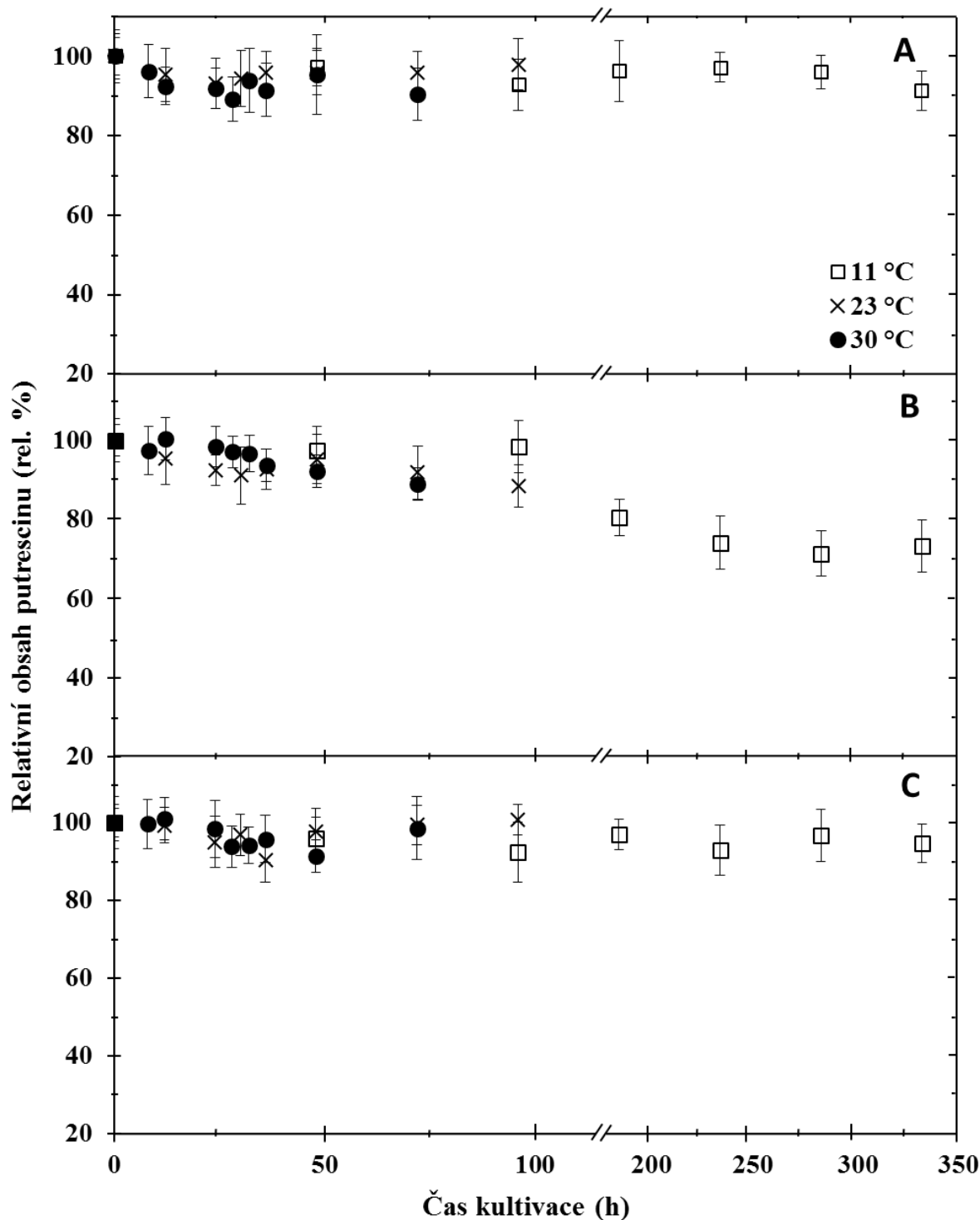
Obr. 4.9: Vývoj relativního obsahu putrescinu (rel. %) při degradaci bakterií *Lactocaseibacillus casei* CCDM 198 v úplném MRS bujónu s počáteční koncentrací putrescinu $0,2 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ v závislosti na době kultivace (h) pro inkubační teploty $11 \text{ }^\circ\text{C}$, $23 \text{ }^\circ\text{C}$ a $30 \text{ }^\circ\text{C}$; počáteční relativní obsah putrescinu v čase nula byl vždy 100 %. Inkubace byla prováděna při pH = 5,4 (části A), pH = 6,2 (části B) a pH = 7,0 (části C). Výsledky jsou prezentovány pomocí průměrů a standardních odchylek (sloupce; n = 6).



Obr. 4.10: Vývoj relativního obsahu putrescinu (rel. %) při degradaci bakterií *Lacticaseibacillus casei* CCDM 198 v úplném MRS bujónu s počáteční koncentrací putrescinu $0,4 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ v závislosti na době kultivace (h) pro inkubační teploty $11 \text{ }^\circ\text{C}$, $23 \text{ }^\circ\text{C}$ a $30 \text{ }^\circ\text{C}$; počáteční relativní obsah putrescinu v čase nula byl vždy 100 %. Inkubace byla prováděna při $\text{pH} = 5,4$ (části A), $\text{pH} = 6,2$ (části B) a $\text{pH} = 7,0$ (části C). Výsledky jsou prezentovány pomocí průměrů a standardních odchylek (sloupce; $n = 6$).



Obr. 4.11: Vývoj relativního obsahu putrescinu (rel. %) při degradaci bakterií *Lactocaseibacillus casei* CCDM 198 v neúplném MRS bujónu s počáteční koncentrací putrescinu $0,2 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ v závislosti na době kultivace (h) pro inkubační teploty $11 \text{ }^\circ\text{C}$, $23 \text{ }^\circ\text{C}$ a $30 \text{ }^\circ\text{C}$; počáteční relativní obsah putrescinu v čase nula byl vždy 100 %. Inkubace byla prováděna při $\text{pH} = 5,4$ (části A), $\text{pH} = 6,2$ (části B) a $\text{pH} = 7,0$ (části C). Výsledky jsou prezentovány pomocí průměrů a standardních odchylek (sloupce; $n = 6$).



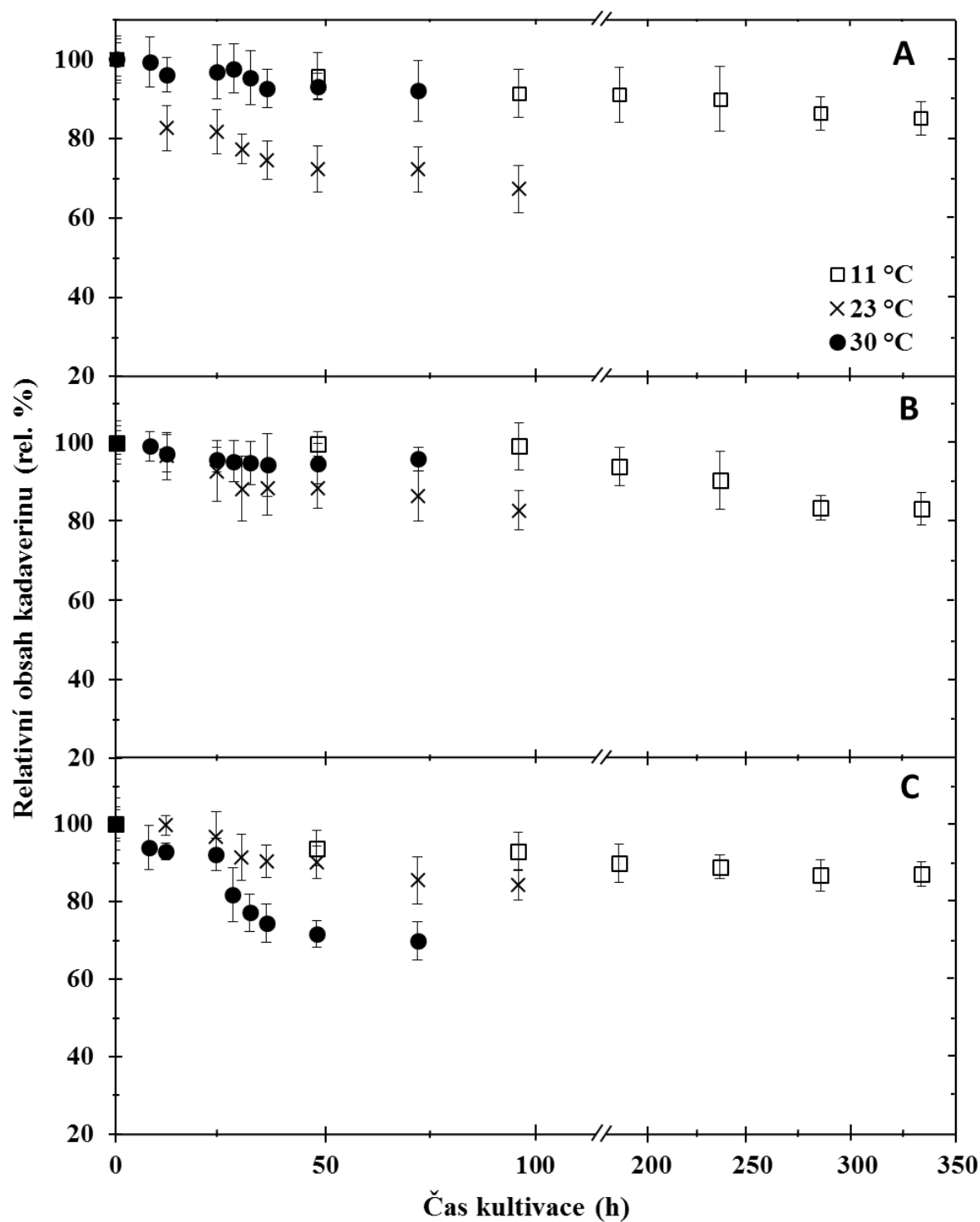
Obr. 4.12: Vývoj relativního obsahu putrescinu (rel. %) při degradaci bakterií *Lactocaseibacillus casei* CCDM 198 v neúplném MRS bujónu s počáteční koncentrací putrescinu $0,4 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ v závislosti na době kultivace (h) pro inkubační teploty $11 \text{ }^\circ\text{C}$, $23 \text{ }^\circ\text{C}$ a $30 \text{ }^\circ\text{C}$; počáteční relativní obsah putrescinu v čase nula byl vždy 100 %. Inkubace byla prováděna při $\text{pH} = 5,4$ (části A), $\text{pH} = 6,2$ (části B) a $\text{pH} = 7,0$ (části C). Výsledky jsou prezentovány pomocí průměrů a standardních odchylek (sloupce; $n = 6$).

4.1.4 Vliv faktorů na redukci kadaverinu *in vitro*

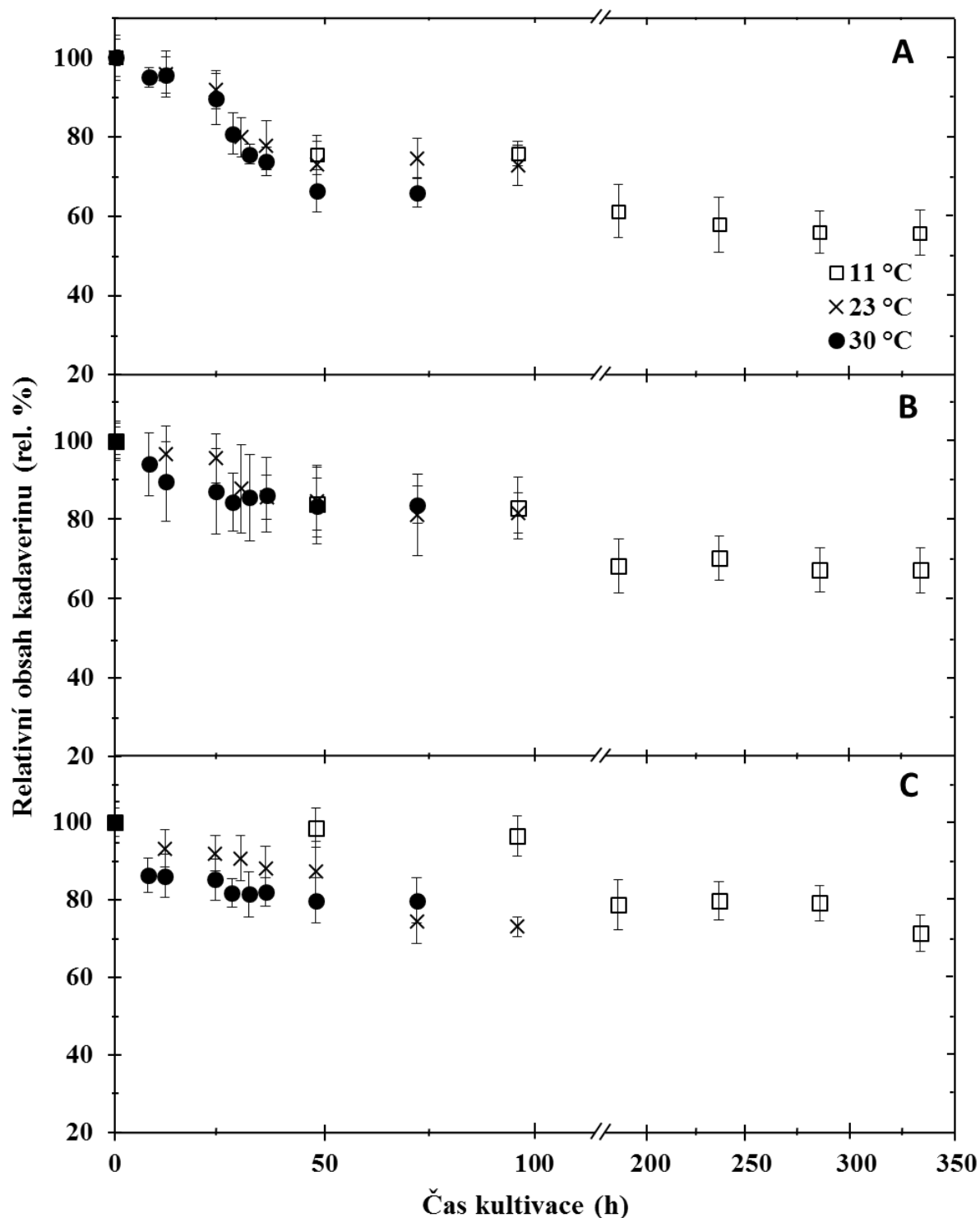
Dalším zkoumaným biogenním aminem, který může negativně ovlivňovat kvalitu potravin, byl kadaverin. Získané výsledky studia vlivu faktorů na redukční schopnost kmene *L. casei* CCDM 198 vůči kadaverinu jsou v shrnutý na Obr. 4.13-4.16. Testované faktory byly opět složení kultivačního média, doba kultivace, inkubační teplota, pH média a rozdílná počáteční koncentrace kadaverinu.

Jak je patrné z grafů na Obr. 4.13 a 4.14 byly naměřeny významné degradace kadaverinu v úplném MRS bujónu. Největší redukce byla dosažena při kultivační teplotě 11 °C v médiu o pH 5,4 s vyšší zkoumanou počáteční koncentrací kadaverinu. Za těchto podmínek byl detekován úbytek o více než 44 % na konci kultivace. Signifikantní redukce byla také zjištěna i při zbylých dvou hodnotách pH v médiu s vyšší počáteční koncentrací, a to úbytek v rozmezí od 28 % až do téměř 33 %. Naopak při nižší počáteční koncentraci za těchto podmínek při teplotě 11 °C úbytek kadaverinu nepřesáhl 17 %. Teplota 23 °C také podporovala degradační schopnost studované bakterie. Při této teplotě byl zjištěn signifikantní úbytek kadaverinu rozmezí 17 % až téměř 33 % v závislosti na kombinaci jednotlivých faktorů. Při teplotě 30 °C bakterie *L. casei* CCDM 198 významně katalyzovala koncentraci putrescinu v MRS bujónu o pH 5,4 s počáteční koncentrací 0,4 g·l⁻¹ (redukce o 34 %) a v MRS bujónu o pH 7,0 s nižší počáteční koncentrací (redukce o 30 %) na konci kultivace. V ostatních případech při této teplotě byl zaznamenán maximální úbytek o 20 %.

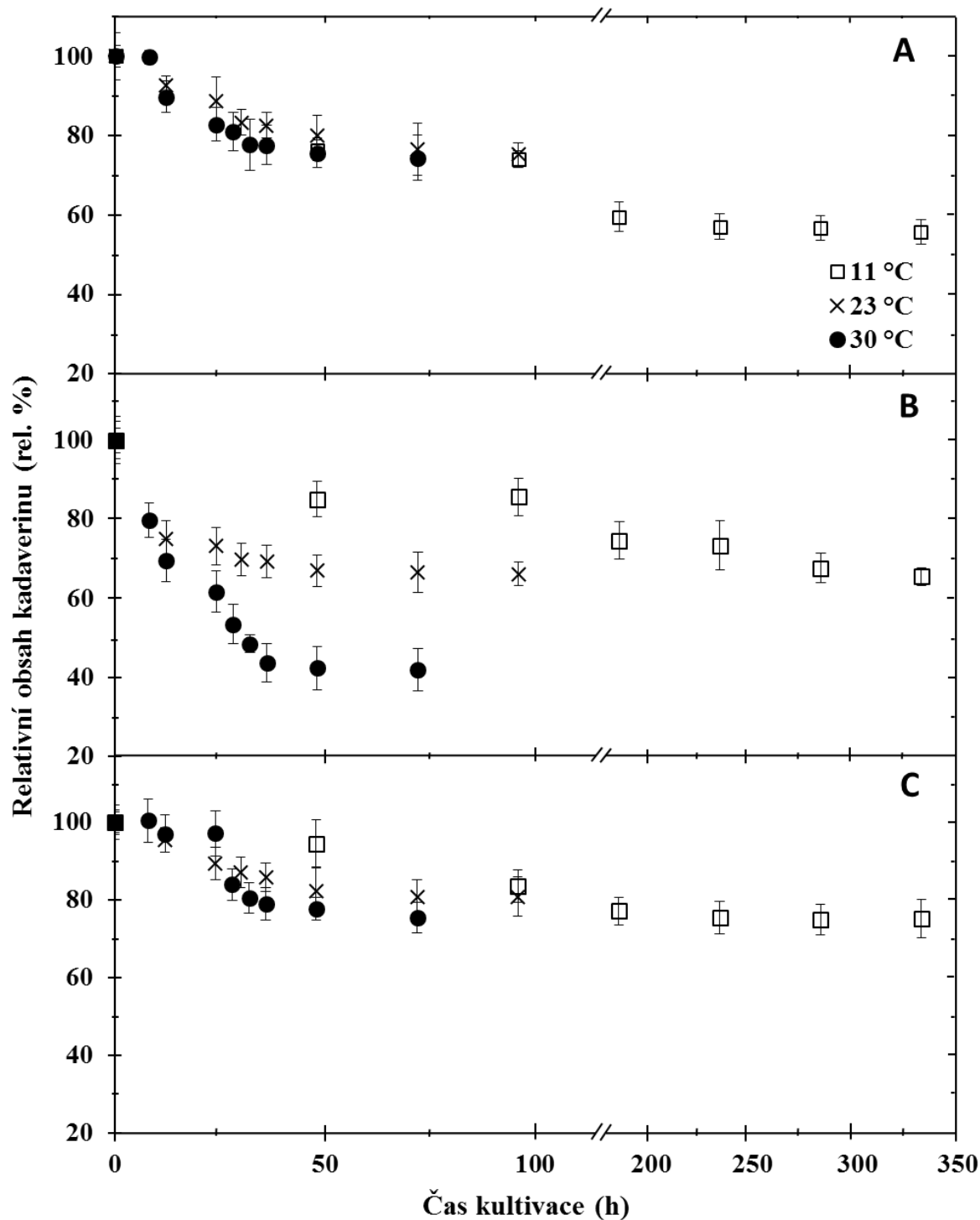
Významný pokles koncentrace kadaverinu pomocí studované bakterie byl dosažen také v neúplném MRS bujónu (Obr. 4.15 a 4.16), především MRS bujónu s nižší počáteční koncentrací kadaverinu. Nejvýznamnější redukce byla detekována v kultivačním médiu o pH 6,2 s počáteční koncentrací kadaverinu 0,2 g·l⁻¹, a to o více jak 58 % po 72 hodinách kultivace při teplotě 30 °C a téměř o 34 % po 96 hodinách při kultivační teplotě 23 °C; a v médiu o pH 5,4 také při počáteční koncentraci kadaverinu 0,2 g·l⁻¹ o více jak 44 % na konci kultivace při teplotě 11 °C (po 336 h). Při vyšší počáteční koncentraci kadaverinu bakterie *L. casei* CCDM 198 snížila přítomnost aminu maximálně o necelých 31 % ve srovnání s koncentrací v čase 0 (při pH kultivačního média 6,2 a teplotě 11 °C).



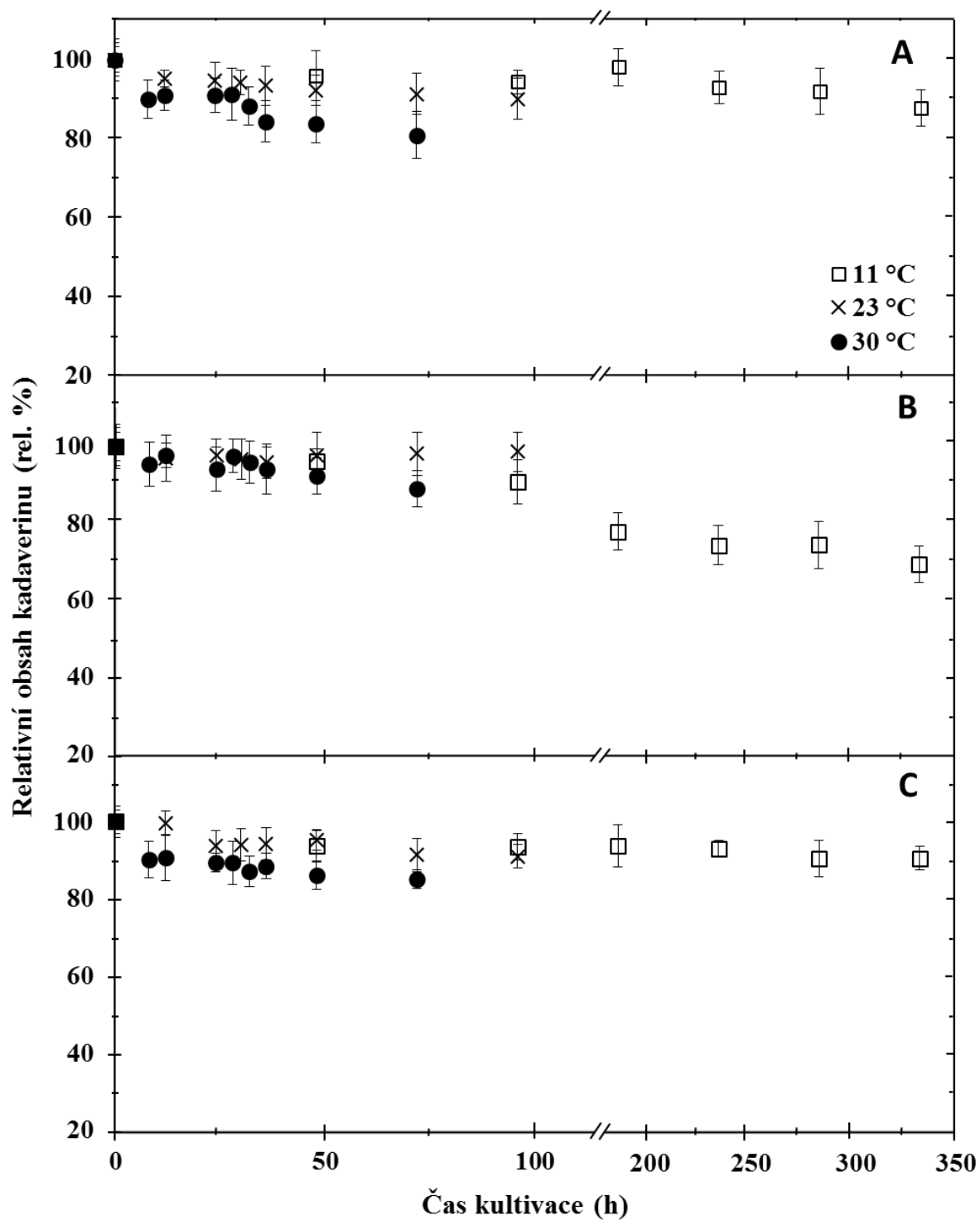
Obr. 4.13: Vývoj relativního obsahu kadaverinu (rel. %) při degradaci bakterií *Lacticaseibacillus casei* CCDM 198 v úplném MRS bujónu s počáteční koncentrací kadaverinu $0,2 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ v závislosti na době kultivace (h) pro inkubační teploty $11 \text{ }^\circ\text{C}$, $23 \text{ }^\circ\text{C}$ a $30 \text{ }^\circ\text{C}$; počáteční relativní obsah kadaverinu v čase nula byl vždy 100 %. Inkubace byla prováděna při $\text{pH} = 5,4$ (části A), $\text{pH} = 6,2$ (části B) a $\text{pH} = 7,0$ (části C). Výsledky jsou prezentovány pomocí průměrů a standardních odchylek (sloupce; $n = 6$).



Obr. 4.14: Vývoj relativního obsahu kadaverinu (rel. %) při degradaci bakterií *Lacticaseibacillus casei* CCDM 198 v úplném MRS bujónu s počáteční koncentrací kadaverinu $0,4 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ v závislosti na době kultivace (h) pro inkubační teploty 11 °C, 23 °C a 30 °C; počáteční relativní obsah kadaverinu v čase nula byl vždy 100 %. Inkubace byla prováděna při pH = 5,4 (části A), pH = 6,2 (části B) a pH = 7,0 (části C). Výsledky jsou prezentovány pomocí průměrů a standardních odchylek (sloupce; n = 6).



Obr. 4.15: Vývoj relativního obsahu kadaverinu (rel. %) při degradaci bakterií *Lactocaseibacillus casei* CCDM 198 v neúplném MRS bujónu s počáteční koncentrací kadaverinu $0,2 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ v závislosti na době kultivace (h) pro inkubační teploty $11 \text{ }^\circ\text{C}$, $23 \text{ }^\circ\text{C}$ a $30 \text{ }^\circ\text{C}$; počáteční relativní obsah kadaverinu v čase nula byl vždy 100 %. Inkubace byla prováděna při $\text{pH} = 5,4$ (části A), $\text{pH} = 6,2$ (části B) a $\text{pH} = 7,0$ (části C). Výsledky jsou prezentovány pomocí průměrů a standardních odchylek (sloupce; $n = 6$).



Obr. 4.16: Vývoj relativního obsahu kadaverinu (rel. %) při degradaci bakterií *Lacticaseibacillus casei* CCDM 198 v neúplném MRS bujónu s počáteční koncentrací kadaverinu $0,4 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ v závislosti na době kultivace (h) pro inkubační teploty 11°C , 23°C a 30°C ; počáteční relativní obsah kadaverinu v čase nula byl vždy 100 %. Inkubace byla prováděna při pH = 5,4 (části A), pH = 6,2 (části B) a pH = 7,0 (části C). Výsledky jsou prezentovány pomocí průměrů a standardních odchylek (sloupce; $n = 6$).

4.1.5 Vliv faktorů na redukci fenylethylaminu *in vitro*

Posledním zkoumaným biogenním aminem byl fenylethylamin. Schopnost bakterie *L. casei* CCDM 198 redukovat fenylethylamin byl opět stejně jako v předešlých případech zjišťován při kombinaci různých faktorů (doba odběru, množství živin v kultivačním médiu, inkubační teplota, pH kultivačního média a počáteční koncentrace fenylethylaminu). Získané výsledky jsou shrnuty na Obr. 4.17-4.20.

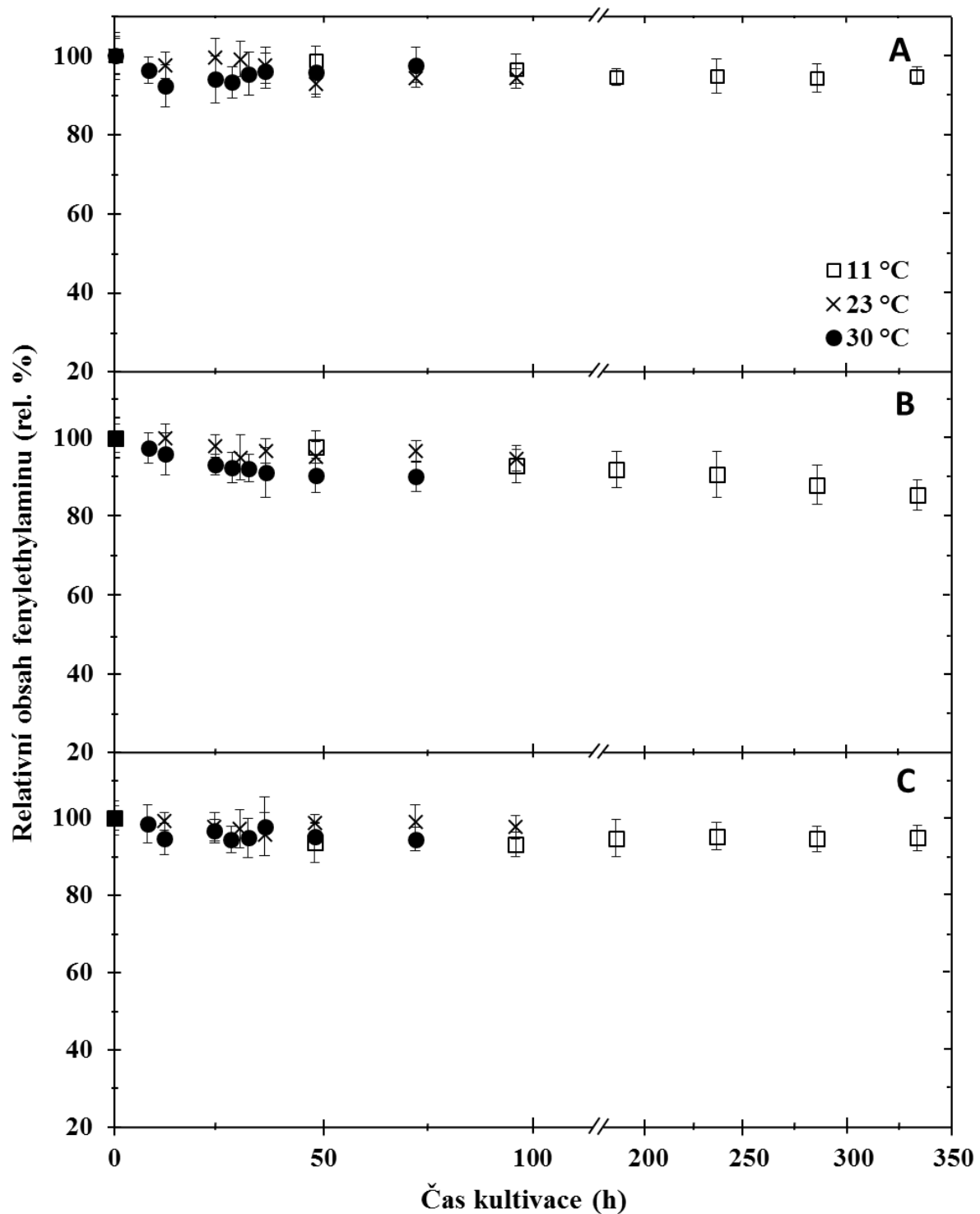
Z výsledků uvedených v grafech je patrné, že stejně jako v případě tyraminu za většiny testovaných podmínek redukce fenylethylaminu bakterií *L. casei* CCDM 198 nepřesáhla 20 % s výjimkou níže uvedených podmínek:

a) Kultivace v úplném MRS bujónu (Obr. 4.17 a 4.18):

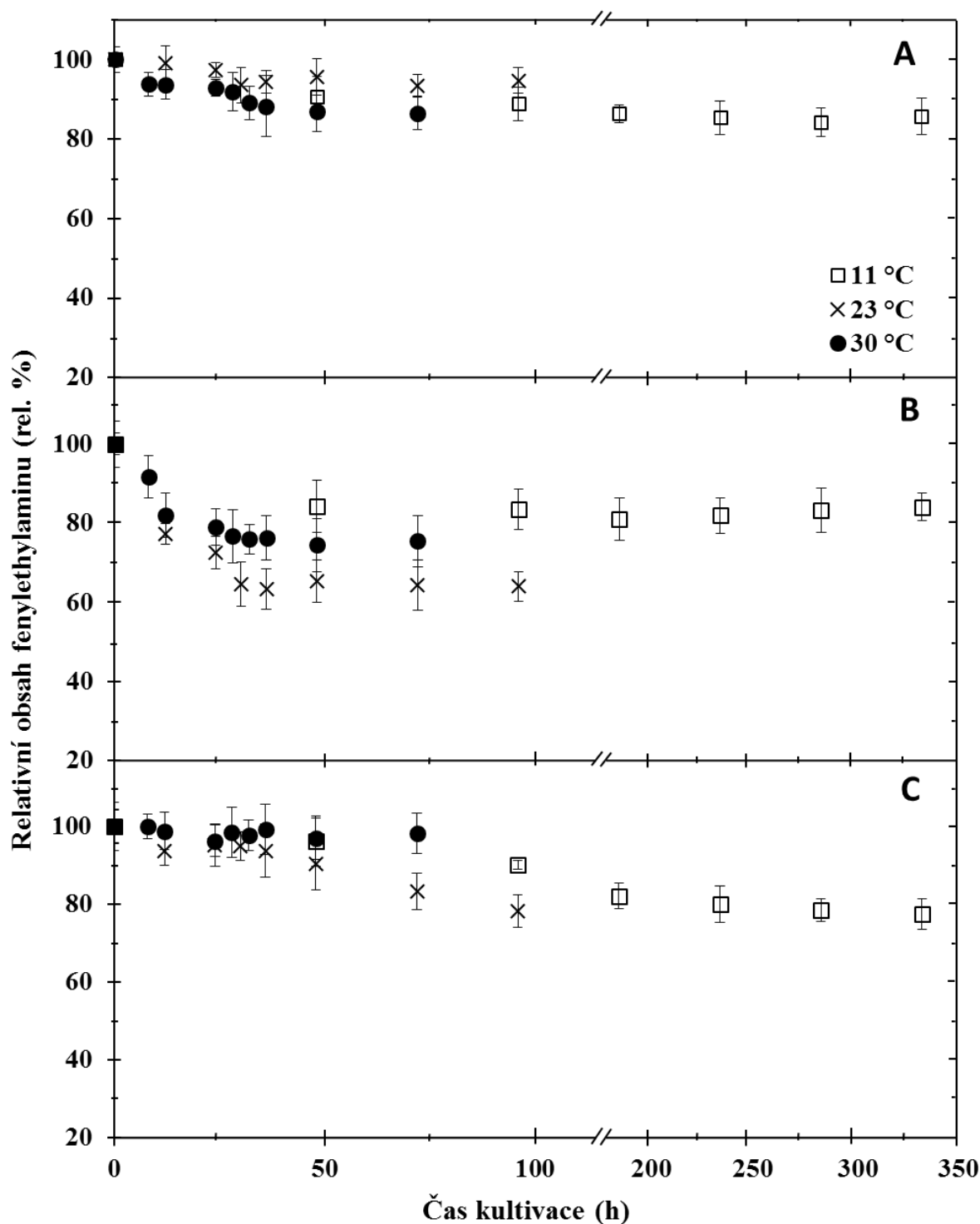
- v MRS bujónu o pH 6,2 při počáteční koncentraci fenylethylaminu $0,4 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ a kultivační teplotě 23 °C a 30 °C. V průběhu inkubace při teplotě 23 °C v médiu o pH 6,2. *L. casei* CCDM 198 odbourával fenylethylamin o více než 35 % už po 30 hodinách a následně do konce kultivace už nedošlo k signifikantnímu snížení. Obdobný trend za těchto podmínek byl zaznamenán i během kultivace při teplotě 30 °C, kdy k signifikantní redukci došlo už po 12 hodinách (úbytek přes 20 %) a také do konce kultivace nebyl detekován signifikantní úbytek.
- v MRS bujónu o pH 7,0 při jeho počáteční koncentraci fenylethylaminu $0,4 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ a kultivační teplotě 23 °C a 11 °C s redukcí dosahující však maximálně 22 %.

b) Kultivace v neúplném MRS bujónu (Obr. 4.19 a 4.20):

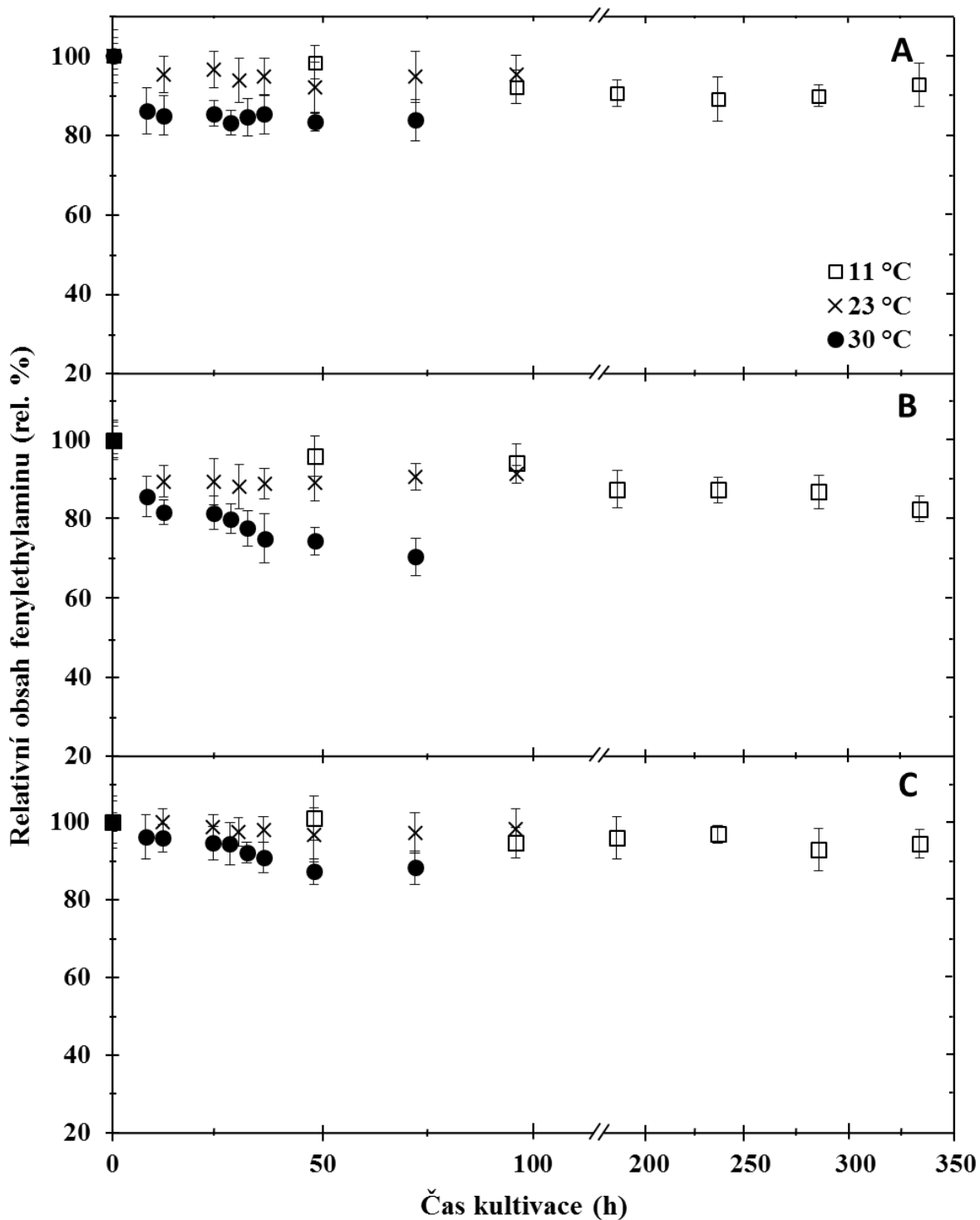
- v MRS bujónu o pH 6,2 při nižší studované počáteční koncentraci fenylethylaminu a kultivační teplotě 30 °C (snížení téměř o 30 %).



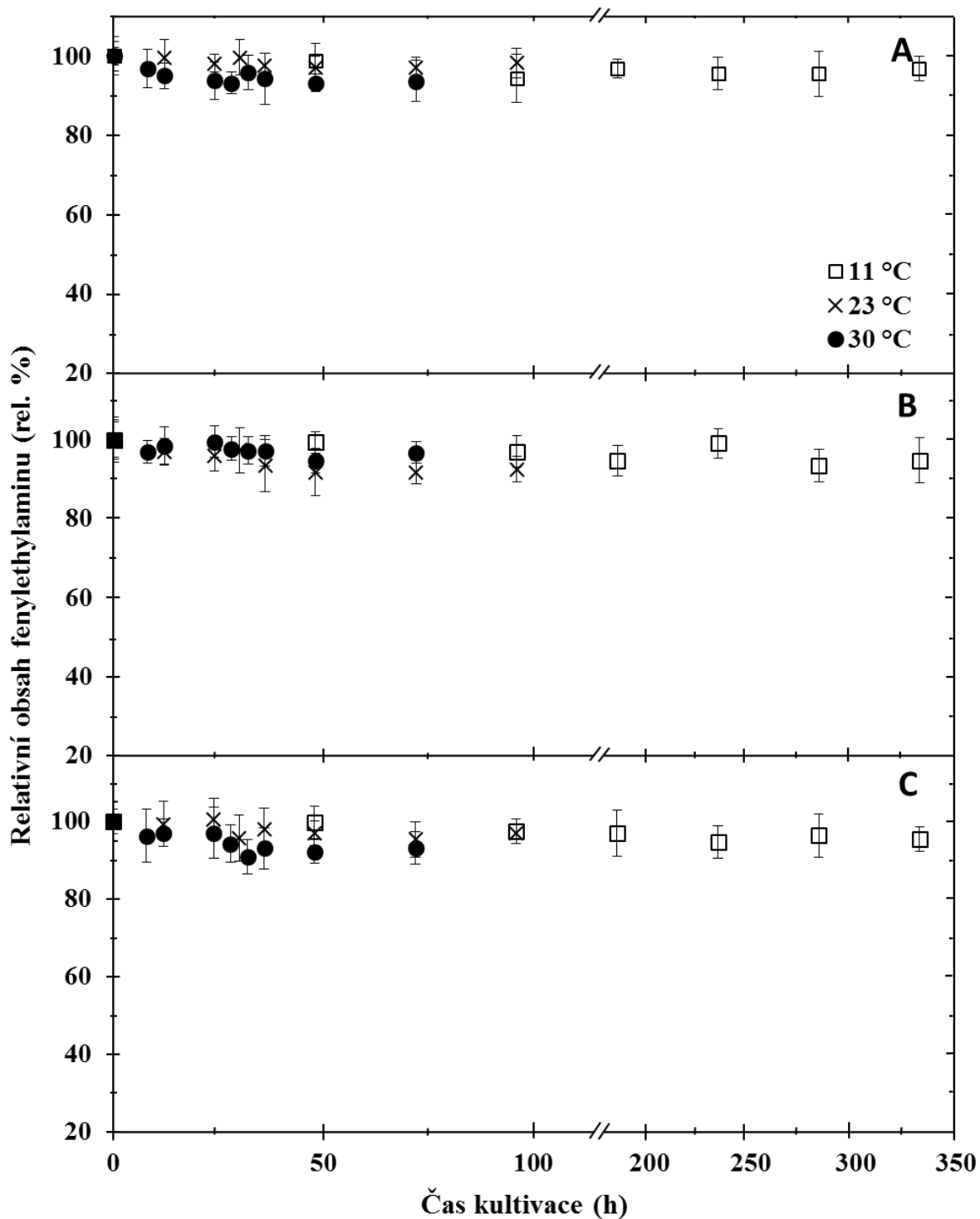
Obr. 4.17: Vývoj relativního obsahu fenylethylaminu (rel. %) při degradaci bakterií *Lacticaseibacillus casei* CCDM 198 v úplném MRS bujónu s počáteční koncentrací fenylethylaminu $0,2 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ v závislosti na době kultivace (h) pro inkubační teploty $11 \text{ }^\circ\text{C}$, $23 \text{ }^\circ\text{C}$ a $30 \text{ }^\circ\text{C}$; počáteční relativní obsah fenylethylaminu v čase nula byl vždy 100 %. Inkubace byla prováděna při $\text{pH} = 5,4$ (části A), $\text{pH} = 6,2$ (části B) a $\text{pH} = 7,0$ (části C). Výsledky jsou prezentovány pomocí průměrů a standardních odchylek (sloupce; $n = 6$).



Obr. 4.18: Vývoj relativního obsahu fenylethylaminu (rel. %) při degradaci bakterií *Lactocaseibacillus casei* CCDM 198 v úplném MRS bujónu s počáteční koncentrací fenylethylaminu $0,4 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ v závislosti na době kultivace (h) pro inkubační teploty $11 \text{ }^\circ\text{C}$, $23 \text{ }^\circ\text{C}$ a $30 \text{ }^\circ\text{C}$; počáteční relativní obsah fenylethylaminu v čase nula byl vždy 100 %. Inkubace byla prováděna při $\text{pH} = 5,4$ (části A), $\text{pH} = 6,2$ (části B) a $\text{pH} = 7,0$ (části C). Výsledky jsou prezentovány pomocí průměrů a standardních odchylek (sloupce; $n = 6$).



Obr. 4.19: Vývoj relativního obsahu fenylethylaminu (rel. %) při degradaci bakterií *Lactocaseibacillus casei* CCDM 198 v neúplném MRS bujónu s počáteční koncentrací fenylaethylaminu $0,2 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ v závislosti na době kultivace (h) pro inkubační teploty $11 \text{ }^\circ\text{C}$, $23 \text{ }^\circ\text{C}$ a $30 \text{ }^\circ\text{C}$; počáteční relativní obsah fenylethylaminu v čase nula byl vždy 100 %. Inkubace byla prováděna při pH = 5,4 (části A), pH = 6,2 (části B) a pH = 7,0 (části C). Výsledky jsou prezentovány pomocí průměrů a standardních odchylek (sloupce; n = 6).



Obr. 4.20: Vývoj relativního obsahu fenylethylaminu (rel. %) při degradaci bakterií *Lactocaseibacillus casei* CCDM 198 v neúplném MRS bujónu s počáteční koncentrací fenylaethylaminu $0,4 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ v závislosti na době kultivace (h) pro inkubační teploty 11°C , 23°C a 30°C ; počáteční relativní obsah fenylethylaminu v čase nula byl vždy 100 %. Inkubace byla prováděna při $\text{pH} = 5,4$ (části A), $\text{pH} = 6,2$ (části B) a $\text{pH} = 7,0$ (části C). Výsledky jsou prezentovány pomocí průměrů a standardních odchylek (sloupce; $n = 6$).

4.1.6 Vliv cysteinu na redukci biogenních aminů

Poslední část experimentu *in vitro* se zabývala možností vlivu redukčního činidla cysteinu na úbytek biogenních aminů. Pro podporu růstu studovaného kmene je doporučován dodavatelem Laktoflora přídavek cysteinu o koncentraci 1 % (w/v). Pro studium byly proto vytvořené paralelní sady se stejnými kombinacemi faktorů, které navíc obsahovaly cystein o této koncentraci.

Vliv cysteinu (Příloha I) na redukci všech zkoumaných biogenních aminů (histaminu, tyraminu, putrescinu, kadaverinu a fenylethylaminu) byl zmapován v přítomnosti ostatních testovaných faktorů, a to teplota kultivace (11 °C; 23 °C a 30 °C), rozdílné pH kultivačního média (pH 5,4; 6,2 a 7), počáteční koncentrace biogenních aminů (0,2 g·l⁻¹ a 0,4 g·l⁻¹), množství dostupných živin (úplné složení kultivačního média - MRS; a neúplné složení kultivačního média - ½ MRS) a čas kultivace (interval 0-72 hodin; 0-96 hodin resp. 0-336 hodin).

K významné redukci docházelo při kultivační teplotě 30 °C v MRS bujónu (jak úplném, tak neúplném) o pH 5,4 s počáteční koncentrací biogenních aminů 0,2 g·l⁻¹. Přídavek cysteinu za těchto podmínek zvýšil redukční schopnost *L. casei* CCDM 198 vůči všem testovaným aminům ve srovnání s redukcí za stejných podmínek bez jeho přídavku. S výjimkou tyraminu, u kterého byl tento trend pozorován pouze v úplném MRS bujónu. Na konci kultivace (po 72 hodinách) byl zjištěn rozdíl v degradacích (za stejných podmínek bez cysteinu a s cysteinem) v rozmezí od 13 % až do 65 % v závislosti na studovaném aminu.

Při zbylých dvou zkoumaných teplotách byl také zjištěn významný úbytek jednotlivých aminů vlivem cysteinu, a to především v médiu o pH 6,2. Při kultivaci o teplotě 23 °C v neúplném MRS bujónu s pH hodnotou 6,2 a s počáteční koncentrací biogenních aminů 0,2 g·l⁻¹ byla detekována vyšší redukční schopnost bakterie *L. casei* CCDM 198 po přídavku cysteinu vůči všem 5 testovaným aminům. Přídavek cysteinu za stejných podmínek zvýšil redukci histaminu, tyraminu, kadaverinu, fenylethylaminu a putrescinu také při teplotě 11 °C, kdy navíc ve srovnání s teplotou 23 °C bakterie *L. casei* CCDM 198 signifikantně ($P < 0,05$) odbourávala opět všechny studované aminy také i v neúplném MRS bujónu.

Z naměřených dat a ze statistického vyhodnocení vyplývá, že přídavek cysteinu signifikantně ($P < 0,05$) podporoval redukci biogenních aminů bakterií *L. casei* CCDM 198, avšak interakce jednotlivých faktorů a přítomnost cysteinu významně redukci všech aminů neovlivňovala ($P < 0,05$). Z tohoto důvodu pro další experiment II vliv cysteinu nebyl dále zkoumán.

4.2 Výsledky experimentu II – Vliv technologických parametrů na degradační schopnost *Lactocaseibacillus casei* v mléce

Předchozí výsledky z experimentu I bylo potřeba ověřit i v reálné potravíně. Proto součástí experimentální části disertační práce byla také zjišťována schopnost *Lactocaseibacillus casei* CCDM 198 degradovat biogenní aminy v mléce za různých podmínek. Degradovanými aminy byly histamin, tyramin, kadaverin, putrescin a fenylethylamin. Redukce aminů byla studována v časovém intervalu 0 hodin až 336 hodin v závislosti na studované teplotě (11 °C; 23 °C a 30 °C), při počáteční koncentraci aminů 0,2 g·l⁻¹ během různé hodnoty pH mléka (5,4; 6,2 a 7,0). Množství biogenních aminů bylo detekováno metodou HPLC/DAD po předchozí derivatizaci dansylchloridem. Výsledky popisující vliv faktorů na katalytickou aktivitu *L. casei* CCDM 198 vůči aminům jsou rozděleny do jednotlivých podkapitol podle zkoumaných biogenních aminů. Jednotlivé Obr. jsou následně rozděleny do částí (grafů) podle pH mléka. Průběh redukce v mléce o pH 5,4 je v části A, o pH 6,2 v části B a o pH 7 v části C.

4.2.1 Vliv faktorů na redukci histaminu a tyraminu v mléce

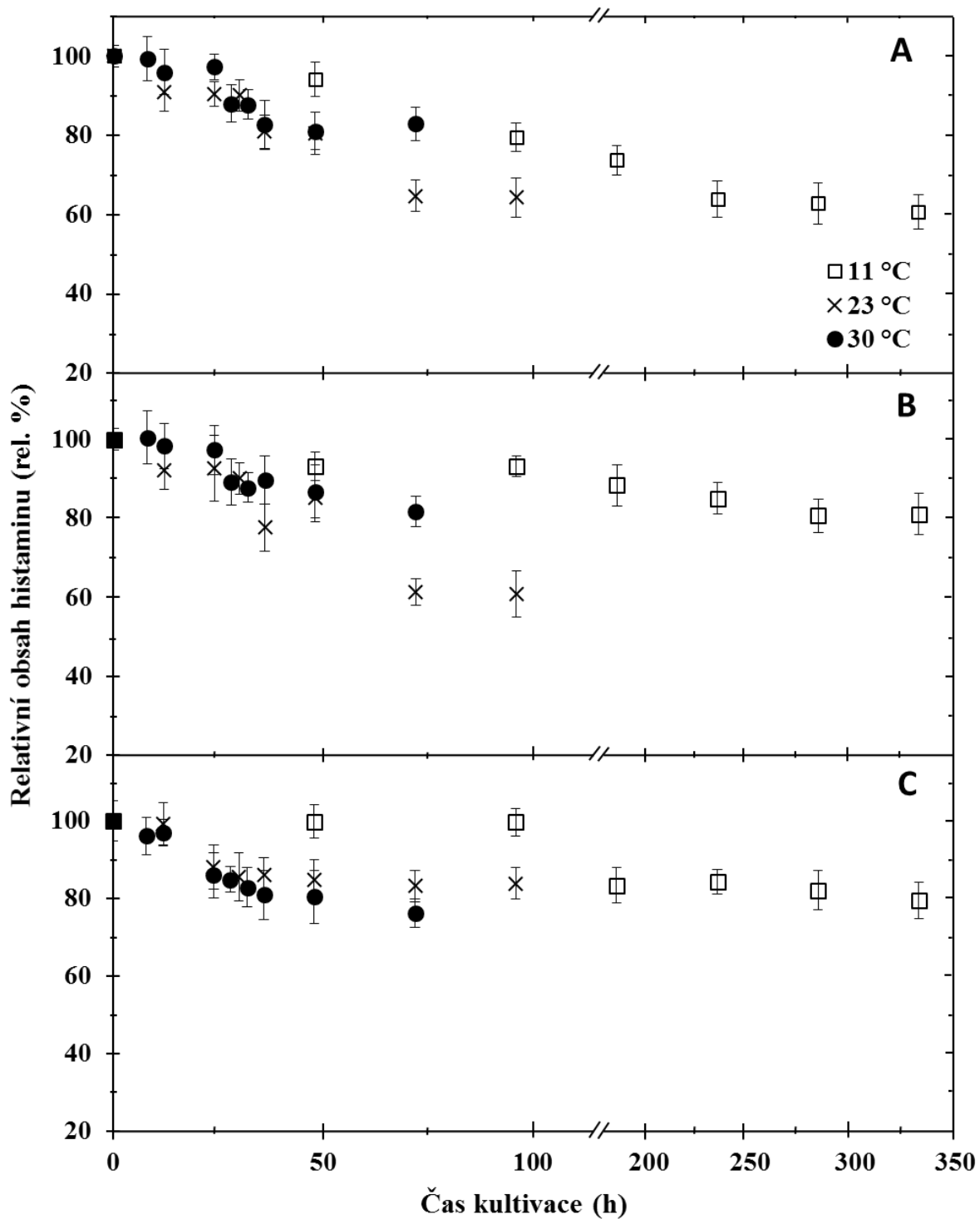
Následující podkapitola se zabývá redukční schopností *L. casei* CCDM 198 vůči histaminu a tyraminu v mléce v závislosti na inkubační teplotě a pH mléka.

Redukce histaminu

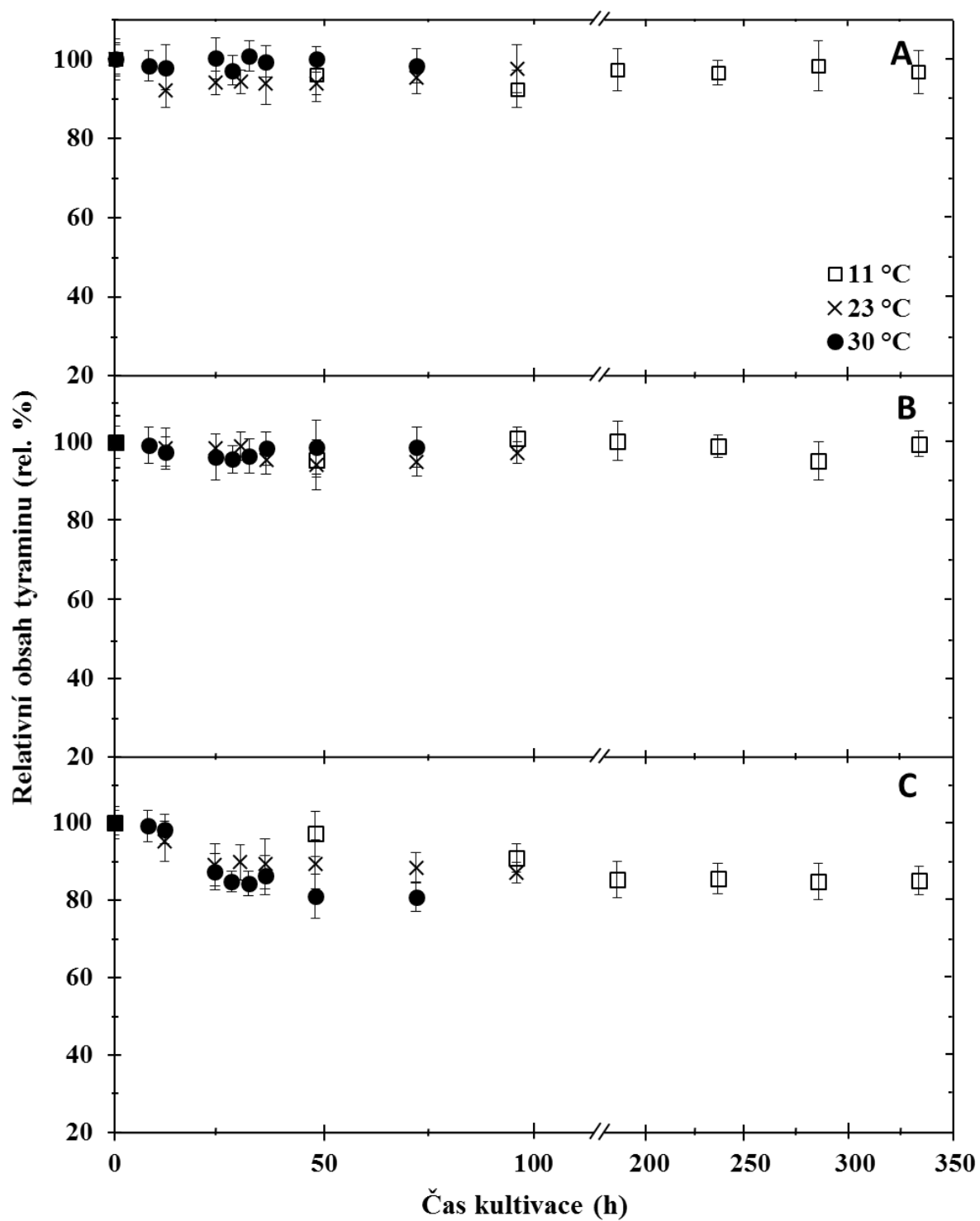
Vliv *L. casei* CCDM 198 na relativní koncentraci histaminu v mléce je graficky znázorněn na Obr. 4.21. Z výsledků je patrné, že v mléce došlo k signifikantnímu snížení ($P < 0,05$) histaminu během kombinací všech studovaných faktorů, a to v rozmezí od 16 % do 39 % ve srovnání s počáteční koncentrací v čase 0. Nejvhodnější podmínky pro redukci bakterií *L. casei* CCDM 198 byly zaznamenány v mléce o pH 5,4 při kultivační teplotě 11 °C, stejně tak i při kultivaci o teplotě 23 °C (Obr. 4.21A); a v mléce s pH hodnotou 6,2 při teplotě 23 °C (Obr. 4.21B) na konci doby kultivace (po 336 hodinách resp. po 86 hodinách).

Redukce tyraminu

Redukce tyraminu při studovaných podmínkách v mléce je zmapována na Obr. 4.22. Z uvedených grafů vyplývá, že na konci kultivace byla detekována signifikantní redukce ($P < 0,05$) v mléce o pH 7,0 při všech testovaných teplotách (Obr. 4.22C). Avšak za těchto podmínek došlo k maximálnímu snížení o pouhých 19 % při srovnání s výchozí koncentrací na začátku kultivace v čase 0. Hodnoty pH mléka 5,4 a 6,2 nepodporovaly degradační schopnost *L. casei* CCDM 198 a v průběhu kultivace při studovaných teplotách nebyl zjištěn signifikantní úbytek tyraminu v průběhu času (Obr. 4.22A,B).



Obr. 4.21: Vývoj relativního obsahu histaminu (rel. %) při degradaci bakterií *Lactocaseibacillus casei* CCDM 198 v mléce. Kultivace probíhaly za teploty 11 °C, 23 °C a 30 °C v mléce o pH 5,4 (část A); 6,2 (část B) a 7,0 (část C). Počáteční relativní obsah histaminu v čase nula byl vždy 100 %. Výsledky jsou prezentovány pomocí průměrů a standardních odchylek (sloupce; n = 6).



Obr. 4.22: Vývoj relativního obsahu tyraminu (rel. %) při degradaci bakterií *Lactocaseibacillus casei* CCDM 198 v mléce. Kultivace probíhaly za teploty 11 °C, 23 °C a 30 °C v mléce o pH 5,4 (část A); 6,2 (část B) a 7,0 (část C). Počáteční relativní obsah tyraminu v čase nula byl vždy 100 %. Výsledky jsou prezentovány pomocí průměrů a standardních odchylek (sloupce; n = 6).

4.2.2 Vliv faktorů na redukci putrescinu, kadaverinu a fenylethylaminu v mléce

Možnost redukce biogenních aminů v mléce pomocí bakteriálního kmene *L. casei* CCDM 198 byla také testována vůči putrescinu, kadaverinu a fenylethylaminu za kombinace různých technologických podmínek. Výsledky jsou shrnuty podle biogenních aminů v závislosti na různé hodnotě pH mléka na Obr. 4.23-4.25.

Redukce putrescinu

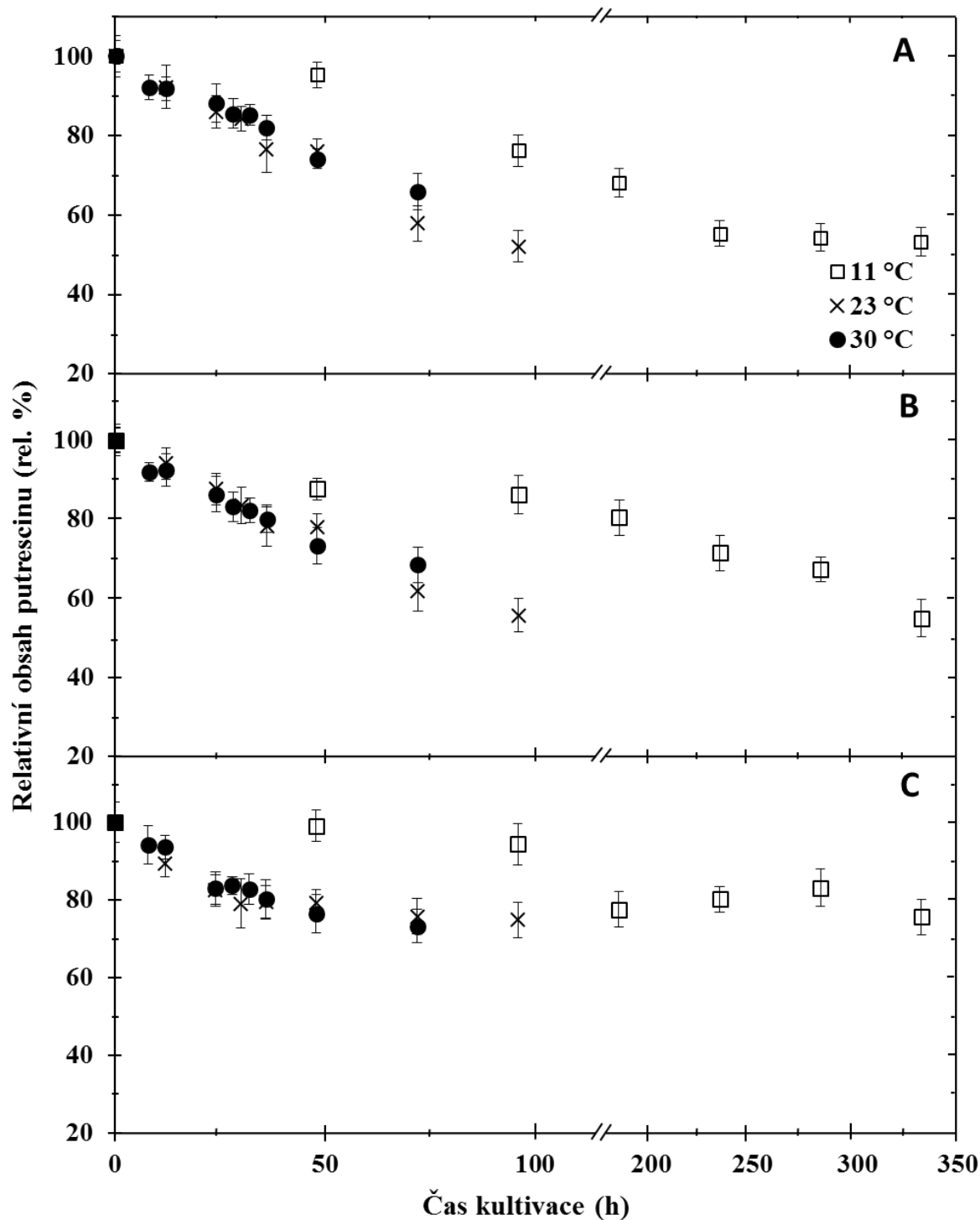
Relativní koncentrace daného BA v čase v závislosti na různé hodnotě pH mléka a teplotě je shrnuta na Obr. 4.23. Z výsledků lze vyčíst, že *L. casei* CCDM 198 významně ($P < 0,05$) degradoval putrescin za všech testovaných kultivačních podmínek (degradace putrescinu se na konci inkubace pohybovala od 25 % do téměř 49 %). Nejvhodnější podmínky pro redukci putrescinu byly zjištěny v mléce o pH 5,4 a 6,2. Při těchto hodnotách pH mléka došlo ke snížení o více než 34 % při teplotě 30 °C a téměř o 49 % při teplotě 23 °C a 11 °C (Obr. 4.23A,B). Nejméně vhodné podmínky byly zaznamenány u mléka o pH 7, kdy pokles putrescinu nepřesáhl 27 % při všech testovaných teplotách (Obr. 4.23C).

Redukce kadaverinu

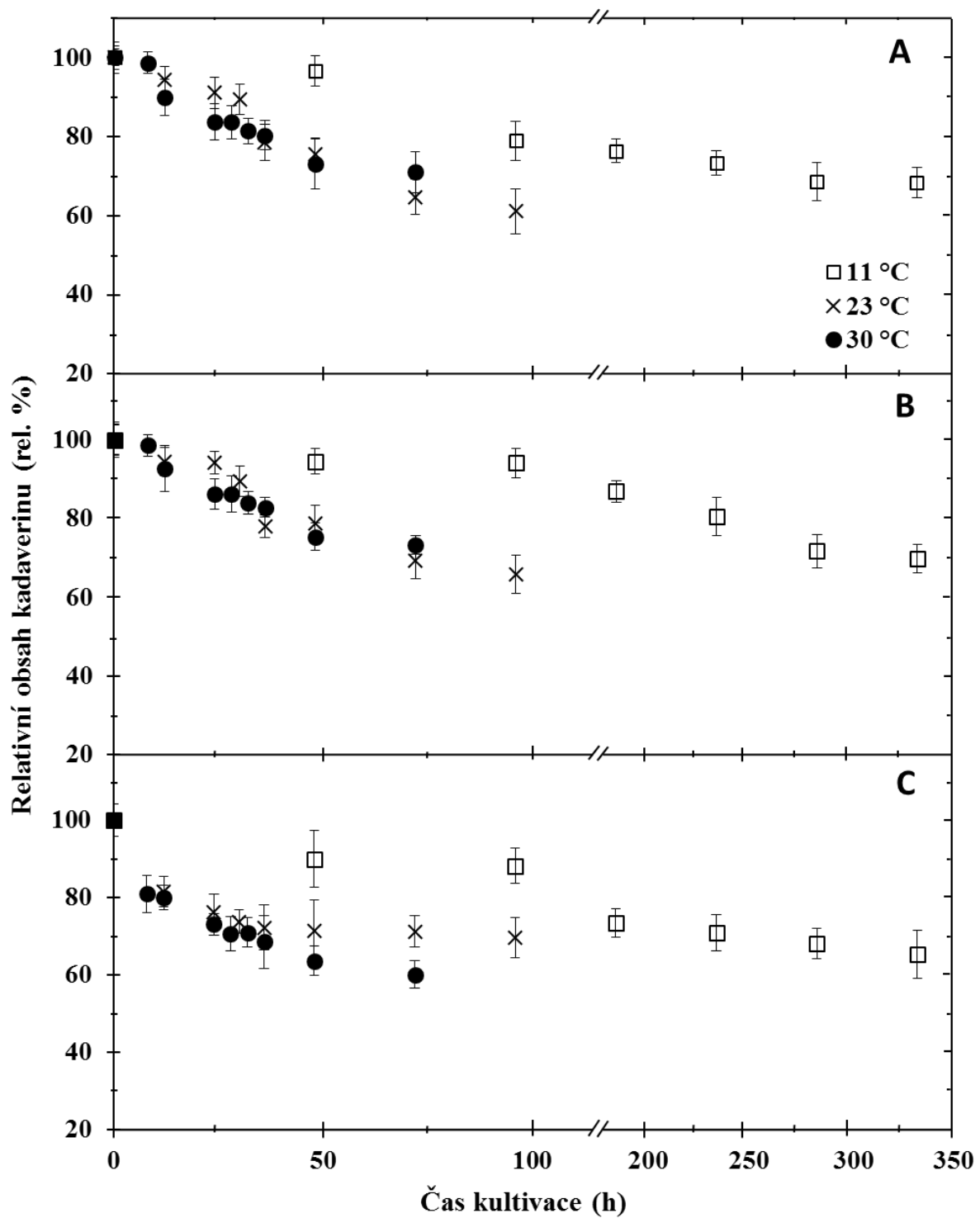
Kadaverin byl dalším biogenním aminem, u kterého byl zmapován relativní úbytek v časovém intervalu za výše uvedených kultivačních podmínek. Jak je patrné z grafů na Obr. 4.24, *L. casei* CCDM 198 má významnou ($P < 0,05$) redukční schopnost vůči kadaverinu při všech studovaných kombinacích, kdy redukce kadaverinu se pohybovala v rozmezí od 30 % po 40 % na konci kultivace ve srovnání s počáteční koncentrací v čase 0.

Redukce fenylethylaminu

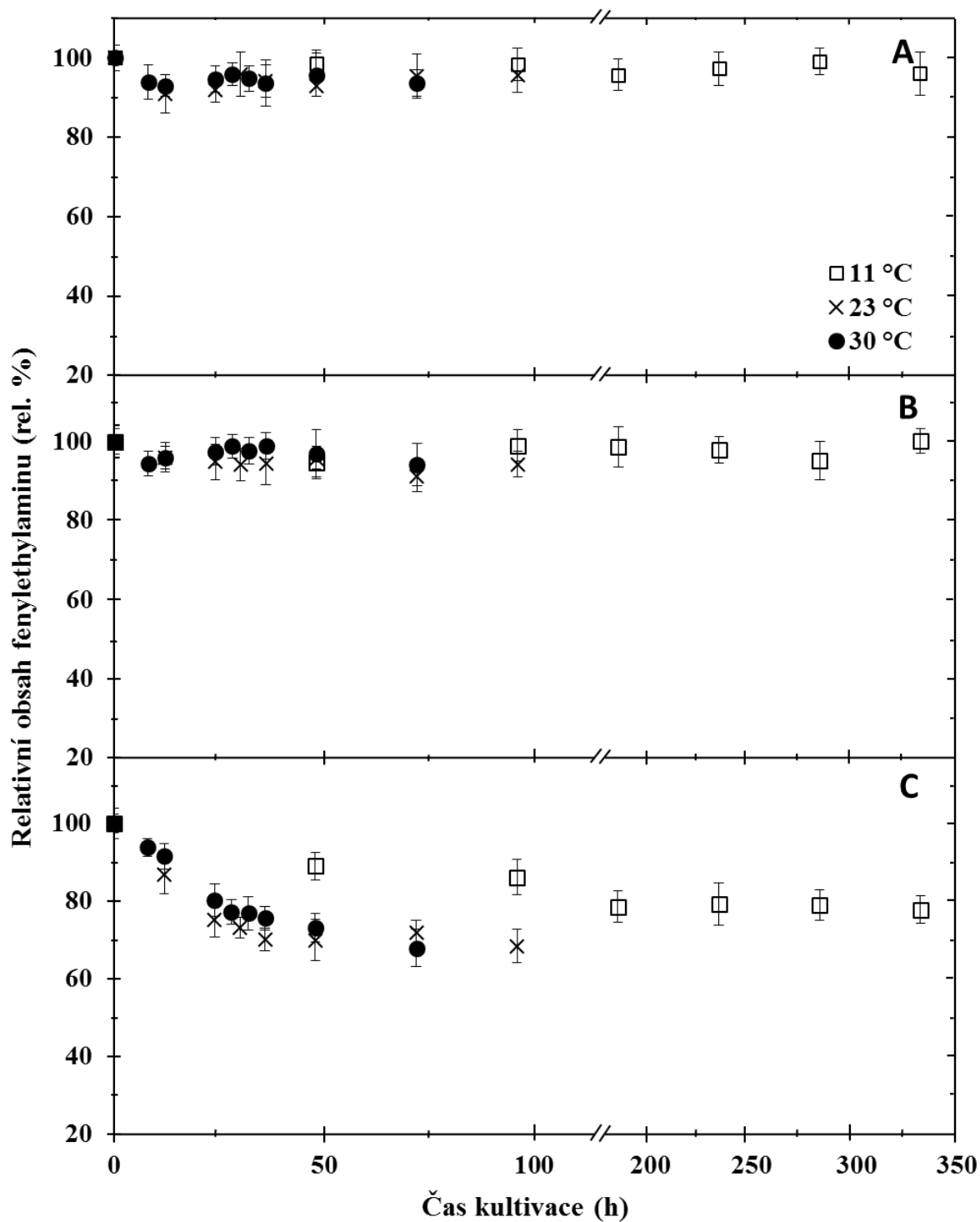
Na Obr. 4.25 lze sledovat vývoj koncentrace v čase za studovaných podmínek posledního testovaného biogenního aminu, a to fenylethylaminu. Pro jeho redukci bakteriálnímu kmeni *L. casei* CCDM 198 nejvíce vyhovovaly podmínky v mléce o pH 7 (Obr. 4.25C). Při této hodnotě pH došlo k signifikantnímu úbytku fenylethylaminu ($P < 0,05$) na konci kultivace při všech třech studovaných teplotách v rozmezí od více než 22 % až do 32 % ve srovnání s počáteční koncentrací v čase 0. Naopak při zbylých dvou testovaných hodnotách pH mléka 5,4 a 6,2 k významné redukci v průběhu testovaných teplot nedocházelo (Obr. 4.25A,B).



Obr. 4.23: Vývoj relativního obsahu putrescinu (rel. %) při degradaci bakterií *Lacticaseibacillus casei* CCDM 198 v mléce. Kultivace probíhaly za teploty 11 °C, 23 °C a 30 °C v mléce o pH 5,4 (část A); 6,2 (část B) a 7,0 (část C). Počáteční relativní obsah putrescinu v čase nula byl vždy 100 %. Výsledky jsou prezentovány pomocí průměrů a standardních odchylek (sloupce; n = 6).



Obr. 4.24 Vývoj relativního obsahu kadaverinu (rel. %) při degradaci bakterií *Lacticaseibacillus casei* CCDM 198 v mléce. Kultivace probíhaly za teploty 11 °C, 23 °C a 30 °C v mléce o pH 5,4 (část A); 6,2 (část B) a 7,0 (část C). Počáteční relativní obsah kadaverinu v čase nula byl vždy 100 %. Výsledky jsou prezentovány pomocí průměrů a standardních odchylek (sloupce; n = 6).



Obr. 4.25 Vývoj relativního obsahu fenylethylaminu (rel. %) při degradaci bakterií *Lacticaseibacillus casei* CCDM 198 v mléce. Kultivace probíhaly za teploty 11 °C, 23 °C a 30 °C v mléce o pH 5,4 (část A); 6,2 (část B) a 7,0 (část C). Počáteční relativní obsah fenylethylaminu v čase nula byl vždy 100 %. Výsledky jsou prezentovány pomocí průměrů a standardních odchylek (sloupce; $n = 6$).

4.3 Experiment III – detekce enzymu multicopperoxidázy

Na základě dostupných informací z literatury schopnost LAB redukovat biogenní aminy souvisí s aktivitou enzymu multicopperoxidázy (MCO), subtypu lakázy. Pro podporu výsledků získaných z HPLC z předchozích experimentů se část výzkumu v rámci předložené disertační práce v rámci experimentu III zaměřila na detekci tohoto enzymu a jeho enzymatickou aktivitou u studovaného bakteriálního kmene *Lactocaseibacillus casei* CCDM 198. Detekce enzymu byla provedena z bezbuněčného extraktu získaného z bakteriální kultury po 0, 24, 48 a 72hodinové kultivaci při teplotě 30 ± 1 °C. Pro studium byly použity dvě metody, které bylo potřeba nejprve zoptimalizovat a nově zavést podle metodiky Callejón et al., (2014, 2017). Na Obr. 4.26 jsou uvedeny získané výsledky z obou metod.

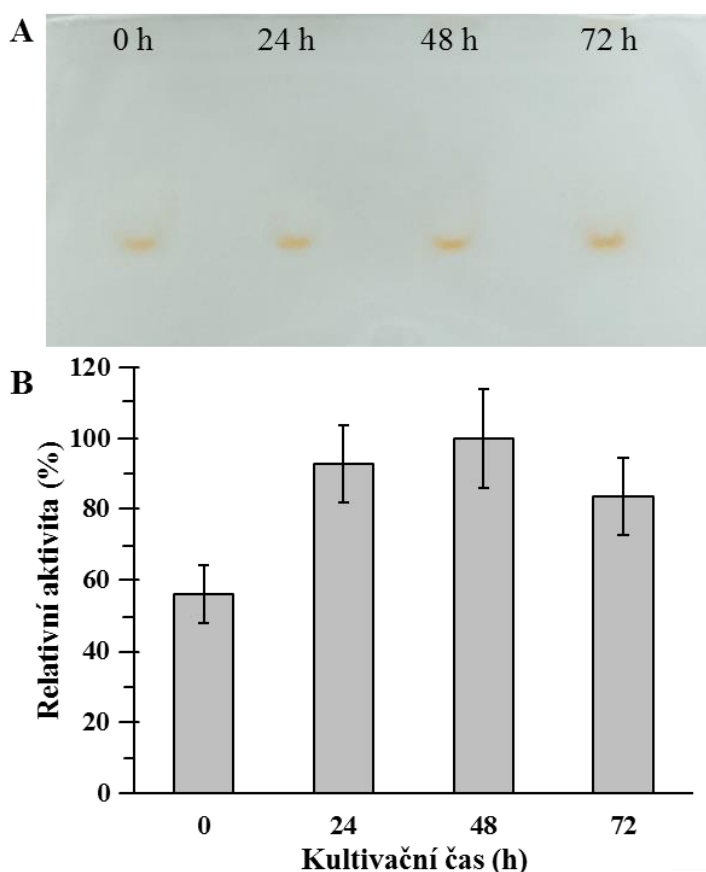
4.3.1 Stanovení přítomnosti enzymu multicopperoxidázy v gelu

První zvolenou metodou bylo stanovení přítomnosti enzymu MCO v polyakrylamidovém gelu po elektroforéze za nativních podmínek. Díky nenedenaturujícímu prostředí, které je zajištěno během separace, si protein zachovává svou přirozenou strukturu a své vlastnosti včetně jeho katalytické aktivity. Po elektroforetické separaci byla přítomnost MCO dokázána enzymatickou reakcí s 2,6-dimethoxyfenolem (DMP), který je typickým substrátem pro lakázu. Výsledky jsou znázorněny na Obr. 4.26A. Jak lze vidět, pozitivní reakce byla odhalena hnědo-oranžovým zabarvením způsobeným oxidací substrátu DMP enzymem lakázou. Přítomnost a aktivita tohoto enzymu byla ve studovaném kmene prokázána ve všech testovaných časech kultivace (0, 24, 48 a 72 hodin). Přestože byla detekována aktivita enzymu, na základě získaných výsledků se nám nepodařilo jednoznačně nalézt statisticky významné rozdíly v aktivitě enzymu v průběhu kultivace. Z tohoto důvodu, a také pro potvrzení výsledků z nativního gelu dokazující přítomnost enzymu MCO u kmene *L. casei* CCDM 198 byla použita i další metoda.

4.3.2 Spektrofotometrické stanovení aktivity enzymu multicopperoxidázy

Druhou zvolenou metodou pro detekci aktivity MCO bylo spektrofotometrické stanovení. Aktivita enzymu MCO byla prokázána nárůstem absorbance při vlnové délce 420 nm při oxidaci ABTS, rovněž dalším typickým substrátem pro lakázu. Změny aktivity enzymu v časovém průběhu po 0, 24, 48 a 72 hodinách inkubace jsou graficky znázorněny na Obr. 4.26B. Naměřená hodnota aktivity enzymu v průběhu času je vynesena jako procentuální relativní aktivita vztažena k maximální naměřené aktivitě vyjádřena jako 100 % (% relativní aktivity). Stejně

jako v prvním případě při stanovení přítomnosti enzymu v gelu byla u studovaného kmene detekována přítomnost a aktivita enzymu MCO. Navíc, což se nepodařilo v gelu (Obr. 4.26A) jednoznačně prokázat, pomocí spektrofotometrického stanovení byly detekovány změny v aktivitě enzymu v závislosti na čase. Jak lze vyčíst z grafu, došlo ke statisticky významnému ($P < 0,05$) nárůstu enzymové aktivity ve všech časech (po 24, 48 a 72 hodinách kultivace) ve srovnání s kontrolou (čas 0 hodin). Už po 24hodinové inkubaci došlo k významnému zvýšení aktivity enzymu a zároveň nejvyšší aktivita byla zjištěna po 48 hodinách kultivace, kdy došlo k více než 45% zvýšení aktivity ve srovnání s počátečním časem 0.



Obr. 4.26: Detekce přítomnosti enzymu multicopperoxidázy (MCO) a jeho enzymatické aktivity u bakteriálního kmene *Lacticaseibacillus casei* CCDM 198 v čase kultivace 0, 24, 48 a 72 hodin. Část A popisuje přítomnost enzymu MCO v polyakrylamidovém gelu po elektroforéze za nativních podmínek vůči substrátu 2,6-dimethoxyfenolu (DMP). Pozitivní reakce je prokázána oranžově žlutým zabarvením. Část B graficky znázorňuje spektrofotometrickou detekci změny % relativní aktivity enzymu MCO v čase při oxidaci substrátu ABTS. Absorbance byla měřena při vlnové délce 420 nm. Aktivita enzymu v průběhu času je vyjádřena jako procentuální relativní aktivita vztažena k maximální naměřené aktivitě 100 % (% relativní aktivity). Výsledky byly vyjádřeny pomocí průměrů a standardních odchylek.

5. DISKUSE

Potraviny kromě prospěšných látek mohou obsahovat látky mající negativní vliv na konzumenta. Mezi tyto látky se mimo jiné řadí i biogenní aminy (BA). U nefermentovaných potravin lze přítomnost BA využít jako ukazatel čerstvosti. Avšak u fermentovaných potravin je jejich výskyt velmi častý kvůli nezbytné přítomnosti mikroorganismů podílejících se na fermentačních procesech. Vzhledem k rizikům spojených s jejich konzumací je snaha redukovat množství jednotlivých BA v těchto potravinách. Bylo navrženo několik strategií zahrnující snížení teploty, ozařování, vhodnou obalovou atmosféru či aplikaci přídatných nebo konzervačních látek (Gardini et al., 2001; Kim et al., 2004; Roseiro et al., 2006; Buňková et al., 2010; Linares et al., 2012; Callejón et al., 2015). Všechny tyto přístupy však pouze nepřímo ovlivňují množství BA, a to především redukcí mikroorganismů, které je produkují. Vhodnější a efektivnější taktikou pro fermentované potraviny je využití mikroorganismů, které tyto nežádoucí látky enzymaticky odbourávají. Pro možnou reálnou aplikaci je potřeba experimentálně vytipovat takové mikroorganismy, které jsou vhodné pro danou potravinu a zároveň dosahují významné degradační aktivity za konkrétních technologických podmínek (Herrero-Fresno et al., 2012).

V předložené disertační práci byla za studovanou bakterii zvolena bakterie mléčného kvašení (LAB) *Lactocaseibacillus casei* CCDM 198. V roce 2018 byl proveden rozsáhlý screening 54 kmenů bakterií využívaných v mlékárenství a získaných ze Sbírký mlékárenských mikroorganismů (CCDM), kdy bakterie *Lactocaseibacillus casei* CCDM 198 vykazovala za optimálních růstových podmínek největší aktivitu ve srovnání s ostatními degradéry (Beneš, 2018). Mimo to, byla také vyvrácena dekarboxylázová aktivita u 4 druhů *Lactocaseibacillus casei* včetně CCDM 198 (Sokolová, 2019), což je v souladu i s další publikací (Tittarelli et al., 2019). Schopnost degradace byla u kmene *Lactocaseibacillus casei* prokázána také například ve studii Herrero-Fresno et al. (2012). Autoři článku vyizolovali 17 bakterií ze tří různých sýrů – Zamorano, Cabrales a Ementálu degradující histamin a tyramin *in vitro*, kdy následná identifikace pomocí sekvenování 16S rRNA tyto bakterie označila za kmene náležející k druhu *Lactocaseibacillus casei*. Výhodou LAB je skutečnost, že jsou klasifikovány jako GRAS a jsou uvedeny v seznamu QPS (Qualified Presumption of Safety lists; EFSA, 2020).

BA mohou být v potravinách odbourávány enzymatickým aparátem daného mikroorganismu. Mezi tyto enzymy řadíme aminosydázové a multicopperoxidázové, konkrétně subtyp lakázy. Existuje několik publikací zabývajících se charakterizací těchto enzymů (Murooka et al., 1979; Sekiguchi et al., 2004; Callejón et al., 2016, 2017; Li et al., 2020). Přestože první zmínka o tom, že lakázy degradují BA u LAB, pochází už z roku 2014 (Callejón et al., 2014), existuje jen několik studií zabývajících se touto problematikou. Vzhledem k tomu že v současné literatuře

aktivita degradačního systému *L. casei* CCDM 198 nebyla studována, bylo nutné se na tuto problematiku zaměřit. Experiment vycházel z poznatků z roku 2020, kdy byla prokázána přítomnost genu MCO u studovaného kmene pomocí molekulárních metod (Pištěková et al., 2020). Nyní byly použity dvě metody a dva substráty (ABTS a DMP) k detekci enzymu MCO v *L. casei* CCDM 198. Získané výsledky dokazují přítomnost a aktivitu MCO v *L. casei* CCDM 198. Navíc byla během inkubace detekována i vyšší enzymatická aktivita ve srovnání s časem 0, což odpovídá i zvýšené relativní genové expresi u tohoto kmene (Pištěková et al., 2020). Toto zjištění je v souladu s jinými publikacemi, které popisují enzymovou aktivitu nebo přítomnost tohoto enzymového genu v jiných bakteriích mléčného kvašení, a to například u *Lacticaseibacillus paracasei*, *Limosilactobacillus fermentum* (dříve *Lactobacillus fermentum*), *Lactiplantibacillus paraplantarum* (dříve *Lactobacillus paraplantarum*), *Lactiplantibacillus plantarum*, *Pediococcus acidilactici*, *Pediococcus pentosaceus*, *Staphylococcus xylosus* (Callejón et al., 2014; Guarcello et al., 2016; Li et al., 2020).

Enzymatické procesy, a tím i redukce BA, mohou být ovlivněny řadou faktorů, mimo jiné dobou kultivace, kultivační teplotou, pH prostředí, dostupností živin a kyslíku nebo fází mikrobiálního růstu. Z tohoto důvodu hlavním cílem předložené disertační práce bylo zmapovat degradační chování *L. casei* CCDM 198 vůči jednotlivým BA za různých podmínek *in vitro* a v reálném potravinovém systému – odstředěném mléce a nalézt nejvhodnější podmínky pro největší degradační aktivitu zvoleného kmene. Interval kultivace a jednotlivé časy odběru pro jednotlivé teploty byly experimentálně určeny na základě růstových křivek studované kultury za optimálních podmínek. Pokles jednotlivých BA v čase byl stanoven HPLC/DAD, uznanou referenční metodou schválenou Evropskou komisí (EC č. 2073/2005; Nařízení Komise, 2005). Na základě dostupných publikací byly vybrány BA, které se nejčastěji vyskytují ve fermentovaných potravinách. Konkrétně zkoumanými BA byly histamin, tyramin, putrescin, kadaverin a fenylethylamin. Požití těchto aminů, nejen u citlivých jedinců, může vyvolávat specifické příznaky, jako je například nauzea, hypertenze a hypotenze, vyrážky, třes, bolesti hlavy, střevní problémy, v závislosti na míře intoxikace (Alvarez a Moreno-Arribas., 2014). Přestože bylo publikováno nespočet výzkumů dokazující nadměrný výskyt BA v potravinách (Valsamaki et al., 2000; Novella-Rodríguez et al., 2003; Fernández et al., 2006, 2007; Spano et al., 2010; Linares et al., 2011; Papavergou et al., 2012) jediným regulovaným aminem v potravinách, který je zároveň obecně považován za nejnebezpečnější, je stále histamin, a to navíc pouze u ryb a rybích produktů (EC č. 2073/2005; Nařízení Komise, 2005). Pravděpodobně hlavním problémem pro určení limitních hodnot je skutečnost, že míra nežádoucích účinků závisí na aktuálním a individuálním stavu každého konzumenta (funkčnost detoxifikačního systému, užívání některých léků, konzumace alkoholu aj.), a také na synergickém účinku jednotlivých aminů. Je proto velmi důležité kontrolovat a snažit se snížit hladinu

i ostatních aminů, které se mohou zdát, že nemusí mít tak významně negativní vliv na zdraví spotřebitele (Sarkadi, 2019). Na základě výsledků bylo prokázáno, že testovaný kmen *L. casei* CCDM 198 za studovaných podmínek významně snižoval přítomnost všech testovaných BA jak *in vitro*, tak v mléce. Největší redukční schopnost *in vitro* byla zjištěna vůči kadaverinu (redukce až o 73 %), následně histaminu (redukce o 70 %) a tyraminu (úbytek o 69 %), putrescinu (o 67 %) a fenylethylaminu (snížení o 55 %). V mléce byla dosažena nižší redukce ve srovnání s redukční schopností bakterie v kultivačním médiu. V mléce byl nejlépe odbouráván putrescin (úbytek na konci kultivace okolo 48 %), poté histamin s kadaverinem (oba okolo 40 % na konci kultivace), fenylethylamin (okolo 32 %) a nejméně *L. casei* CCDM 198 degradoval tyramin, a to maximálně o necelých 20 %.

Pro reálné použití v potravinářském průmyslu bylo také důležité zjistit, jak může kombinace jednotlivých technologických faktorů ovlivnit degradační aktivitu tohoto bakteriálního kmene. Testování vzájemné kombinace různých faktorů na redukční schopnost kmene vůči BA je důležité vzhledem k tomu, že reálné vzorky potravin obsahují také kombinaci několik faktorů/proměnných. Zkoumanými faktory a jejich vzájemnými kombinacemi za *in vitro* podmínek byly teplota kultivace, pH prostředí, počáteční koncentrace biogenních aminů, množství dostupných živin v prostředí, přídavek redukujícího činidla a čas kultivace. Rozdílné teploty, pH prostředí, počáteční koncentrace biogenních aminů a snížený obsah živin (1/2 MRS) měl přiblížit reálnější podmínky v potravinách, navíc u nižší koncentrace potřebných živin byl zkoumán možný předpoklad vyšší redukce jednotlivých BA z důvodu nedostatečné koncentrace potřebných živin. Dalším studovaným faktorem byla přítomnost cysteinu. Na základě doporučení dodavatele testované kultury byl růst podpořen přídavkem 1% cysteinu. Existují publikace potvrzující rychlejší růst u fakultativně anaerobních bakterií mléčného kvašení působením redukujících činidel (cystein, kyselina askorbová atd.) (Lozo et al., 2008; Shu et al., 2013). Předmětem výzkumu bylo také zjistit, zda rychlejší růst kultury ovlivní degradaci zkoumaných BA. Z naměřených výsledků vyplývá, že přídavek cysteinu o výsledné koncentraci 1 % měl signifikantní ($P < 0,05$) vliv na redukci všech studovaných BA, avšak kombinace jednotlivých faktorů s cysteinem redukcí nezvyšovala.

Součástí výzkumu bylo také popsat vliv vybraných faktorů (teplota kultivace, pH prostředí a čas kultivace) na růst bakterie a degradaci aminů v mléce. Mléko bylo vybráno jako modelové prostředí, protože je výchozí surovinou při výrobě fermentovaných mléčných výrobků, které obsahují velké množství BA, jako je například sýr (Linares et al., 2011). Navíc pro jeho výběr přispěla také skutečnost, že zvolený kmen *L. casei* CCDM 198 je izolátem ze sýru. Získané výsledky ukazují na skutečnost, že mléko je vhodným kultivačním médiem pro *L. casei* CCDM 198. Degradace aminů v mléčných produktech pomocí mikroorganismů

byla potvrzena i v jiných publikacích. Snížení biogenních aminů v bujónu i v modelových sýrech byla prokázána například kmeny *Lacticaseibacillus casei* a *Lactiplantibacillus plantarum* (Herrero-Fresno et al., 2012; Adámek et al., 2021). Rozsáhlejší studie zabývající se touto problematikou byla publikována v roce 2016. 94 izolátů (patřících k rodům *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus* a *Weissella*) z různých italských sýrů redukovalo biogenní aminy v chemicky definovaném médiu. Navíc kmeny *Lacticaseibacillus paracasei* CB9CT nebo CACIO6CT snížily obsah histaminu a tyraminu v modelovém sýru (Guarcello et al., 2016). Tittarelli et al. (2019) se ve své práci zabývali nalezením vhodných bakterií pro redukci histaminu a tyraminu. Z 24 studovaných izolátů získaných z ovčího sýru vykazovaly nejvyšší degradační schopnost kmeny *L. casei* (EU626005) a *Enterococcus casseliflavus* (KJ571214) a zároveň neobsahovali geny pro histidinokarboxylázu (*hdc*) a tyrosinokarboxylázu (*tdc*). Kromě mléčných výrobků bakterie mléčného kvašení redukuje přítomnost biogenních aminů i v jiných potravinách a nápojích, a to například už ve zmíněném víně (García-Ruiz et al., 2011; Callejón et al., 2014), ale i v rybí siláži (Dapkevicius et al., 2000), ve fermentované pastě ze sójových bobů (Lee et al., 2016) nebo v kysaném zelí (Rabie et al., 2011). Přestože byl potvrzen významný úbytek všech studovaných BA v mléce, tato redukce byla nižší ve srovnání s výsledky *in vitro*. Tento trend u *L. casei* byl potvrzen i v jiné studii. García-Ruiz et al. (2011) také pozorovali vyšší degradační schopnost *L. casei* vůči histaminu, tyraminu a putrescinu v médiu než v reálné potravine, konkrétně ve víně. *L. casei* IFI-CA 52 degradoval v médiu histamin o 54 %, tyramin o 55 % a putrescin o 65 %, zatímco ve víně došlo k poklesu koncentrace histaminu o 16 %, tyraminu o 15 % a putrescinu o 8 %. Ve srovnání s touto studií, mohlo by se zdát že *L. casei* lépe redukuje BA v mléce než ve víně. Jedním z možných vysvětlení by mohla být již zmíněná skutečnost, že bakterie *L. casei* je izolátem z mléčných výrobků, a proto by se mohla lépe přizpůsobit tomuto prostředí. Na druhou stranu víno obsahuje ethanol, který může ovlivnit schopnost bakterií redukovat BA (Wang et al., 2022). Wang et al. (2022) zkoumali také vliv jednotlivých potravinových matric (rybí surimi, hroznová šťáva a tofu) na degradaci histaminu a tyraminu. Tato studie prokázala, že typ potravinové matrice významně ovlivňuje katalytickou aktivitu enzymu MCO. Například v rybím surimi docházelo k redukci histaminu o 28 %, zatímco v hroznové šťávě degradace histaminu nebyla zjištěna. Z těchto důvodů je důležité ověřit redukční schopnost zkoumaného bakteriálního kmene v konkrétní potravinové matrici. Naše výsledky potvrzují předpoklad vhodnosti pro možnou aplikaci *L. casei* CCDM 198 do fermentovaných mléčných výrobků.

Teplota a pH jsou dalšími faktory, které mají významný vliv nejen na růst mikroorganismů, ale také na aktivitu MCO, a tím i následnou hladinu BA v systému. Vybrané testované teploty byly zvoleny tak, aby reprezentovaly nejběžnější výrobní a skladovací teploty. Teplota 30 °C je optimální teplota pro studovaný kmen, 11 °C představuje teplotu skladování v chladu i teplotu zrání

pro mnoho sýrů a dalších potravin, zatímco 23 °C je pokojová teplota, při které jsou potraviny často nesprávně skladovány. Zatímco testované hodnoty pH měly pokrýt široký rozsah pH prostředí kyselých i nekyselých potravin. Na základě naměřených výsledků má teplota a pH a jejich kombinace významný vliv ($P < 0,05$) na vývoj jednotlivých BA. Zároveň však nebyl nalezen společný trend pro redukci všech testovaných aminů. Navíc byla zjištěna odlišná schopnost *L. casei* CCDM 198 snižovat počet jednotlivých aminů v závislosti na různých kombinacích faktorů. Pro některé aminy však byly zjištěny podobnosti v redukci. Například putrescin a kadaverin vykazovaly podobný trend, stejně tak byla nalezena podobnost při redukci tyraminu s fenylethylaminem, zatímco se zdá, že histamin dosahoval maximální úbytky při jiných optimálních podmínkách než ostatní aminy. Z tohoto zjištění vyplývá, že by rychlost redukce mohla souviset se strukturou aminů. Putrescin a kadaverin jsou alifatické aminy s krátkým řetězcem, fenylethylemin a tyramin jsou aromatické aminy (proto pravděpodobně vykazovaly podobné trendy v degradaci), zatímco histamin je heterocyklický amin. Tato skutečnost by také mohla vysvětlit odlišné optimální hodnoty pH a teploty pro jednotlivé aminy během degradace *L. casei* CCDM 198. Je možné, že konkrétní teplota a pH by mohly způsobovat dočasné konformační změny v aktivním místě enzymu MCO, čímž by mohlo dojít k ovlivnění navázání konkrétního substrátu na enzym. Vytvořená hypotéza se opírá také o získané výsledky v publikaci Tepkasikul et al. (2022). Ve studii autoři zkoumali redukční schopnost *Bacillus piscicola* FBU1786 vůči různým BA, a také došli k závěru, že degradace BA je selektivní, minimálně na základě struktury jednotlivých BA. *Bacillus piscicola* FBU1786 nejprve degradoval alifatické aminy s krátkým řetězcem (v pořadí putrescin a poté kadaverin), následně histamin a aromatické aminy (v pořadí zjištěné redukce fenylethylamin a tyramin) a poté alifatické aminy s dlouhým řetězcem (jako je spermin a spermidin, které byly degradovány velmi málo). Naše výsledky jsou také v souladu i s jinými nedávnými studiemi, které poukazují na fakt, že bakteriální MCO má větší afinitu k jednomu substrátu než jinému (včetně jednotlivých BA) a že jednotlivé substráty mají různé optimální pH hodnoty a teplotu. Navíc na základě dostupných publikací se také zdá, že lakázy jednotlivých mikroorganismů mohou mít odlišnou optimální pH hodnotu a teplotu pro stejný substrát (Callejón et al., 2016, 2017; Li et al., 2020; Olmeda et al., 2021; Ni et al., 2022; Tepkasikul et al., 2022; Wang et al., 2022). Tyto rozdíly se týkají jak typických substrátů pro tyto enzymy, tak jednotlivých BA, které degradují. Rekombinantní lakáza z *Lactiplantibacillus plantarum* J16 (CECT 8944) vykazovala největší oxidační aktivitu při pH hodnotě 3,5 pro substrát ABTS a 7,0 pro 2DMP. Také bylo zjištěno, že optimální teplota pro substrát DMP je okolo 60 °C (Callejón et al., 2016). Optimální pH pro rekombinantní lakázu z *Pediococcus acidilactici* CECT 5930 (Lpa5930) bylo přibližně 4,0 pro ABST a maximální aktivita byla zjištěna při teplotě okolo 28 °C (Callejón et al., 2017). Přestože oba enzymy vykazovaly podobné optimální podmínky pro redukci tyraminu (teplota okolo 28 °C a pH 4,0 a 9,5), zdá se,

že pro oxidaci histaminu a putrescinu jsou vhodnější jiné podmínky. Tato skutečnost byla potvrzena i v této disertační práci. Je důležité zvolit vhodné podmínky prostředí, kdy nevhodná kombinace faktorů nepodporuje degradační schopnost bakterie. Odlišné výsledky byly získány ve studii z roku 2020 pro rekombinantní lakázu (rLac) z *Bacillus velezensis* TCCC 111904. Optimální teplota a pH hodnota pro tuto lakázu byly 80 °C a 5,5 v případě substrátu ABTS (Li et al., 2020). Autoři práce Tepkasikul et al. (2022) studovali účinky faktorů prostředí (včetně pH a kultivační teploty) na degradaci histaminu enzymem lakázou z *Bacillus piscicola* FBU1786. Snížení histaminu bylo studováno v rozmezí pH 4–10. Nejvyšší redukce byla zaznamenána v rozmezí pH hodnot od 6 do 9, zatímco při hodnotách pH 4; 5 a 10 nebyla zjištěna žádná nebo jen malá redukční schopnost vůči histaminu. Při zkoumaných teplotách 30; 37 a 45 °C bakteriální kmen FBU1786 zcela snížil hladinu histaminu. Wang et al. (2022) prokázali vyšší redukci histaminu a tyraminu v neutrálním prostředí než v kyselém prostředí pomocí enzymu MCO, což jsou odlišné pH podmínky pro optimální degradaci tyraminu lakázou z *Lactiplantibacillus plantarum* (Callejón et al., 2016). Olmeda et al. (2021) zkoumali redukci jednotlivých aminů lakázami z *Pediococcus laccases* 5930 a *Pediococcus pentosaceus* 4816. Ve své studii zjistili, že obě testované lakázy nebyly schopny degradovat histamin, putrescin ani fenylethylamin, ale byly schopny oxidovat tyramin, avšak pouze v přítomnosti mediátoru.

Získané výsledky v rámci předložené disertační práce potvrzují významnou degradační schopnost kmene *Lacticaseibacillus casei* CCDM 198, jak za *in vitro* podmínek, tak i v mléce, výchozí matici pro řadu fermentovaných mléčných produktů. Také byla detekována u studovaného kmene přítomnost a katalytická aktivita enzymu MCO, který je zodpovědný za redukci BA u bakterií mléčného kvašení. Existuje tedy reálný potenciál pro aplikace zkoumané kultury do fermentovaných mléčných produktů za účelem redukce nežádoucích BA. Navíc na základě publikací aplikace kmenů degradujících BA (včetně *Lacticaseibacillus casei* CCDM 198) významně neovlivňuje základní chemické parametry (hodnoty pH, obsah sušiny, obsah soli, obsah tuku v sušině) nebo texturu (tvrdost) přírodních sýrů (Guarcello et al., 2016; Adámek et al., 2021). Využití vhodných degradérů představuje efektivní strategii pro redukci nežádoucích BA a následnou minimalizaci rizik spojených s nežádoucími účinky na konzumenta.

6. ZÁVĚR

Disertační práce byla zaměřena na studium degradace biogenních aminů v závislosti na technologických faktorech pomocí enzymatické degradace mikrobiálním kmenem *Lacticaseibacillus casei* CCDM 198. Byla zmapována a popsána degradační aktivita studovaného kmene vůči obsahu biogenních aminů za *in vitro* podmínek a v reálné potravíně – v mléce. V neposlední řadě byla také studována přítomnost a aktivita enzymu multicopperoxidázy (MCO), který je zodpovědný za degradaci biogenních aminů.

Z výsledků a diskuse práce vyplývají následující závěry:

- U kmenu *L. casei* CCDM 198 byla potvrzena degradační aktivita *in vitro* vůči všem studovaným biogenním aminům, kdy největší redukční schopnost byla zjištěna vůči kadaverinu (redukce až o 73 %), následně histaminu (redukce o 70 %), tyraminu (úbytek o 69 %), putrescinu (o 67 %) a fenylethylaminu (snížení o 55 %).
- Schopnost odbourávat všechny studované biogenní aminy kmenem *L. casei* CCDM 198 byla potvrzena a zmapována také v reálné potravíně. Zde byla pozorována nižší degradační schopnost ve srovnání s redukční schopností bakterie rostoucí v kultivačním médiu. V mléce docházelo k maximálnímu úbytku putrescinu až o 48 %, kadaverinu až o 40 %, histaminu o 39 %, fenylethylaminu o 32 %. Nejméně byl redukován tyramin, u kterého došlo k redukci nanejvýš o 19 %.
- Bylo prokázáno, že degradace všech jednotlivých biogenních aminů závisí na technologických faktorech, kdy nevhodně zvolená kombinace faktorů nepodporuje degradační schopnost bakterie *L. casei* CCDM 198.
- Byla zjištěna rozdílná schopnost bakterie *L. casei* CCDM 198 degradovat jednotlivé aminy při stejných technologických podmínkách jak *in vitro*, tak i v reálné potravíně.
- Přídavek cysteinu do MRS bujónu měl signifikantní ($P < 0,05$) vliv na redukci všech studovaných BA, avšak kombinace jednotlivých faktorů s cysteinem redukci významně nezvyšovaly.
- Byla prokázána přítomnost a aktivita enzymu multicopperoxidázy (MCO), subtypu lakázy u studovaného kmene *L. casei* CCDM 198

pomocí spektrofotometrického stanovení a detekce v nativním polyakrylamidovém gelu.

- Na základě spektrofotometrického měření byly zjištěny také rozdíly v aktivitě enzymu MCO v závislosti na čase kultivace.
- Nejvyšší aktivita enzymu MCO byla detekována po 48 hodinách kultivace, kdy došlo k více než 45% zvýšení aktivity ve srovnání s počátečním časem 0.

Závěrem lze říct, že získané výsledky potvrzují vliv prostředí na schopnost degradovat biogenní aminy pomocí bakteriálního kmene *L. casei* CCDM 198 enzymem multicopperoxidázou (MCO). Jak bylo prokázáno, je důležité zvolit vhodné podmínky prostředí, kdy nevhodná kombinace faktorů nepodporovala degradační schopnost bakterie. Díky této studii existuje reálný potenciál pro aplikaci zkoumané kultury *Lacticaseibacillus casei* CCDM 198 v potravinářském průmyslu. Použití vhodných degradérů by mohlo být účinnou strategií k minimalizaci rizik spojených s nadměrným výskytem biogenních aminů v potravinách.

7. PŘÍNOS PRO VĚDU A PRAXI

Nadměrné množství biogenních aminů ve fermentovaných potravinách představuje zdravotní riziko pro konzumenta. Jedna z aktuálních možností, jak ovlivnit přítomnost těchto nežádoucích látek v potravinách, je aplikace bakteriálních kmenů, které enzymaticky tyto biogenní aminy odbourávají. Pro reálnou a cílenou aplikaci do konkrétních potravin je důležité experimentálně popsat redukční schopnost u daného mikroorganismu, a také pochopit jeho enzymatický aparát zapojený do odbourávání biogenních aminů.

Předložená disertační práce se zabývala uvedenými aspekty a její vyplývající přínos pro oblast vědy a praxe lze shrnout do následujících bodů:

- Bylo provedeno rozsáhlé zmapování degradačního chování kmene *Lacticaseibacillus casei* CCDM 198 vůči 5 biogenním aminům *in vitro* a v reálné potravíně.
- U studovaného kmene byla potvrzena významná redukční schopnost *in vitro* a také v mléce, významným výchozím materiálem pro fermentované mléčné produkty.
- Byl popsán vliv technologických faktorů na degradační schopnost tohoto kmene.
- Bylo prokázáno, že *Lacticaseibacillus casei* CCDM 198 má rozdílnou degradační aktivitu vůči jednotlivým studovaným biogenním aminům.
- Byly optimalizovány metody (spektrofotometrické a detekce aktivity v gelu) pro identifikaci přítomnosti a aktivity enzymu multicopperoxidázy, sybtypu lakázy.
- Jedná se o první studii detekující u kmene *Lacticaseibacillus casei* CCDM 198 přítomnost a aktivitu enzymu multicopperoxidázy, subtypu lakázy.
- Výsledky poukazují na vhodnost aplikace kmene *Lacticaseibacillus casei* CCDM 198 v potravinářském průmyslu jako na možnou strategii při redukci biogenních aminů ve fermentovaných potravinách.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- ADÁMEK, R., PACHLOVÁ, V., SALEK, R.N., NĚMEČKOVÁ, I., BUŇKA, F., BUŇKOVÁ, L. (2021). Reduction of biogenic amine content in Dutch-type cheese as affected by the applied adjunct culture. *LWT - Food Science and Technology*. 152, 112397. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112397>
- AHMAD, W., MOHAMMED, G.I., AL-ERYANI, D.A., SAIGL, Z.M., ALYOUBI, A.O., ALWAEEL, 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(6), 485-500. <https://doi.org/10.1080/10408347.2019.1657793>
- 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*. 39(2), 146-155. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2014.07.007>
- BAO, W., O'MALLEY, D.M., WHETTEN, R., SEDEROFF, R.R. (1993). A laccase associated with lignification in loblolly pine xylem. *Science*. 260, 672-674. <https://doi.org/10.1126/science.260.5108.672>
- BARCENILLA, C., DUCIC, M., LÓPEZ, M., PRIETO, M., ÁLVAREZ-ORDÓNEZ, A. (2022). Application of lactic acid bacteria for the biopreservation of meat products: A systematic review. *Meat Science*. 183, 108661. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2021.108661>
- BARDÓCZ, S. (1995). Polyamines in food and their consequences for food quality and human health *Trends in Food Science and Technology*. 6, 341-346. [https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(00\)89169-4](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(00)89169-4)
- BENKERROUM, N. (2016). Biogenic Amines in Dairy Products: Origin, Incidence, and Control Means. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 15, 801-826. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12212>
- BENEŠ, Š. Skrining vybraných bakterií využívaných v mlékárenství na schopnost degradace biogenních aminů. Zlín, 2018. Bakalářská práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta technologická, Ústav technologie potravin.
- BENNER, R.A., STARUSZKIEWICZ, W.F., ROGERS, P.L., OTWELL, W.S. (2003). Evaluation of putrescine, cadaverine, and indole as chemical indicators of decomposition in Penaeid shrimp. *Journal Food Science*. 68, 2178-2185. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2003.tb05743.x>

- BILGIN, B., GENCCLEP, H. (2015). Determination of Biogenic Amines in Fish Products. *Food Science. Biotechnology.* 24(5), 1907-1913. <https://doi.org/10.1007/s10068-015-0251-4>
- BOVER-CID, S., IZQUIERDO-PULIDO, M., VIDAL-CAROU, M.C. (2001). Changes in biogenic amine and polyamine contents in slightly fermented sausages manufactured with and without sugar. *Meat Science.* 57(2), 215-21. [https://doi.org/10.1016/S0309-1740\(00\)00096-6](https://doi.org/10.1016/S0309-1740(00)00096-6)
- BUŇKA, F., BUDINSKÝ, P., ZIMÁKOVÁ, B., MERHAUT, M., FLASAROVÁ, R., PACHLOVÁ, V., KUBÁŇ, V., BUŇKOVÁ, L. (2013). Biogenic amines occurrence in fish meat sampled from restaurants in region of Czech Republic. *Food Control.* 31, 49-52. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.09.044>
- BUŇKOVÁ, L., BUŇKA, F., MANTLOVÁ, G., ČÁBLOVÁ, A., SEDLÁČEK, I., ŠVEC, P., PACHLOVÁ, V., KRÁČMAR, S. (2010). The effect of ripening and storage conditions on the distribution of tyramine, putrescine and cadaverine in Edam-cheese. *Food Microbiology.* 27, 880-888. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.04.014>
- BRADFORD, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry.* 72, 248-254. <https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>
- CALLEJÓN, 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. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-4829-6>
- CALLEJÓN, 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(16), 4170-4178. <https://doi.org/10.1021/jf5026967>
- CALLEJÓN, 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. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-7158-0>
- CALLEJÓN, S., SENDRA, R., FERRER, S., PARDO, I. (2017). Recombinant laccase from *Pediococcus acidilactici* CECT 5930 with ability to degrade tyramine. *PLOS One.* 12(10), 186019. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0186019>

- 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, 1-6. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00122>
- CINQUINA, A.L., CALI, A., LONGO, F., DE SANTIS, L., SEVERONI, A., ABBALLE, F. (2004). Determination of biogenic amines in fish tissues by ion-exchange chromatography with conductivity detection. *Journal of Chromatography A*. 1032, 73-77. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2004.01.013>
- COMAS-BASTÉ, O., SÁNCHEZ-PÉREZ, S., VECIANA-NOGUÉS, M.T., LATORRE-MORATALLA, M., VIDAL-CAROU, M.C. (2020). Histamine Intolerance: The Current State of the Art. *Biolomecules*. 10, 1181. <https://doi.org/10.3390/biom10081181>
- DADÁKOVÁ, E., KŘÍŽEK, M., PELIKÁNOVÁ, T. (2009). Determination of biogenic amines in foods using ultra performance liquid chromatography (UPLC). *Food Chemistry*. 116(1), 365-370. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.02.018>
- DAPKEVICIUS, M.L.N.E., NOUT, M.J.R., ROMBOUTS, F.M., HOUBEN, J.H., WMENGA, W. (2000). Biogenic amine formation and degradation by potential fish silage starter microorganisms. *International Journal of Food Microbiology*. 57, 107-114. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(00\)00238-5](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00238-5)
- DOEUN, D., DAVAATSEREN, M., CHUNG, M.S. (2017). Biogenic amines in foods. *Food science and biotechnology*. 26(6), 1463-1474. <https://doi.org/10.55251/jmbfs.5221>
- 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, 1. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2002.tb11400.x>
- DURLU-ÖZKAYA, F., AYHAN, K., VURAL, N. (2001). Biogenic amines produced by *Enterobacteriaceae* isolated from meat products. *Meat Science*. 58, 163-166. [https://doi.org/10.1016/S0309-1740\(00\)00144-3](https://doi.org/10.1016/S0309-1740(00)00144-3)
- ELMORE, B.O., BOLLINGER, J.A., DOOLEY, D.M. (2002). Human kidney diamine oxidase: Heterologous expression, purification, and characterization. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*. 7, 565-579. <https://doi.org/10.1007/s00775-001-0331-1>

- EMBORG, J., DALGAARD, P., AHRENS, P. (2006). *Morganella psychrotolerans* sp. nov., a histamine-producing bacterium isolated from various seafoods. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 56, 2473-2479. <https://doi.org/10.1099/ij.s.0.64357-0>
- 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(9), 1519-1527. <https://doi.org/10.4014/jmb.1506.06006>
- EFSA (2011). Question Number EFSA-Q-2009-00829. Scientific opinion on risk based control of biogenic amine formation in fermented foods. *EFSA Journal*. 9, 2393-2486. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2011.2393>
- EFSA (2020). The 2019 updated list of QPS status recommended biological agents in support of EFSA risk assessments. *EFSA Journal*. 17, 1-5. <https://doi.org/10.5281/zenodo.3648682>
- 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. <https://doi.org/10.1023/A:1013783030276>
- FARKAS, J. (2006). Irradiation for better foods. *Trends in Food Science and Technology*. 17, 148-152. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2005.12.003>
- FERNÁNDEZ, M., FLÓREZ, A.B., LINARES, D.M., MAYO, B., ALVAREZ, M.A. (2006). Early PCR detection of tyramine-producing bacteria during cheese production. *Journal of Dairy Research*. 73, <https://doi.org/10.1017/S0022029906001750>
- FERNÁNDEZ, M., LINARES, D.M., RODRÍGUEZ, A., ALVAREZ, M.A. (2007). Factors affecting tyramine production in *Enterococcus durans* IPLA 655. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 73, 1400-1406. <https://doi.org/10.1007/s00253-006-0596-y>
- FERNÁNDEZ-REINA, A., URDIALES, A.L., SÁNCHEZ-JIMÉNEZ, O.F. (2018). What We Know and What We Need to Know about Aromatic and Cationic Biogenic Amines in the Gastrointestinal Tract. *Foods*. 7, 145. <https://doi.org/10.3390/foods7090145>
- FINNEY, J., MOON, H.J., RONNEBAUM, T., LANTZ, M., MURE, M. (2014). Human copper-dependent amine oxidases. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 546, 19-32. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2013.12.022>
- GALGANO, F., SUZZI, G., FAVATI, F., CARUSO, M., MARTUSCELLI, M., GARDINI, F., SALZANO, G. (2001). Biogenic amines during ripening

- in “Semicotto Caprino” cheese: Role of enterococci. *International Journal of Food Science and Technology*. 36, 153-160. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2621.2001.00443.x>
- GÁLVEZ, A., ABRIOUEL, H., BENOMAR, N., LUCAS, R. (2010). Microbial antagonists to food-borne pathogens and biocontrol. *Current Opinion in Biotechnology*. 21, 142-148. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2010.01.005>
- GARCÍA-RUIZ, A., GONZÁLEZ-ROMPINELLI, E.M., BARTOLOMÉ, B., MORENO-ARRIBAS, V. (2011). Potential of wine-associated lactic acid bacteria to degrade biogenic amines. *International Journal of Food Microbiology*. 148, 115-120. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.05.009>
- GARDINI, F., MARTUSCELLI, M., CARUSO, M.C., GALGANO, F., CRUDELE, M.A., FAVATI, F., GUERZONI, M.E., SUZZI, G. (2001). Effect of pH, temperature and NaCl concentration on the growth kinetic, proteolytic activity and biogenic amines production of *Enterococcus faecalis*. *International Journal of Food Microbiology*. 64, 105-117. [https://doi.org/10.1016/s0168-1605\(00\)00445-1](https://doi.org/10.1016/s0168-1605(00)00445-1)
- GARDINI, F., MARTUSCELLI, M., CRUDELE, M.A., PAPERELLA, A., SUZZI, G. (2002). Use of *Staphylococcus xylosus* as a starter culture in dried sausages: effect on the biogenic amine content. *Meat Science*. 61(3), 275-283. [https://doi.org/10.1016/s0309-1740\(01\)00193-0](https://doi.org/10.1016/s0309-1740(01)00193-0)
- GEZGINC, Y., AKYOL, I., KULEY, E., ÖZOGUL, F. (2013). Biogenic amines formation in *Streptococcus thermophilus* isolated from home-made natural yogurt. *Food Chemistry*. 138, 655-662. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.10.138>
- GIARDINA, P., FARACO, V., PEZZELLA, C., PISCITELLI, A., VANHULLE, S., SANNIA, G. (2010). Laccases: a never-ending story. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 67, 369-385. <https://doi.org/10.1007/s00018-009-0169-1>
- GUARCELLO, R., DE ANGELIS, M., SETTANNI, L., FORMIGLIO, S., GAGLIO, R., MINERVINI, F., MOSCHETTI, G., GOBBETTI, M. (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. <https://doi.org/10.1128/AEM.01051-16>
- HALÁSZ, A., BARÁTH, Á., SIMON-SARKADI, L., HOLZAPFEL, W. (1994). Biogenic amines and their production by microorganisms in food. *Trends*

in *Food Science and Technology*. 5, 42-48. [https://doi.org/10.1016/0924-2244\(94\)90070-1](https://doi.org/10.1016/0924-2244(94)90070-1)

HENRÍQUEZ-AEDO, K., VEGA, M., PRIETO-RODRÍGUEZ, S., ARANDA, M. (2012). Evaluation of biogenic amines content in chilean reserve varietal wines. *Food and Chemical Toxicology*. 50, 2742-2750. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.05.034>

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(2), 297-304. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.06.002>

HERNÁNDEZ-JOVER, T., IZQUIERDO-PULIDO, M., VECIANA-NOGUÉS, M.T., VIDAL-CAROU, M.C. (1996). Biogenic Amine Sources in Cooked Cured Shoulder Pork. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 44, 3097-3101. <https://doi.org/10.1021/jf960250s>

HUGAS, M., MONFORT, J.M. (1997). Bacterial starter cultures for meat fermentation. *Food Chemistry*. 59(4), 547-554. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(97\)00005-8](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(97)00005-8)

CHANDER, H., BATISH, V.H., BABU, S., SINGH, R.S. (1989). Factors affecting amine production by selected strain of *Lactobacillus bulgaricus*. *Journal of Food Science*. 54, 940-942. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1989.tb07917.x>

CHONG, C.Y., ABU BAKAR, F., RUSSLY, A.R., JAMILAH, B., MAHYUDIN, N.A. (2011). The effects of food processing on biogenic amines formation. *International Food Research Journal*. 18(3), 867-876. <https://doi.org/10.1007/s13197-012-0621-3>

IGARASHI, K., ITO, K., KASHIWAGI, K. (2001). Polyamine uptake systems in *Escherichia coli*. *Research in Microbiology*. 152, 271-278. [https://doi.org/10.1016/S0923-2508\(01\)01198-6](https://doi.org/10.1016/S0923-2508(01)01198-6)

KALÁČ, P. (2009). Recent advances in the research on biological roles of dietary polyamines in man. *Journal of Applied Biomedicine*. 7, 65-74. <https://doi.org/10.32725/jab.2009.007>

KAPPELLER-ADLER, R. (1941). Histidine metabolism in toxæmia of pregnancy. Isolation of histamine from the urine of patients with toxæmia of pregnancy. *Biochemical Journal*. 35(1-2), 213-218. <https://doi.org/10.1042/bj0350213>

- KAROVIČOVÁ, J., KOHAJDOVÁ, Z. (2005). Biogenic Amines in Food. *Chemické listy*. 59(1), 70-79. <https://doi.org/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(5), 405-408. [https://doi.org/10.1016/S0956-7135\(03\)00102-6](https://doi.org/10.1016/S0956-7135(03)00102-6)
- KIM, J.H., KIM, D.H., AHN, H.J., PARK, H.J. BYUN, M.W. (2005a). Reduction of the biogenic amine contents in low salt-fermented soybean paste by gamma irradiation. *Food Control*, 16(1), 43-49. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2003.11.004>
- KIM, J.H., AHN, H.J., LE, J.W., PARK, H.J., RYN, G.H., KANG, L.J. (2005b). Effects of gamma irradiation on the biogenic amines in pepperoni with different packaging conditions. *Food Chemistry*, 89(2), 199-205. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.02.026>
- KLAUSEN, N.K., LUND, E. (1986). Formation of biogenic amines in herring and mackerel. *Zeitschrift für Lebensmittel Untersuchung und Forschung*. 182, 459-463. <https://doi.org/10.1007/BF01043268>
- KOMPRDA, T., SMĚLÁ, D., NOVICKÁ, K., KALHOTKA, L., ŠUSTOVÁ, K., PECHOVÁ, P. (2007). Content and distribution of biogenic amines in Dutch-type hard cheese. *Food Chemistry*. 102, 129-137. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.04.041>
- KUNG, H.F., TSAI, Y.H., WEI, C.I. (2007). Histamine and other biogenic amines and histamine-forming bacteria in miso products. *Food Chemistry*. 101, 351-356. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.12.057>
- LADERO, V., FERNÁNDEZ, M., CUESTA, I., ALVAREZ, M.A. (2010). Quantitative detection and identification of tyramine-producing enterococci and lactobacilli in cheese by multiplex qPCR. *Food Microbiology*. 27, 933-939. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.05.026>
- LANDETE, J.M., FERRER, S., POLO, L., PARDO, I. (2005). Biogenic amines in wines from three Spanish regions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53, 1119-1124. <https://doi.org/10.1021/jf049340k>
- LANDETE, J.M., DE LAS RIVAS, B., MARCOBAL, A., MUNOZ, R. (2007). Molecular methods for the detection of biogenic amine-producing bacteria on foods. *International Journal of Food Microbiology*. 117, 258-269. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.05.001>
- LEE, Y.CH., KUNG, H.F., HUANG, Y.L., WU, CH.H., HUANG, Y.R., TSAI, Y.H. (2016). Reduction of Biogenic Amines during Miso Fermentation

- by *Lactobacillus plantarum* as a Starter Culture. *Journal of Food Protection*. 79(9), 1556–1561. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-16-060>
- LEROY, F., DE VUYST, L. (2004). Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends in Food Science and Technology*. 15(2), 67-78. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2003.09.004>
- 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. [https://doi.org/10.1016/s0168-1605\(97\)00109-8](https://doi.org/10.1016/s0168-1605(97)00109-8)
- LI, 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. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2020.09.012>
- LI, X., YU, Z., ZHU, Y., CAO, Z. (2020) Selection of nitrite-degrading and biogenic amine-degrading strains and its involved genes. *Food Quality and Safety*. 4, 225-235. <https://doi.org/10.1093/fqsafe/fyaa027>
- LINARES, D.M., FERNÁNDEZ, M.M., MARTÍN, M.C., ÁLAVAREZ, M.A. (2009). Tyramine biosynthesis in *Enterococcus durans* is transcriptionally regulated by the extracellular pH and tyrosine concentration. *Microbial Biotechnology*. 2(6), 625-633. <https://doi.org/10.1111/j.1751-7915.2009.00117.x>
- LINARES, D.M., MARTÍN, M.C., LADERO, V., ÁLAVAREZ, M.A., FERNÁNDEZ, M.M. (2011). Biogenic Amines in Dairy Products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 51(7), 691-703. <https://doi.org/10.1080/10408398.2011.582813>
- LINARES, D.M., DEL RÍO, B., LADERO, V., MARTÍNEZ, N., FERNÁNDEZ, M.M., MARTÍN, M.C., ÁLAVAREZ, M.A. (2012). Factors influencing biogenic amines accumulation in dairy products. *Frontiers in Microbiology*. 3, 180. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00180>
- LONVAUD-FUNEL, A. (2001). Biogenic amines in wines: role of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Letters*. 199, 9-13. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2001.tb10643.x>
- LORENCOVÁ, E., SALEK, R.N., ČERNÍKOVÁ, M., BUŇKOVÁ, L., HÝLKOVÁ, A., BUŇKA, F. (2020). Biogenic amines occurrence in beers produced in Czech microbreweries. *Food Control*. 117, 107335. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107335>
- LOUKOU, Z., ZOTOU, A. (2003). Determination of biogenic amines as dansyl derivatives in alcoholic beverages by high-performance liquid

- chromatography with fluorimetric detection and characterization of the dansylated amines by liquid chromatography–atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 996, 103-113. [https://doi.org/10.1016/s0021-9673\(03\)00558-2](https://doi.org/10.1016/s0021-9673(03)00558-2)
- LOZO, J., BEGOVIČ, J., JOVČIČ, B., GOLIČ, N., TOPISIROVIČ, I. (2008). Effect of methionine and cysteine deprivation on growth of different natural isolates of *lactobacillus* spp. in chemically defined media. *Archives of Biological Sciences*. 60(4), 509-517. <https://doi.org/10.2298/ABS0804509L>
- MAH, J.H., HWANG, H.J. (2009). Effects of food additives on biogenic amine formation in Myeolchi-jeot, a salted and fermented anchovy (*Engraulis japonicus*). *Food Chemistry*. 114(1), 168-73. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.09.035>
- MAH, J.H., KIM, Y.J., HWANG, H.J. (2009). Inhibitory effects of garlic and other spices on biogenic amine production in Myeolchi-jeot, Korean salted and fermented anchovy product. *Food Control*. 20(5), 449-54. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2008.07.006>
- MAHMOUDZADEH, M., ABEDI, A.-S., MOSLEMI, M., PILEVAR, Z., GHANI, A. (2022). Biogenic amines in foods: Surveying effective factors and measuring methods. *Journal of microbiology, biotechnology and food sciences*. 12(1), 5221. <https://doi.org/10.55251/jmbfs.5221>
- MANTOANELLI, J.O.F., GONCALVES, L.M., PEREIRA, E.A. (2020). Dansyl Chloride as a Derivatizing Agent for the Analysis of Biogenic Amines by CZE-UV. *Chromatographia*. 83, 767-778. <https://doi.org/10.1007/s10337-020-03896-x>
- 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(3), 228-232. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2000.00796.x>
- MIETZ, J.L., KARMAS, E. (1978). Polyamine and histamine content of rockfish, salmon, lobster, and shrimp as an indicator of decomposition. *Association of Official Analytical Chemists*. 61, 139-145. <https://doi.org/10.1093/jaoac/61.1.139>
- 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(2), 791-799. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2006.12.030>

- 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. <https://doi.org/10.1128/jb.175.10.2864-2870.1993>
- MORENO-ARRIBAS, M.V., LONVAUD-FUNEL, A. (2001). Purification and characterization of tyrosine decarboxylase of *Lactobacillus brevis*. *FEMS Microbiology Letters*. 195, 103-107. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2001.tb10505.x>
- MUNOZ-ESPARZA, N.C., LATORRE-MORATALLA, M.L., COMAS-BASTÉ, O., TORO-FUNES, N., VECIANA-NOGUÉS, M.T., VIDAL-CAROU, M.C. (2019). Polyamines in food. *Frontiers in Nutrition*. 6, 108. <https://doi.org/10.3389/fnut.2019.00108>
- MUROOKA, Y., DOI, N., HARADA, T. (1979). Distribution of membrane-bound monoamine oxidase in bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. 38(4), 565-569. <https://doi.org/10.1128/aem.38.4.565-569.1979>
- NAILA, A., FLINT, S., FLETCHER, G., BREMER, P., MEERDINK, G. (2010). Control of biogenic amines in food - existing and emerging approaches. *Journal of Food Science*. 75, 139-150. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2010.01774.x>
- NAŘÍZENÍ KOMISE (ES) č. 2073/2005 ze dne 15. listopadu 2005 o mikrobiologických kritériích pro potraviny. Dostupné [online] z: <https://eur-lex.europa.eu/legalcontent/CS/TXT/PDF/?uri=CELEX:02005R2073-20130701&from=ET>
- NGUYEN, D.T.-T., GUILLARME, D., HEINISCH, S., BARRIOULET, M.-P., ROCCA, J.-L., RUDAZ, S., VEUTHEY, J.-L. (2007). High throughput liquid chromatography with sub-2mm particles at high pressure and high temperature. *Journal of Chromatography A*. 1167, 76-84. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.08.032>
- NI, X., CHEN, J., DU, G., FANG, F. (2022). Food-grade expression of multicopper oxidase with improved capability in degrading biogenic amines. *Systems Microbiology and Biomanufacturing*. 2, 285-295. <https://doi.org/10.1007/s43393-021-00061-9>
- NOVELLA-RODRÍGUEZ, S., VECIANA-NOGUÉS, M.T., IZQUIERDO-PULIDO, M., VIDAL-CAROU, M.C. (2003). Distribution of biogenic amines and polyamines in cheese. *Journal of Food Science*. 68, 750-755. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2003.tb08236.x>

- OLMEDA, I., CASINO, P., COLLINS, R.E., SENDRA, R., CALLEJÓN, S., HUESA, J., SOARES, A.S., FERRER, S., PADRO, I. (2021). Structural analysis and biochemical properties of laccase enzymes from two *Pediococcus* species. *Microbial Biotechnology*. 14(3), 1026-1043. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13751>
- ÖNAL, A., (2007). A review: Current analytical methods for the determination of biogenic amines in foods. *Food Chemistry*. 103, 475-1486. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.08.028>
- ÖZOGUL, F., HAMED, I. (2018). The importance of lactic acid bacteria for the prevention of bacterial growth and their biogenic amines formation: A review, *Critical Reviews. Food Science and Nutrition*. 58(10), 1660-1670. <https://doi.org/10.1080/1040>
- PAPAGEORGIU, M., LAMBROPOULOU, D., MORRISON, C., KLODZINSKA, E., NAMIESNIK, J., PLOTKA-WASYLKA, J. (2018). Literature update of analytical methods for biogenic amines determination in food and beverages. *Trends in Analytical Chemistry*. 98, 128-142. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2017.11.001>
- PAPAVERGOU, E.J., SAVVAIDIS, I.N., AMBROSIADIS, I.A. (2012). Levels of biogenic amines in retail market fermented meat products. *Food Chemistry*. 135, 2750-2755. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.07.049>
- PASTORE, P., FAVARO, G., BADOCCO, D., TAPPARO, A., CAVALLI, S., SACCAN, G. (2005). Determination of biogenic amines in chocolate by ion chromatographic separation and pulsed integrated amperometric detection with implemented wave-form at Au disposable electrode. *Journal of Chromatography A*. 1098, 111-115. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2005.08.065>
- PESSIONE, E., MAZZOLI, R., GIUFFRIDA, M.G., LAMBERTI, C., GARCIA-MORUNO, E., BARELLO, C., CONTI, A., GIUNTA, C. (2005). A proteomic approach to studying biogenic amine producing lactic acid bacteria. *Proteomics*. 5, 687-698. <https://doi.org/10.1002/pmic.200401116>
- PIRCHER, A., BAUER, F., PAULSEN, P. (2007). Formation of cadaverine, histamine, putrescine and tyramine by bacteria isolated from meat, fermented sausages and cheeses. *European Food Research and Technology*. 226, 225-231. <https://doi.org/10.1007/s00217-006-0530-7>
- PIŠTĚKOVÁ, H., JANČOVÁ, P., BERČÍKOVÁ, L., BUŇKA, F., SOKOLOVÁ, I., ŠOPIK, T., MARŠÁLKOVÁ, K., PACHECO DE AMARALC, O.M.R., BUŇKOVÁ, L. (2020) Application of qPCR for multicopper oxidase gene

- (MCO) in biogenic amines degradation by *Lactobacillus casei*. *Food Microbiology*. 91, 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2020.103550>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.09.012>
- PREMONT, R.T., RAUL, R., GAINETDINOV, R.R., CARON, M.G. (2001). Following the trace of elusive amines. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 98, 9474-9475. <https://doi.org/10.1073/pnas.181356198>
- PRESTER, L.J., ORCT, T., MACAN, J., VUKUSIC, J., KIPCIC, D. (2010). Determination of biogenic amines and endotoxin in squid, musky octopus, Norway lobster, and mussel stored at room temperature. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology*. 61, 389-397. <https://doi.org/10.2478/10004-1254-61-2010-2049>
- PROESTOS, CH., LOUKATOS, P., KOMAITIS, M. (2008). Determination of biogenic amines in wines by HPLC with precolumn dansylation and fluorimetric detection. *Food Chemistry*. 106, 1218-1224. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.06.048>
- RABIE, M.A., SILIHA, H., EL-SAYDY, S., EL-BADAWY, A.A., MALCATA, F.X. (2010) Effects of γ -irradiation upon biogenic amine formation in Egyptian ripened sausages during storage. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 11(4), 661-665. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2010.08.007>
- RABIE, M.A., SILIHA, H., EL-SAYDY, S., EL-BADAWY, A.A., MALCATA, F.X. (2011) Reduced biogenic amine contents in sauerkraut via addition of selected lactic acid bacteria. *Food Chemistry*. 129, 1778-1782. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.05.106>
- RABIE, M.A., PERES, C., MALCATA, F.X. (2014). Evolution of amino acids and biogenic amines throughout storage in sausages made of horse, beef and turkey meats. *Meat Science*. 96, 82-87. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2013.05.042>
- RHEE, J.E., RHEE, J.H., RYU, P.Y., CHOI, S.H. (2002). Identification of the *cadBA* operon from *Vibrio vulnificus* and its influence on survival to acid stress. *FEMS Microbiology Letters*. 208, 245-251. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2002.tb11089.x>
- RIVA, S. (2006). Laccases: blue enzymes for green chemistry. *Trends Biotechnology*. 24(5), 219-226. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2006.03.006>

- ROSEIRO, C., SANTOS, C., SOL, M., SILVA, L., FERNANDES, I. (2006). Prevalence of biogenic amines during ripening of a traditional dry fermented pork sausage and its relation to the amount of sodium chloride added. *Meat Science*. 74, 557-563. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2006.03.030>
- RUIZ-CAPILLAS, C., HERRERO, A.M. (2019). Impact of Biogenic Amines on Food Quality and Safety. *Foods*. 8, 62. <https://doi.org/10.3390/foods8020062>
- SALMINEN, S., VON WRIGHT, A., OUWEHAND, (2004) A Lactic acid bacteria microbiological and functional aspects. 3rd ed., rev. and expanded. New York: Marcel Dekker, <https://doi.org/10.1201/9780824752033.ch1>
- SANTOS, M.H.S. (1996) Biogenic amines: their importance in foods. *International Journal of Food Microbiology*. 29(2-3), 213-231. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(95\)00032-1](https://doi.org/10.1016/0168-1605(95)00032-1)
- SARKADI, L.S. (2019). Amino acids and biogenic amines as food quality factors. *Pure and Applied Chemistry*. 91(2), 289-300. <https://doi.org/10.1515/pac-2018-0709>
- SEDAGHATI, M., MOORAKI, N. (2019). Biogenic amines in sea products. *Journal of Survey in Fisheries Sciences*. 6(1), 1-8. <https://doi.org/10.18331/SFS2019.6.1.3>
- 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(2), 104-110. [https://doi.org/10.1016/S1389-1723\(04\)70176-0](https://doi.org/10.1016/S1389-1723(04)70176-0)
- SHAKILA, R.J., VASUNDHARA, T.S., RAO, D.V. (1995). Effect of spices on the biogenic amine formation and other quality characteristics of Indian mackerel during refrigerated storage. *Asian Fisheries Science*. 9, 191-199. <https://doi.org/10.33997/j.afs.1996.9.3.006>
- SHALABY, A.R. (1996). Significance of biogenic amines to food safety and human health. *Food Research International*. 29(7), 675-690. [https://doi.org/10.1016/S0963-9969\(96\)00066-X](https://doi.org/10.1016/S0963-9969(96)00066-X)
- SHU, G., YANG, H., TAO, Q., HE, CH. (2013). Effect of Ascorbic Acid and Cysteine Hydrochloride on Growth of *Bifidobacterium bifidum*. *Advance Journal of Food Science and Technology*. 5(6), 678-681. <http://dx.doi.org/10.19026/ajfst.5.3148>
- SCHELP, E., WORLEY, S., MONZINGO, A.F., ERNST, S., ROBERTUS, J.D. (2001). pH-induced structural changes regulate histidine decarboxylase activity in *Lactobacillus* 30a. *Journal of Molecular biology*. 306, 727-732. <http://dx.doi.org/10.1006/jmbi.2000.4430>

- SCHILLING, B., LERCH, K. (1995) Cloning, sequencing and heterologous expression of the monoamine oxidase gene from *Aspergillus niger*. *Molecular and General Genetics*. 247, 430-438. <https://doi.org/10.1007/BF00293144>
- SCHIRMER, B.C., HEIBERG, R., EIE, T., MORETRO, T., MAUGESTEN, T., CARLEHOG, M., LANGSRUD, S. (2009). A novel packaging method with a dissolving CO₂ headspace combined with organic acids prolongs the shelf life of fresh salmon. *International Journal of Food Microbiology*. 133(1–2), 154-160. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.05.015>
- SMĚLÁ, D., PECHOVÁ, P., KOMPRDA, T., KLEJDUS, B., KUBÁŇ, V. (2004). Chromatografické stanovení biogenních aminů v trvanlivých salámech během fermentace a skladování. *Chemické listy*. 98, 432-437.
- SOKOLOVÁ, I. (2018). Možnosti snížení obsahu biogenních aminů bakteriemi izolovanými z potravin. Zlín, 2019. Diplomová práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta technologická, Ústav technologie potravin.
- SPANO, G., RUSSO, P., LONVAUD-FUNEL, A., LUCAS, P., ALEXANDRE, H., GRANDVALET, C., COTON, E., COTON, M., BARNAVONS, L., BACH, B., RATTRAY, F., BUNTE, A., MAGNI, C., LADERO, V., ALVAREZ, M., FERNÁNDEZ, M., LOPEZ, P., DE PALENCIA, P.F., CORBI, A., TRIP, H., LOLKEMA, J.S. (2010). Biogenic amines in fermented foods. *European Journal of Clinical Nutrition*. 64, 95-100. <https://doi.org/10.1038/ejcn.2010.218>
- STRATTON, J.E., HUTKINS, W.R., TAYLOR, S.L. (1991). Biogenic amines in cheese and other fermented foods. A review. *Journal of Food Protection*. 54, 460-470. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-54.6.460>
- SUMNER, S.S., ROCHE, F., TAYLOR, S.L. (1990). Factors controlling histamine production in swiss cheese inoculated with *Lactobacillus buchneri*. *Journal of Dairy Science*. 73, 3050-3058. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(90\)78992-8](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(90)78992-8)
- TAYLOR, S.L. (1986). Histamine food poisoning: Toxicology and clinical aspects. *Critical Reviews. Toxicology*. 17, 91-128. <https://doi.org/10.3109/10408448609023767>
- TEPKASIKUL, P., SANTIYANONT, P., BOONCHAROEN, A., ABHISINGHA, M., MHUANTONG, W., CHANTARASAKHA, K., PITAKSUTHEEPONG, CH., VISESSANGUAN, W., TEPAAMORNDECH, S. (2022). The functional starter and its genomic insight for histamine degradation in fish sauce. *Food Microbiology*. 104, 103988. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2022.103988>

- THANGAM, E.B., JEMIMA, E.A., SINGH, H., BAIG, M.S., KHAN, M., MATHIAS, C.B., CHURCH, M.K., SALUJA, R. (2018). The Role of Histamine and Histamine Receptors in Mast Cell-Mediated Allergy and Inflammation: The Hunt for New Therapeutic Targets. *Frontiers in Immunology*. 9, 1-9. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01873>
- THURSTON, C.F. (1994). The structure and function of fungal laccases. *Microbiology*. 140, 19-26. <https://doi.org/10.1099/13500872-140-1-19>
- TITTARELLI, F., PERPETUINI, G., DI GIANVITO, P., TOFALO, R. (2019). Biogenic amines producing and degrading bacteria: A snapshot from raw ewes' cheese. *LWT- Food Science and Technology*. 101, 1-9. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2018.11.030>
- TORO-FUNES, N., BOSCH-FUSTÉ, J., VECIANA-NOGUÉS, M.T., IZQUIERDO-PULIDO, M., VIDAL-CAROU, M.C. (2013). *In vitro* antioxidant activity of dietary polyamines. *Food Research International*. 51, 141-147. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.11.036>
- VALSAMAKI, K., MICHAELIDOU, A., POLYCHRONIADOU, A. (2000). Biogenic amine production in Feta cheese. *Food Chemistry*. 71, 259-266. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(00\)00168-0](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(00)00168-0)
- VIDAL-CAROU, M.C., LAHOZ-PORTOLES, F., BOVER-CID, S., MARINE-FONT, A. (2003). Ion-pair high-performance liquid chromatographic determination of biogenic amines and polyamines in wine and other alcoholic beverages. *Journal of Chromatography A*. 98, 235-241. [https://doi.org/10.1016/s0021-9673\(03\)00610-1](https://doi.org/10.1016/s0021-9673(03)00610-1)
- VISCIANO, P., SCHIRONE, M., PAPARELLA, A. (2020). An Overview of Histamine and Other Biogenic Amines in Fish and Fish Products. *Foods*. 9, 1795. <https://doi.org/10.3390/foods9121795>
- 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. <https://doi.org/10.3390/foods11203306>
- WHO (1994). Safety and nutritional adequacy of irradiated food. Geneva: World Health Organization.
- WÓJCIK, W., LUKASIEWICZ, M., PUPPEL, K., (2021) Biogenic amines: formation, action and toxicity – a review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 101, 2634-2640. <https://doi.org/10.1002/jsfa.10928>
- XU, Y.S., XIA, W.S., YANG, F., KIM, J.M., NIE, X.H. (2010). Effect of fermentation temperature on the microbial and physicochemical properties

- of silver carp sausages inoculated with *Pediococcus pentosaceus*. *Food Chemistry*. 118(3), 512-518. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.05.008>
- YAMADA, H., ADACHI, O., OGATA, K. (1965a) Amine oxidases of microorganisms. II. Purification and crystallization of amine oxidase of *Aspergillus niger*. *Agricultural and Biological Chemistry*. 29(7), 649-654. <https://doi.org/10.1080/00021369.1965.10858442>
- YAMADA, H., TANAKA, A., OGATA, K. (1965b). Putrescine oxidase of *Micrococcus rubens*. *Agricultural and Biological Chemistry*. 29, 260-261. <https://doi.org/10.1271/bbb1961.29.260>
- YAMADA, H., UWAJIMA, T., KUMAGAI, H., WATANABE, M., OGATA, K. (1967). Crystalline tyramine oxidase from *Sarcina lutea*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 27(3), 350-355. [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(67\)80105-0](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(67)80105-0)
- ZAMAN, M.Z., ABU BAKAR, F., SELAMAT, J., BAKAR, J. (2010). Occurrence of biogenic amines and amines degrading bacteria in fish sauce. *Czech Journal of Food Sciences*. 28, 440-449. <https://doi.org/10.17221/312/2009-CJFS>
- ZAMAN, M.Z., ABU BAKAR, F., 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. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.11.031>

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

AA	akrylamid
ABTS	2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonová kyselina)
AD	Aldehyddehydrogenáza
AO	Aminooxidáza
APS	Peroxydisíran amonný
BA	Biogenní aminy
BAI	Biogenic amine index
BIS	<i>N, N'</i> -methylenbisakrylamid
BSA	hovězí sérový albumin
CCDM	Culture Collection of Dairy Microorganisms
CZE	Kapilární zónová elektroforéza
DAO	Diaminooxidáza
DMP	dimethoxyfenol
EFSA	Evropský úřad pro bezpečnost potravin
FAD	Flavinadenindinukleotid
FDA	Úřadu pro kontrolu potravin a léčiv
GC	Plynová chromatografie
GRAS	Generally recognized as safe
hdc	Geny histidindekarboxylázy
HNMT	Histamin- <i>N</i> -methyltransferáza
HPLC/DAD	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie s detektorem diodového pole
IEC	Iontoměničová chromatografie
LAB	Bakterie mléčného kvašení
MAO	Monoaminooxidázy

MOC	Multicopperoxidáza
MRS	De Man, Rogosa a Sharpe agar/médium
OPA	O-ftalaldehyd
PAO	Polyaminoxidázy
PMSF	Fenylmethylsulfonylfluorid
QPS	Qualified Presumption of Safety lists
SMO	Sperminoxidáza
SSAT	Spermidin/spermin N1-acetyltransferáza
tdcA	Geny dekarboxylázy
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -tetramethylethylendiamin
TLC	Chromatografie na tenké vrstvě
UHT	Ultra-high temperature processing
UPLC	Ultra vysokoúčinná kapalinová chromatografie
WHO	Světová zdravotnická organizace

SEZNAM OBRÁZKŮ A TABULEK

Seznam obrázků

- Obr. 2.1: Struktura nejběžnějších biogenních aminů v potravinách a jejich a prekurzorů produkované mikroorganismy (upraveno podle Li a Lu, 2020).....11
- Obr. 1.2: Schéma dekarboxylace aminokyseliny enzymem dekarboxylázou za vzniku biogenního aminu a uvolnění oxidu uhličitého (upraveno podle Comas-Basté et al., 2020).....12
- Obr. 1.3: Potencionálně nejvíce toxické biogenní aminy (histamin, tyramin, putrescin a kadaverin) a jejich negativní účinky na lidský organismus (upraveno podle Alvarez a Moreno-Arribas, 2014).....16
- Obr. 1.4: Tvorba biogenních aminů v potravinách v důsledku mikrobiální enzymatické aktivity (upraveno podle Benkerroum, 2016).....18
- Obr. 1.5: Reakce derivatizačního činidla dansylchloridu s biogenním aminem za vzniku stabilního derivátu (upraveno podle Mantoanelli et al., 2020).....24
- Obr. 1.6: Faktory ovlivňující tvorbu biogenních aminů v potravinách (upraveno podle Ruiz-Capillas a Herrero, 2019).....25
- Obr. 1.7: Předpokládaný vztah mezi enzymy, které degradují aminy, biogenními aminy (BA) a faktory ovlivňující jejich tvorbu ve fermentovaných potravinách a nápojích (upraveno podle Li a Lu, 2020).....32
- Obr. 3.1: Schématické shrnutí metodického postupu při studiu vlivu vybraných faktorů na redukční schopnosti bakterie *Lacticaseibacillus casei* CCDM 198 v kultivačním MRS médiu.....44
- Obr. 3.2: Schématické shrnutí metodického postupu při studiu vlivu vybraných faktorů na redukční schopnosti bakterie *Lacticaseibacillus casei* CCDM 198 v mléce.....46
- Obr. 4.1: Vývoj relativního obsahu histaminu (rel. %) při degradaci bakterií *Lacticaseibacillus casei* CCDM 198 v úplném MRS bujónu s počáteční koncentrací histaminu $0,2 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ v závislosti na době kultivace (h) pro inkubační teploty $11 \text{ }^\circ\text{C}$, $23 \text{ }^\circ\text{C}$ a $30 \text{ }^\circ\text{C}$; počáteční relativní obsah histaminu v čase nula byl vždy 100 %. Inkubace byla prováděna při $\text{pH} = 5,4$ (části A), $\text{pH} = 6,2$ (části B) a $\text{pH} = 7,0$ (části C). Výsledky jsou prezentovány pomocí průměrů a standardních odchylek (sloupce; $n = 6$)..... 52
- Obr. 4.2: Vývoj relativního obsahu histaminu (rel. %) při degradaci bakterií *Lacticaseibacillus casei* CCDM 198 v úplném MRS bujónu s počáteční koncentrací histaminu $0,4 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ v závislosti na době kultivace (h) pro inkubační teploty $11 \text{ }^\circ\text{C}$, $23 \text{ }^\circ\text{C}$ a $30 \text{ }^\circ\text{C}$; počáteční relativní obsah histaminu v čase nula byl vždy 100 %. Inkubace byla prováděna při $\text{pH} = 5,4$ (části A), $\text{pH} = 6,2$ (části B) a $\text{pH} = 7,0$ (části C). Výsledky jsou prezentovány pomocí průměrů a standardních odchylek (sloupce; $n = 6$).....53
- Obr. 4.3: Vývoj relativního obsahu histaminu (rel. %) při degradaci bakterií *Lacticaseibacillus casei* CCDM 198 v neúplném MRS bujónu s počáteční koncentrací histaminu $0,2 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ v závislosti na době kultivace (h) pro inkubační teploty $11 \text{ }^\circ\text{C}$, $23 \text{ }^\circ\text{C}$ a $30 \text{ }^\circ\text{C}$; počáteční relativní obsah

histaminu v čase nula byl vždy 100 %. Inkubace byla prováděna při pH = 5,4 (části A), pH = 6,2 (části B) a pH = 7,0 (části C). Výsledky jsou prezentovány pomocí průměrů a standardních odchylek (sloupce; n = 6)...54

Obr. 4.4: Vývoj relativního obsahu histaminu (rel. %) při degradaci bakterií *Lacticaseibacillus casei* CCDM 198 v neúplném MRS bujónu s počáteční koncentrací histaminu $0,4 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ v závislosti na době kultivace (h) pro inkubační teploty 11 °C, 23 °C a 30 °C; počáteční relativní obsah histaminu v čase nula byl vždy 100 %. Inkubace byla prováděna při pH = 5,4 (části A), pH = 6,2 (části B) a pH = 7,0 (části C). Výsledky jsou prezentovány pomocí průměrů a standardních odchylek (sloupce; n = 6).....55

Obr. 4.5: Vývoj relativního obsahu tyraminu (rel. %) při degradaci bakterií *Lacticaseibacillus casei* CCDM 198 v úplném MRS bujónu s počáteční koncentrací tyraminu $0,2 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ v závislosti na době kultivace (h) pro inkubační teploty 11 °C, 23 °C a 30 °C; počáteční relativní obsah histaminu v čase nula byl vždy 100 %. Inkubace byla prováděna při pH = 5,4 (části A), pH = 6,2 (části B) a pH = 7,0 (části C). Výsledky jsou prezentovány pomocí průměrů a standardních odchylek (sloupce; n = 6).....57

Obr. 4.6: Vývoj relativního obsahu tyraminu (rel. %) při degradaci bakterií *Lacticaseibacillus casei* CCDM 198 v úplném MRS bujónu s počáteční koncentrací tyraminu $0,4 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ v závislosti na době kultivace (h) pro inkubační teploty 11 °C, 23 °C a 30 °C; počáteční relativní obsah histaminu v čase nula byl vždy 100 %. Inkubace byla prováděna při pH = 5,4 (části A), pH = 6,2 (části B) a pH = 7,0 (části C). Výsledky jsou prezentovány pomocí průměrů a standardních odchylek (sloupce; n = 6).....58

Obr. 4.7: Vývoj relativního obsahu tyraminu (rel. %) při degradaci bakterií *Lacticaseibacillus casei* CCDM 198 v neúplném MRS bujónu s počáteční koncentrací tyraminu $0,2 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ v závislosti na době kultivace (h) pro inkubační teploty 11 °C, 23 °C a 30 °C; počáteční relativní obsah tyraminu v čase nula byl vždy 100 %. Inkubace byla prováděna při pH = 5,4 (části A), pH = 6,2 (části B) a pH = 7,0 (části C). Výsledky jsou prezentovány pomocí průměrů a standardních odchylek (sloupce; n = 6).....59

Obr. 4.8: Vývoj relativního obsahu tyraminu (rel. %) při degradaci bakterií *Lacticaseibacillus casei* CCDM 198 v neúplném MRS bujónu s počáteční koncentrací tyraminu $0,4 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ v závislosti na době kultivace (h) pro inkubační teploty 11 °C, 23 °C a 30 °C; počáteční relativní obsah tyraminu v čase nula byl vždy 100 %. Inkubace byla prováděna při pH = 5,4 (části A), pH = 6,2 (části B) a pH = 7,0 (části C). Výsledky jsou prezentovány pomocí průměrů a standardních odchylek (sloupce; n = 6).....60

Obr. 4.9: Vývoj relativního obsahu putrescinu (rel. %) při degradaci bakterií *Lacticaseibacillus casei* CCDM 198 v úplném MRS bujónu s počáteční koncentrací putrescinu $0,2 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ v závislosti na době kultivace (h) pro inkubační teploty 11 °C, 23 °C a 30 °C; počáteční relativní obsah putrescinu v čase nula byl vždy 100 %. Inkubace byla prováděna při pH = 5,4 (části A), pH = 6,2 (části B) a pH = 7,0 (části C). Výsledky jsou prezentovány pomocí průměrů a standardních odchylek (sloupce; n = 6)...62

- Obr. 4.10: Vývoj relativního obsahu putrescinu (rel. %) při degradaci bakterií *Lacticaseibacillus casei* CCDM 198 v úplném MRS bujónu s počáteční koncentrací putrescinu $0,4 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ v závislosti na době kultivace (h) pro inkubační teploty $11 \text{ }^\circ\text{C}$, $23 \text{ }^\circ\text{C}$ a $30 \text{ }^\circ\text{C}$; počáteční relativní obsah putrescinu v čase nula byl vždy 100 %. Inkubace byla prováděna při pH = 5,4 (části A), pH = 6,2 (části B) a pH = 7,0 (části C). Výsledky jsou prezentovány pomocí průměrů a standardních odchylek (sloupce; n = 6)...63
- Obr. 4.11: Vývoj relativního obsahu putrescinu (rel. %) při degradaci bakterií *Lacticaseibacillus casei* CCDM 198 v neúplném MRS bujónu s počáteční koncentrací putrescinu $0,2 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ v závislosti na době kultivace (h) pro inkubační teploty $11 \text{ }^\circ\text{C}$, $23 \text{ }^\circ\text{C}$ a $30 \text{ }^\circ\text{C}$; počáteční relativní obsah putrescinu v čase nula byl vždy 100 %. Inkubace byla prováděna při pH = 5,4 (části A), pH = 6,2 (části B) a pH = 7,0 (části C). Výsledky jsou prezentovány pomocí průměrů a standardních odchylek (sloupce; n = 6)...64
- Obr. 4.12: Vývoj relativního obsahu putrescinu (rel. %) při degradaci bakterií *Lacticaseibacillus casei* CCDM 198 v neúplném MRS bujónu s počáteční koncentrací putrescinu $0,4 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ v závislosti na době kultivace (h) pro inkubační teploty $11 \text{ }^\circ\text{C}$, $23 \text{ }^\circ\text{C}$ a $30 \text{ }^\circ\text{C}$; počáteční relativní obsah putrescinu v čase nula byl vždy 100 %. Inkubace byla prováděna při pH = 5,4 (části A), pH = 6,2 (části B) a pH = 7,0 (části C). Výsledky jsou prezentovány pomocí průměrů a standardních odchylek (sloupce; n = 6)...65
- Obr. 4.13: Vývoj relativního obsahu kadaverinu (rel. %) při degradaci bakterií *Lacticaseibacillus casei* CCDM 198 v úplném MRS bujónu s počáteční koncentrací kadaverinu $0,2 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ v závislosti na době kultivace (h) pro inkubační teploty $11 \text{ }^\circ\text{C}$, $23 \text{ }^\circ\text{C}$ a $30 \text{ }^\circ\text{C}$; počáteční relativní obsah kadaverinu v čase nula byl vždy 100 %. Inkubace byla prováděna při pH = 5,4 (části A), pH = 6,2 (části B) a pH = 7,0 (části C). Výsledky jsou prezentovány pomocí průměrů a standardních odchylek (sloupce; n = 6).....67
- Obr. 4.14: Vývoj relativního obsahu kadaverinu (rel. %) při degradaci bakterií *Lacticaseibacillus casei* CCDM 198 v úplném MRS bujónu s počáteční koncentrací kadaverinu $0,4 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ v závislosti na době kultivace (h) pro inkubační teploty $11 \text{ }^\circ\text{C}$, $23 \text{ }^\circ\text{C}$ a $30 \text{ }^\circ\text{C}$; počáteční relativní obsah kadaverinu v čase nula byl vždy 100 %. Inkubace byla prováděna při pH = 5,4 (části A), pH = 6,2 (části B) a pH = 7,0 (části C). Výsledky jsou prezentovány pomocí průměrů a standardních odchylek (sloupce; n = 6)...68
- Obr. 4.15: Vývoj relativního obsahu kadaverinu (rel. %) při degradaci bakterií *Lacticaseibacillus casei* CCDM 198 v neúplném MRS bujónu s počáteční koncentrací kadaverinu $0,2 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ v závislosti na době kultivace (h) pro inkubační teploty 11°C , $23 \text{ }^\circ\text{C}$ a $30 \text{ }^\circ\text{C}$; počáteční relativní obsah kadaverinu v čase nula byl vždy 100 %. Inkubace byla prováděna při pH = 5,4 (části A), pH = 6,2 (části B) a pH = 7,0 (části C). Výsledky jsou prezentovány pomocí průměrů a standardních odchylek (sloupce; n = 6)...69
- Obr. 4.16: Vývoj relativního obsahu kadaverinu (rel. %) při degradaci bakterií *Lacticaseibacillus casei* CCDM 198 v neúplném MRS bujónu s počáteční

koncentrací kadaverinu $0,4 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ v závislosti na době kultivace (h) pro inkubační teploty 11°C , 23°C a 30°C ; počáteční relativní obsah kadaverinu v čase nula byl vždy 100 %. Inkubace byla prováděna při $\text{pH} = 5,4$ (části A), $\text{pH} = 6,2$ (části B) a $\text{pH} = 7,0$ (části C). Výsledky jsou prezentovány pomocí průměrů a standardních odchylek (sloupce; $n = 6$)...70

Obr. 4.17: Vývoj relativního obsahu fenylethylaminu (rel. %) při degradaci bakterií *Lacticaseibacillus casei* CCDM 198 v úplném MRS bujónu s počáteční koncentrací fenylethylaminu $0,2 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ v závislosti na době kultivace (h) pro inkubační teploty 11°C , 23°C a 30°C ; počáteční relativní obsah fenylethylaminu v čase nula byl vždy 100 %. Inkubace byla prováděna při $\text{pH} = 5,4$ (části A), $\text{pH} = 6,2$ (části B) a $\text{pH} = 7,0$ (části C). Výsledky jsou prezentovány pomocí průměrů a standardních odchylek (sloupce; $n = 6$)...72

Obr. 4.18: Vývoj relativního obsahu fenylethylaminu (rel. %) při degradaci bakterií *Lacticaseibacillus casei* CCDM 198 v úplném MRS bujónu s počáteční koncentrací fenylethylaminu $0,4 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ v závislosti na době kultivace (h) pro inkubační teploty 11°C , 23°C a 30°C ; počáteční relativní obsah fenylethylaminu v čase nula byl vždy 100 %. Inkubace byla prováděna při $\text{pH} = 5,4$ (části A), $\text{pH} = 6,2$ (části B) a $\text{pH} = 7,0$ (části C). Výsledky jsou prezentovány pomocí průměrů a standardních odchylek (sloupce; $n = 6$)...73

Obr. 4.19: Vývoj relativního obsahu fenylethylaminu (rel. %) při degradaci bakterií *Lacticaseibacillus casei* CCDM 198 v neúplném MRS bujónu s počáteční koncentrací fenylaethylaminu $0,2 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ v závislosti na době kultivace (h) pro inkubační teploty 11°C , 23°C a 30°C ; počáteční relativní obsah fenylethylaminu v čase nula byl vždy 100 %. Inkubace byla prováděna při $\text{pH} = 5,4$ (části A), $\text{pH} = 6,2$ (části B) a $\text{pH} = 7,0$ (části C). Výsledky jsou prezentovány pomocí průměrů a standardních odchylek (sloupce; $n = 6$)...74

Obr. 4.20: Vývoj relativního obsahu fenylethylaminu (rel. %) při degradaci bakterií *Lacticaseibacillus casei* CCDM 198 v neúplném MRS bujónu s počáteční koncentrací fenylaethylaminu $0,4 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ v závislosti na době kultivace (h) pro inkubační teploty 11°C , 23°C a 30°C ; počáteční relativní obsah fenylethylaminu v čase nula byl vždy 100 %. Inkubace byla prováděna při $\text{pH} = 5,4$ (části A), $\text{pH} = 6,2$ (části B) a $\text{pH} = 7,0$ (části C). Výsledky jsou prezentovány pomocí průměrů a standardních odchylek (sloupce; $n = 6$)...75

Obr. 4.21: Vývoj relativního obsahu histaminu (rel. %) při degradaci bakterií *Lacticaseibacillus casei* CCDM 198 v mléce. Kultivace probíhaly za teploty 11°C , 23°C a 30°C v mléce o $\text{pH} 5,4$ (část A); $6,2$ (část B) a $7,0$ (část C). Počáteční relativní obsah histaminu v čase nula byl vždy 100 %. Výsledky jsou prezentovány pomocí průměrů a standardních odchylek (sloupce; $n = 6$).....78

Obr. 4.22: Vývoj relativního obsahu tyraminu (rel. %) při degradaci bakterií *Lacticaseibacillus casei* CCDM 198 v mléce. Kultivace probíhaly za teploty 11°C , 23°C a 30°C v mléce o $\text{pH} 5,4$ (část A); $6,2$ (část B) a $7,0$ (část C). Počáteční relativní obsah tyraminu v čase nula byl vždy 100 %. Výsledky jsou

prezentovány pomocí průměrů a standardních odchylek (sloupce; n = 6).....	79
Obr. 4.23: Vývoj relativního obsahu putrescinu (rel. %) při degradaci bakterií <i>Lacticaseibacillus casei</i> CCDM 198 v mléce. Kultivace probíhaly za teploty 11 °C, 23 °C a 30 °C v mléce o pH 5,4 (část A); 6,2 (část B) a 7,0 (část C). Počáteční relativní obsah putrescinu v čase nula byl vždy 100 %. Výsledky jsou prezentovány pomocí průměrů a standardních odchylek (sloupce; n = 6).....	81
Obr. 4.24 Vývoj relativního obsahu kadaverinu (rel. %) při degradaci bakterií <i>Lacticaseibacillus casei</i> CCDM 198 v mléce. Kultivace probíhaly za teploty 11 °C, 23 °C a 30 °C v mléce o pH 5,4 (část A); 6,2 (část B) a 7,0 (část C). Počáteční relativní obsah kadaverinu v čase nula byl vždy 100 %. Výsledky jsou prezentovány pomocí průměrů a standardních odchylek (sloupce; n = 6).....	82
Obr. 4.25 Vývoj relativního obsahu fenylethylaminu (rel. %) při degradaci bakterií <i>Lacticaseibacillus casei</i> CCDM 198 v mléce. Kultivace probíhaly za teploty 11 °C, 23 °C a 30 °C v mléce o pH 5,4 (část A); 6,2 (část B) a 7,0 (část C). Počáteční relativní obsah fenylethylaminu v čase nula byl vždy 100 %. Výsledky jsou prezentovány pomocí průměrů a standardních odchylek (sloupce; n = 6).....	83
Obr. 4.26: Detekce přítomnosti enzymu multicopperoxidázy (MCO) a jeho enzymatické aktivity u bakteriálního kmene <i>Lacticaseibacillus casei</i> CCDM 198 v čase kultivace 0, 24,48 a 72 hodin. Část A popisuje přítomnost enzymu MCO v polyakrylamidovém gelu po elektroforéze za nativních podmínek vůči substrátu 2,6-dimethoxyfenolu (DMP). Pozitivní reakce je prokázána oranžově žlutým zabarvením. Část B graficky znázorňuje spektrofotometrickou detekci změny % relativní aktivity enzymu MCO v čase při oxidaci substrátu ABTS. Absorbance byla měřena při vlnové délce 420 nm. Aktivita enzymu v průběhu času je vyjádřena jako procentuální relativní aktivita vztažena k maximální naměřené aktivitě 100 % (% relativní aktivity). Výsledky byly vyjádřeny pomocí průměrů a standardních odchylek.....	85

Seznam tabulek

Tabulka 2.1 Množství MRS broth pro přípravu kultivačního média.....	36
Tabulka 2.2 Množství jednotlivých biogenních aminů pro přípravu 1 l roztoku 1x koncentrovaný a 20x koncentrovaný.....	37
Tabulka 3.1 Časy odběrů vzorků pro sledované teploty.....	41
Tabulka 3.2 Popis jednotlivých sad s kombinacemi zkoumaných faktorů v MRS médiu.....	41
Tabulka 3.3 Gradientový eluční program využívaný při analýze biogenních aminů metodou HPLC.....	43

Tabulka 3.4 Sady pro studium degradace BA v mléce.....	45
Tabulka 3.5 Složení a objemy jednotlivých roztoků pro přípravu gelu (4% zaostřovacího a 8% dělicího). Objemy roztoků jsou uvedeny v ml.....	48

CURRICULUM VITAE

OSOBNÍ ÚDAJE

Jméno a příjmení: Lucie Klementová
Rozená: Berčíková
Email: klementova@utb.cz

VZDĚLÁNÍ

2018 – dosud **Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně,
Fakulta technologická**
Doktorské studium;
obor: Technologie potravin

2016 – 2018 **Univerzita Palackého v Olomouci,
Fakulta přírodovědecká**
Navazující magisterské studium;
obor: Biochemie – titul Mgr.

2013 – 2016 **Univerzita Palackého v Olomouci,
Fakulta přírodovědecká**
Bakalářské studium;
obor: Biochemie – titul Bc.

2005 – 2013 **Gymnázium Kroměříž**
Všeobecné osmileté studium

PRAXE

- 2022 – 2023 **Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta technologická**
Ústav inženýrství ochrany životního prostředí
Pozice: akademický pracovník
- 2021 – 2022 **Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta technologická**
Ústav inženýrství ochrany životního prostředí
Pozice: lektor – externista
- 9/2021 **Slovak University of Agriculture in Nitra**
Faculty of Horticulture and Landscape Engineering
Pozice: pracovní stáž

ÚČAST NA GRANTOVÝCH PROJEKTECH

- 2021 Projekt Interní grantové agentury UTB ve Zlíně,
IGA/FT/2021/009 – Fyzikálně-chemické a biochemické
metody redukce nežádoucích látek v oblasti ochrany životního
prostředí a potravinářství. (spoluřešitel)
- 2020 – 2021 TAČR ZÉTA TJ04000226 – Kombinovaný postup eliminace
chloranilidových pesticidů z kontaminovaných vod a zemin
- 2020 Projekt Interní grantové agentury UTB ve Zlíně,
IGA/FT/2020/009 – Nežádoucí látky v potravinách
a v životním prostředí a možnosti jejich snížení. (řešitel)
- 2019 – 2020 NAZV QK1710156 – Nové přístupy a metody analýzy pro
zajištění kvality, bezpečnosti a zdravotní nezávadnosti sýrů,
optimalizace jejich výroby a zefektivnění procesů hygieny
a sanitace při současném snížení zátěže životního prostředí
odpadními vodami.
- 2019 Projekt Interní grantové agentury UTB ve Zlíně,
IGA/FT/2019/011 – Nežádoucí látky v potravinách
a v životním prostředí a možnosti jejich snížení. (spoluřešitel)

PŘEHLED PUBLIKAČNÍ ČINNOSTI

KLEMENTOVÁ L., BUTOR, I., JANČOVÁ, P., PUREVDORJ, K., BÁBKOVÁ, D., BUŇKA, F., BUŇKOVÁ, L. (2024). Reduction of histamine, putrescine and cadaverine by the bacteria *Lacticaseibacillus casei* depending on selected factors in the real condition of the dairy product. *Food Microbiology*, 117, 104391. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2023.104391>

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. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11041091>

PIŠTĚKOVÁ, H., JANČOVÁ, P., BUŇKOVÁ, L., BERČÍKOVÁ, L., ŠOPIK, T., MARŠÁLKOVÁ, K., BUŇKA, F. (2021). Detection and relative quantification of amine oxidase gene (*yobN*) in *Bacillus subtilis*: application of real-time quanti-tative PCR. *Journal of Food Science and Technology*, <https://doi.org/10.1007/s13197-021-05090-9>

PIŠTĚKOVÁ, H., JANČOVÁ, P., BERČÍKOVÁ, L., BUŇKA, F., SOKOLOVÁ, I., ŠOPIK, T., MARŠÁLKOVÁ, K., AMARAL, O., BUŇKOVÁ, L. (2020). Application of qPCR for multicopper oxidase gene (*MCO*) in biogenic amines degradation by *Lactobacillus casei*. *Food Microbiology*, 91, 103550. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2020.103550>

PLEVA, P., BERČÍKOVÁ, L., ČECHOVÁ, E., BARTOŠEK, P., BUŇKOVÁ, L. (2019). The monitoring of biogenic amines in the raw food. *Potravinarstvo Slovak Journal of Food Sciences*, 13(1), 482-489. <https://doi.org/10.5219/1055>

JEDELSKÁ, T., ŠMOTKOVÁ KRAICZOVÁ, V., BERČÍKOVÁ, L., ČINČALOVÁ, L., LUHOVÁ, L., PETŘIVALSKÝ, M. (2019). Tomato Root Growth Inhibition by Salinity and Cadmium is Mediated by S-Nitrosative Modifications of ROS Metabolic Enzymes Controlled by S-Nitrosoglutathione Reductase. *Biomolecules*. 9(9), 393. <https://doi.org/10.3390/biom9090393>

KONFERENČNÍ PŘÍSPĚVKY

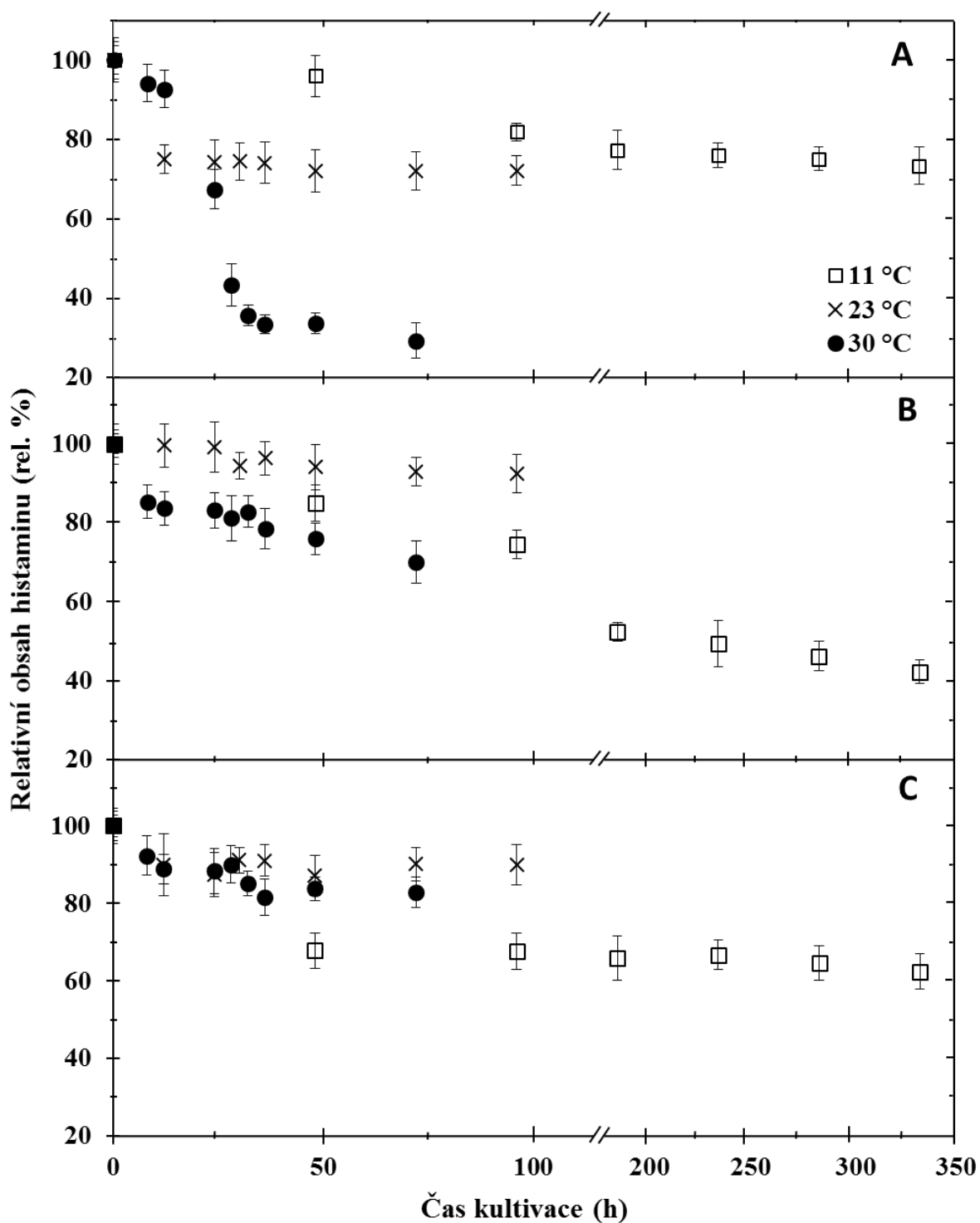
KLEMENTOVÁ, L., BENEŠ, Š., BÁBKOVÁ, D., PUREVDORJ, K., BUŇKOVÁ, L. Studium redukce biogenních aminů bakterií *Lacticaseibacillus casei*. Sborník transakt - 29. kongres Československé společnosti mikrobiologické s mezinárodní účastí, 15. -17. 9. 2022, Brno, ISBN 978-80-88379-18-8, Poster, 2022

BUŇKOVÁ, L., PUREVDORJ, K., KLEMENTOVÁ, L., RIEMEL, J., BÁBKOVÁ, D., BUŇKA, F. Dekarboxylázová aktivita mikroorganismů v potravinách. Sborník transakt - 29. kongres Československé společnosti mikrobiologické s mezinárodní účastí, 15. -17. 9. 2022, Brno, ISBN 978-80-88379-18-8, Poster, 2022

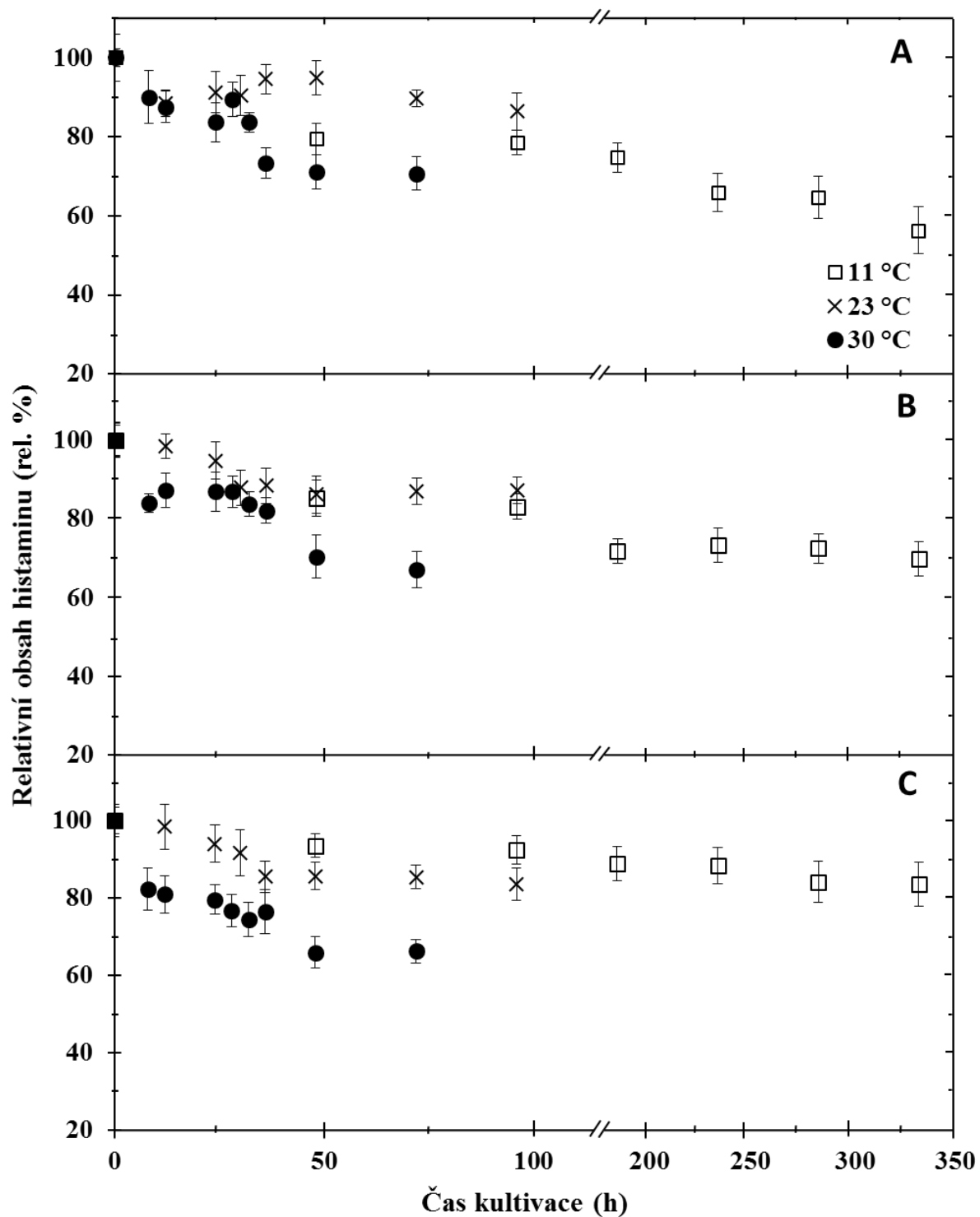
PUREVDORJ, K., BUŇKOVÁ, L., KLEMENTOVÁ, L., DLABAJOVÁ A., BUŇKA, F. Vliv vybraných protektivních kultur a jejich metabolitů s antimikrobiálními účinky na produkci tyraminu u kmenů izolovaných z fermentovaných potravin. Sborník transakt - 29. kongres Československé společnosti mikrobiologické s mezinárodní účastí, 15. -17. 9. 2022, Brno, ISBN 978-80-88379-18-8, Poster, 2022

BUŇKOVÁ, L., PUREVDORJ, K., BENEŠ, Š., BERČÍKOVÁ, L., DLABAJOVÁ, A., PLEVA, P., BUŇKA, F. Potravinářsky významné mikroorganismy a jejich schopnost degradace biogenních aminů. In: Sborník 28. kongres Československej spoločnosti mikrobiologickej, 18.-21.9.2019, Tatranské Matliare, Slovensko, 93

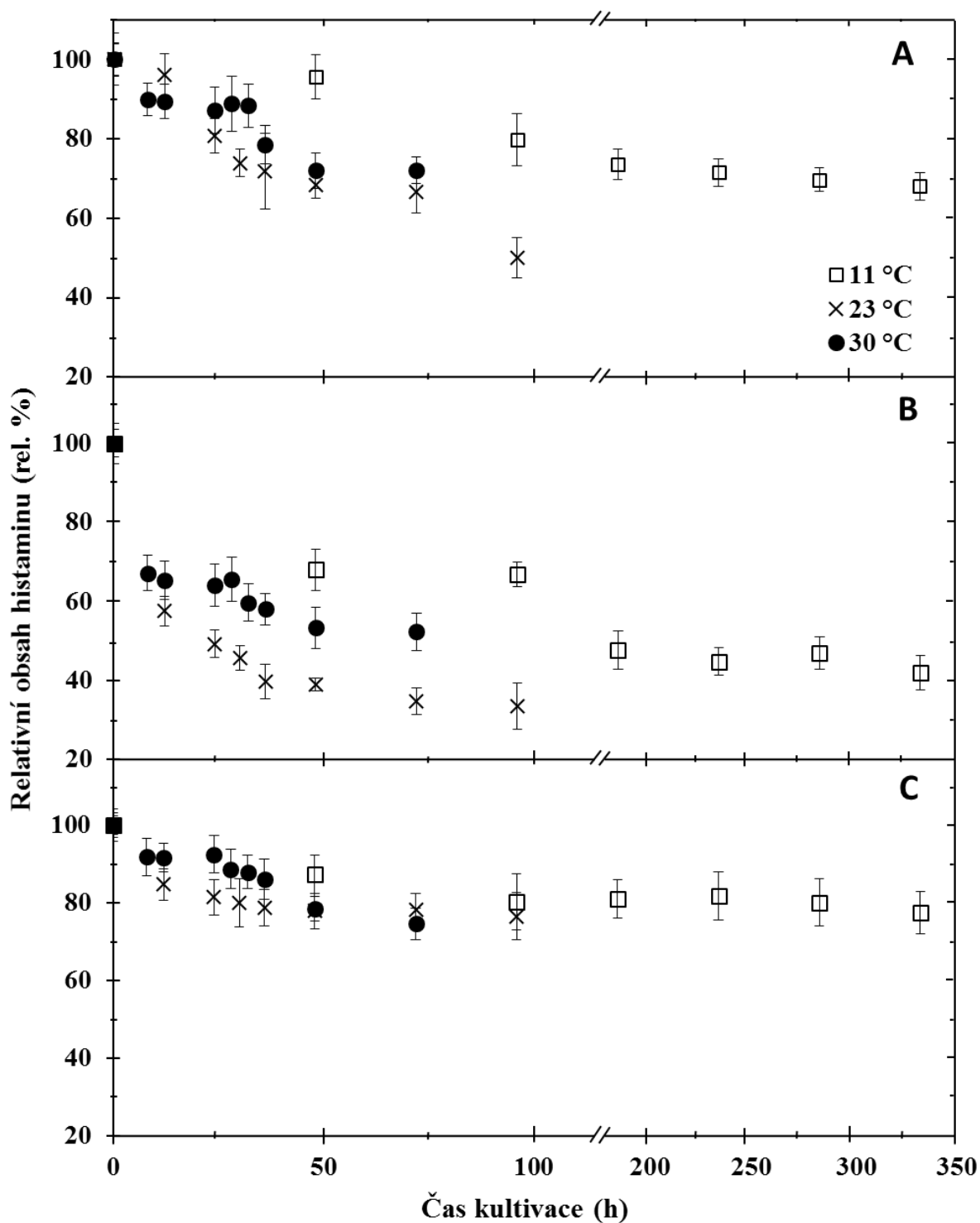
PŘÍLOHA I:



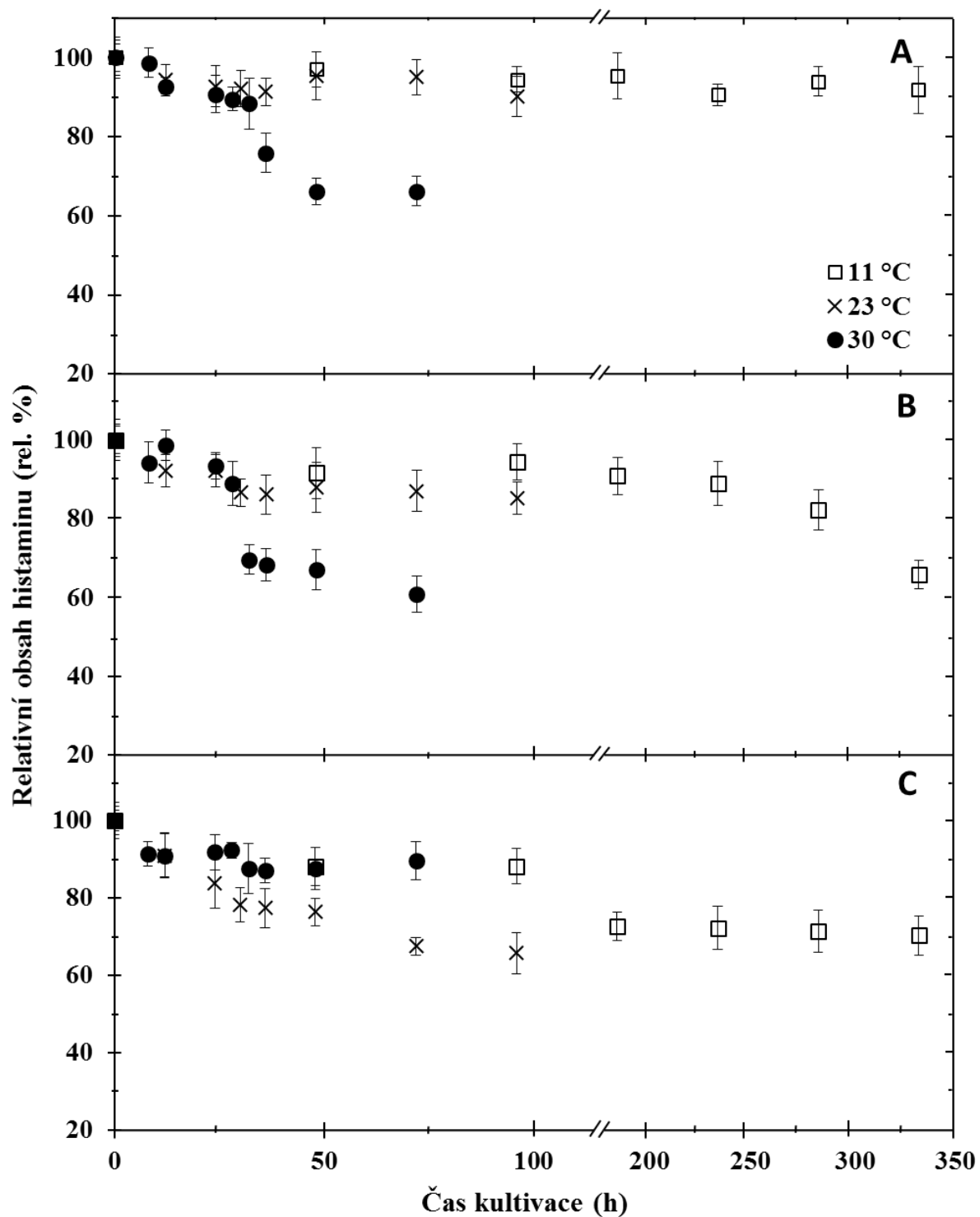
Obr. 1: Vývoj relativního obsahu histaminu (rel. %) při degradaci bakterií *Lactocaseibacillus casei* CCDM 198 po přidavku 1% cysteinu v úplném MRS bujónu s počáteční koncentrací histaminu $0,2 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ v závislosti na době kultivace (h) pro inkubační teploty $11 \text{ }^\circ\text{C}$, $23 \text{ }^\circ\text{C}$ a $30 \text{ }^\circ\text{C}$; počáteční relativní obsah histaminu v čase nula byl vždy 100 %. Inkubace byla prováděna při $\text{pH} = 5,4$ (části A), $\text{pH} = 6,2$ (části B) a $\text{pH} = 7,0$ (části C). Výsledky jsou prezentovány pomocí průměrů a standardních odchylek (sloupce; $n = 6$).



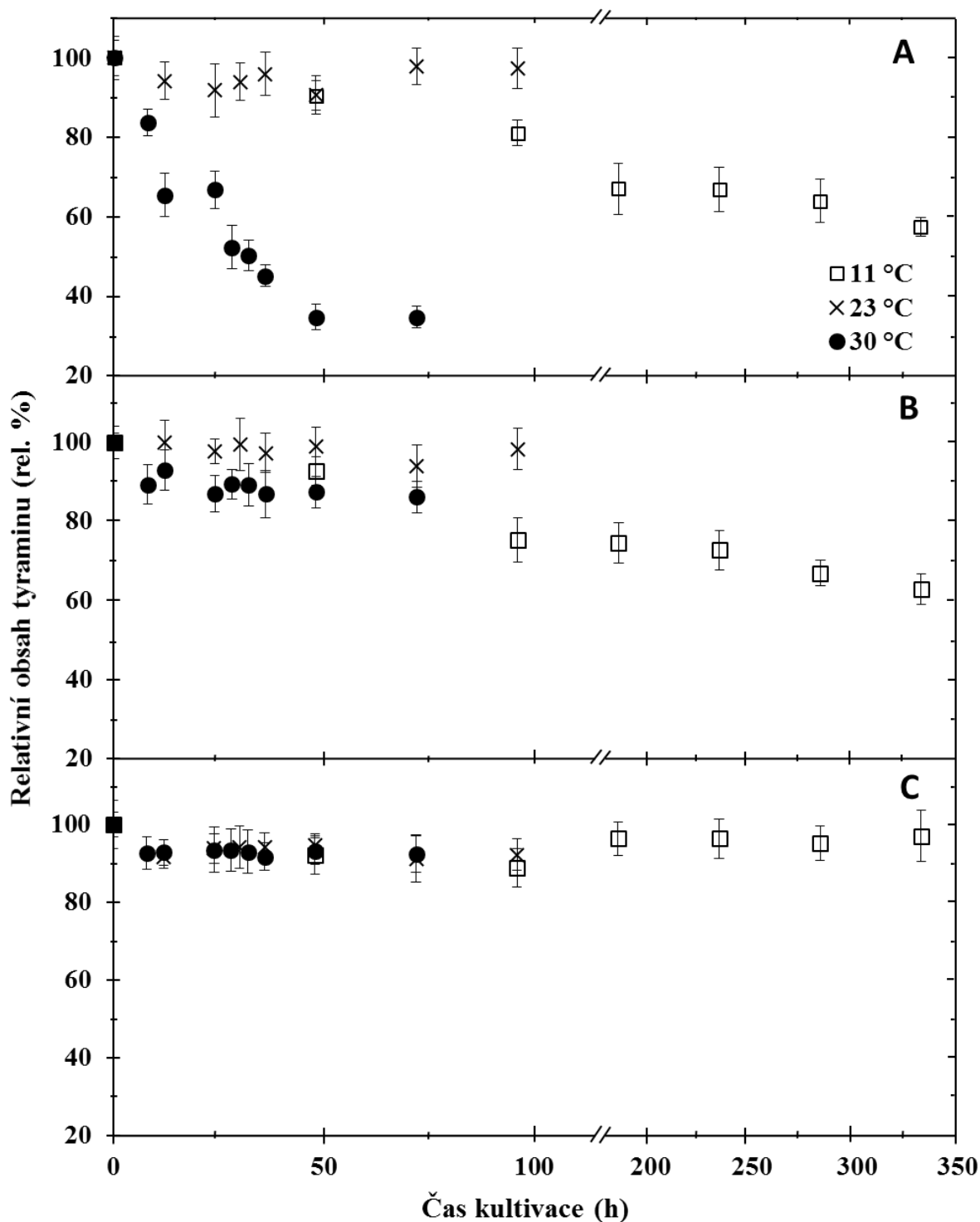
Obr. 2: Vývoj relativního obsahu histaminu (rel. %) při degradaci bakterií *Lacticaseibacillus casei* CCDM 198 po přidavku 1% cysteinu v úplném MRS bujónu s počáteční koncentrací histaminu $0,4 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ v závislosti na době kultivace (h) pro inkubační teploty $11 \text{ }^\circ\text{C}$, $23 \text{ }^\circ\text{C}$ a $30 \text{ }^\circ\text{C}$; počáteční relativní obsah histaminu v čase nula byl vždy 100 %. Inkubace byla prováděna při $\text{pH} = 5,4$ (části A), $\text{pH} = 6,2$ (části B) a $\text{pH} = 7,0$ (části C). Výsledky jsou prezentovány pomocí průměrů a standardních odchylek (sloupce; $n = 6$).



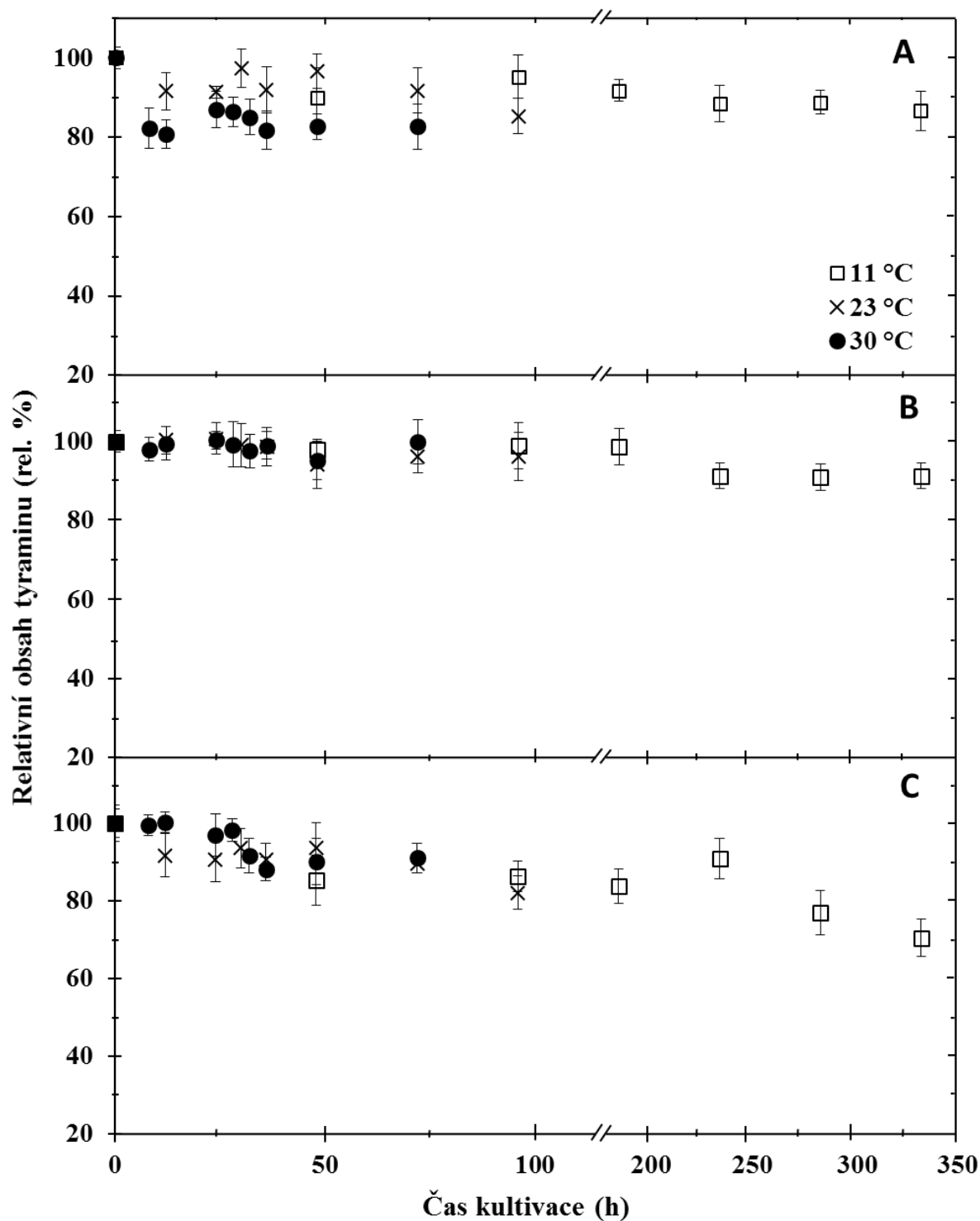
Obr. 3: Vývoj relativního obsahu histaminu (rel. %) při degradaci bakterií *Lacticaseibacillus casei* CCDM 198 po přidavku 1% cysteinu v neúplném MRS bujónu s počáteční koncentrací histaminu $0,2 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ v závislosti na době kultivace (h) pro inkubační teploty $11 \text{ }^\circ\text{C}$, $23 \text{ }^\circ\text{C}$ a $30 \text{ }^\circ\text{C}$; počáteční relativní obsah histaminu v čase nula byl vždy 100 %. Inkubace byla prováděna při $\text{pH} = 5,4$ (části A), $\text{pH} = 6,2$ (části B) a $\text{pH} = 7,0$ (části C). Výsledky jsou prezentovány pomocí průměrů a standardních odchylek (sloupce; $n = 6$).



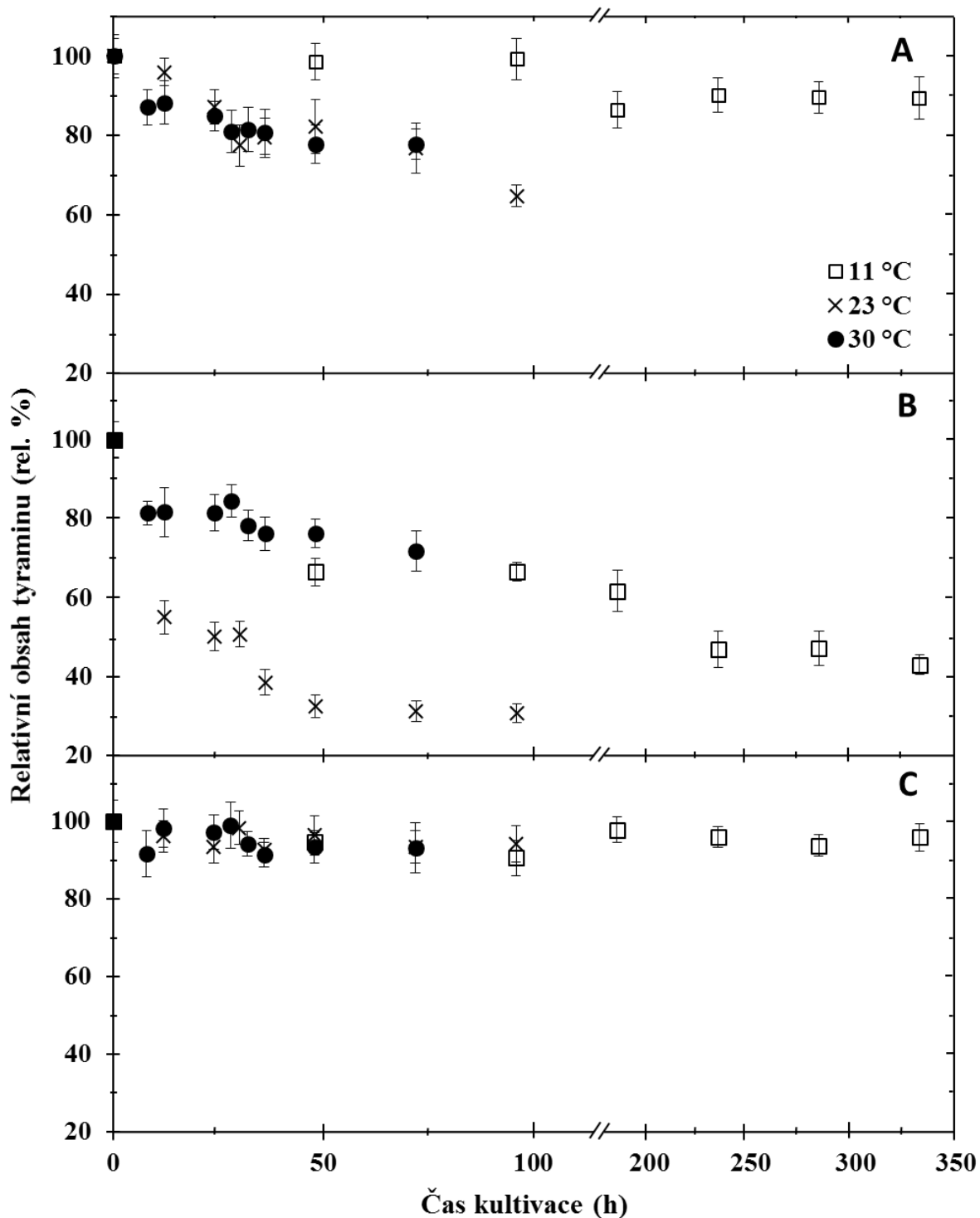
Obr. 4: Vývoj relativního obsahu histaminu (rel. %) při degradaci bakterií *Lactocaseibacillus casei* CCDM 198 po přidavku 1% cysteinu v neúplném MRS bujónu s počáteční koncentrací histaminu $0,4 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ v závislosti na době kultivace (h) pro inkubační teploty $11 \text{ }^\circ\text{C}$, $23 \text{ }^\circ\text{C}$ a $30 \text{ }^\circ\text{C}$; počáteční relativní obsah histaminu v čase nula byl vždy 100 %. Inkubace byla prováděna při $\text{pH} = 5,4$ (části A), $\text{pH} = 6,2$ (části B) a $\text{pH} = 7,0$ (části C). Výsledky jsou prezentovány pomocí průměrů a standardních odchylek (sloupce; $n = 6$).



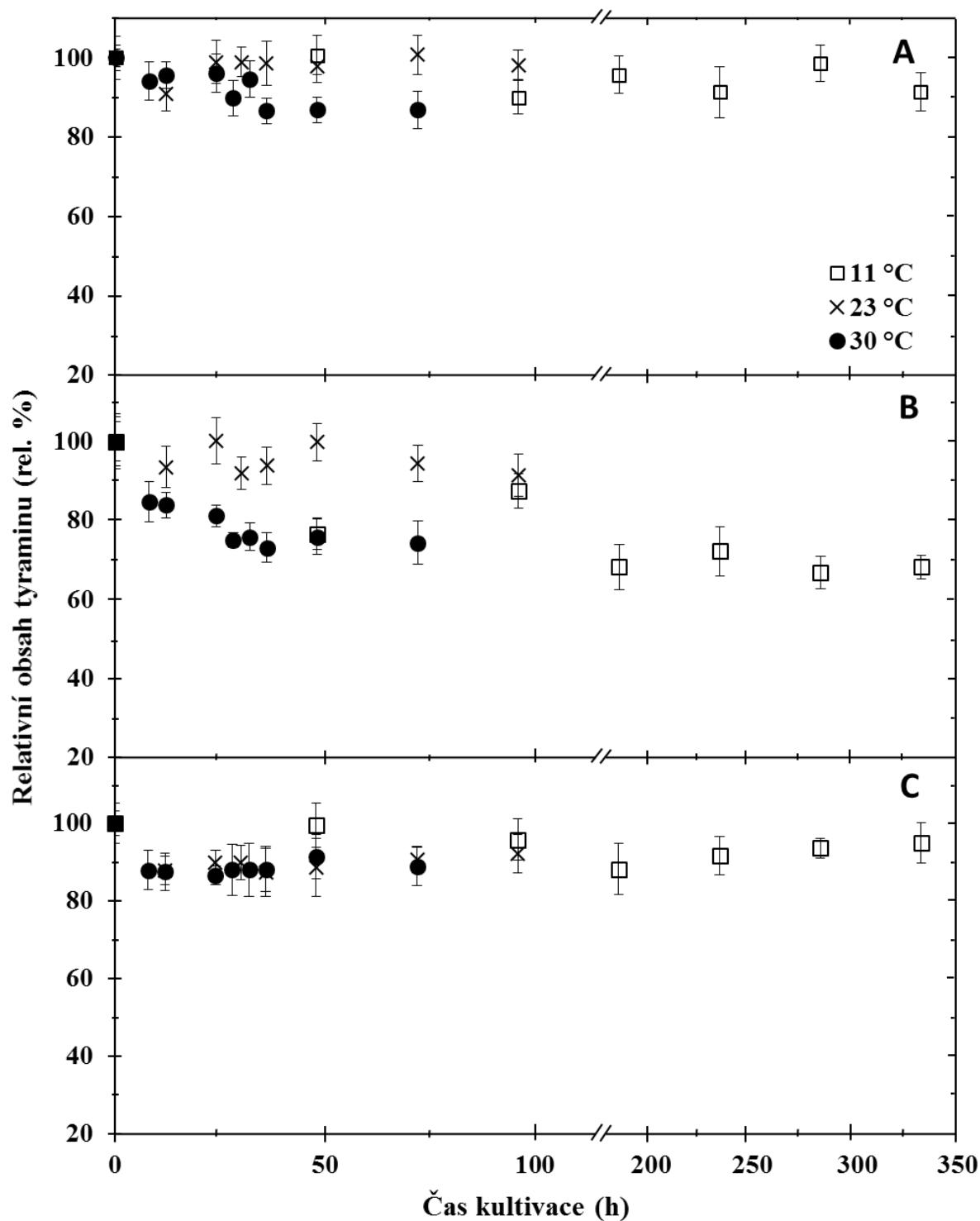
Obr. 5: Vývoj relativního obsahu tyraminu (rel. %) při degradaci bakterií *Lacticaseibacillus casei* CCDM 198 po přidavku 1% cysteinu v úplném MRS bujónu s počáteční koncentrací tyraminu $0,2 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ v závislosti na době kultivace (h) pro inkubační teploty $11 \text{ }^\circ\text{C}$, $23 \text{ }^\circ\text{C}$ a $30 \text{ }^\circ\text{C}$; počáteční relativní obsah tyraminu v čase nula byl vždy 100 %. Inkubace byla prováděna při $\text{pH} = 5,4$ (části A), $\text{pH} = 6,2$ (části B) a $\text{pH} = 7,0$ (části C). Výsledky jsou prezentovány pomocí průměrů a standardních odchylek (sloupce; $n = 6$).



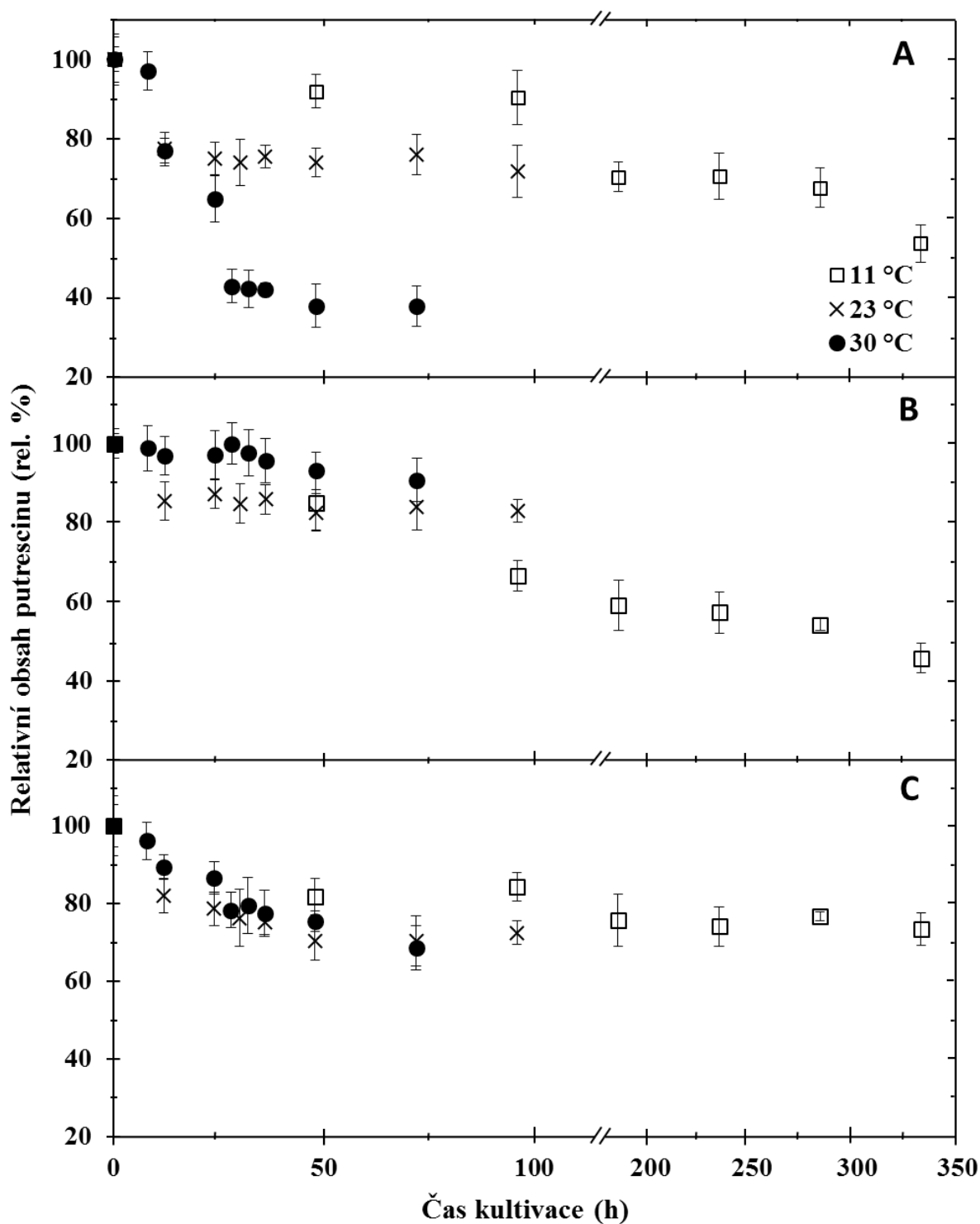
Obr. 6: Vývoj relativního obsahu tyraminu (rel. %) při degradaci bakterií *Lactacaseibacillus casei* CCDM 198 po přidavku 1% cysteinu v úplném MRS bujónu s počáteční koncentrací tyraminu $0,4 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ v závislosti na době kultivace (h) pro inkubační teploty $11 \text{ }^\circ\text{C}$, $23 \text{ }^\circ\text{C}$ a $30 \text{ }^\circ\text{C}$; počáteční relativní obsah tyraminu v čase nula byl vždy 100 %. Inkubace byla prováděna při $\text{pH} = 5,4$ (části A), $\text{pH} = 6,2$ (části B) a $\text{pH} = 7,0$ (části C). Výsledky jsou prezentovány pomocí průměrů a standardních odchylek (sloupce; $n = 6$).



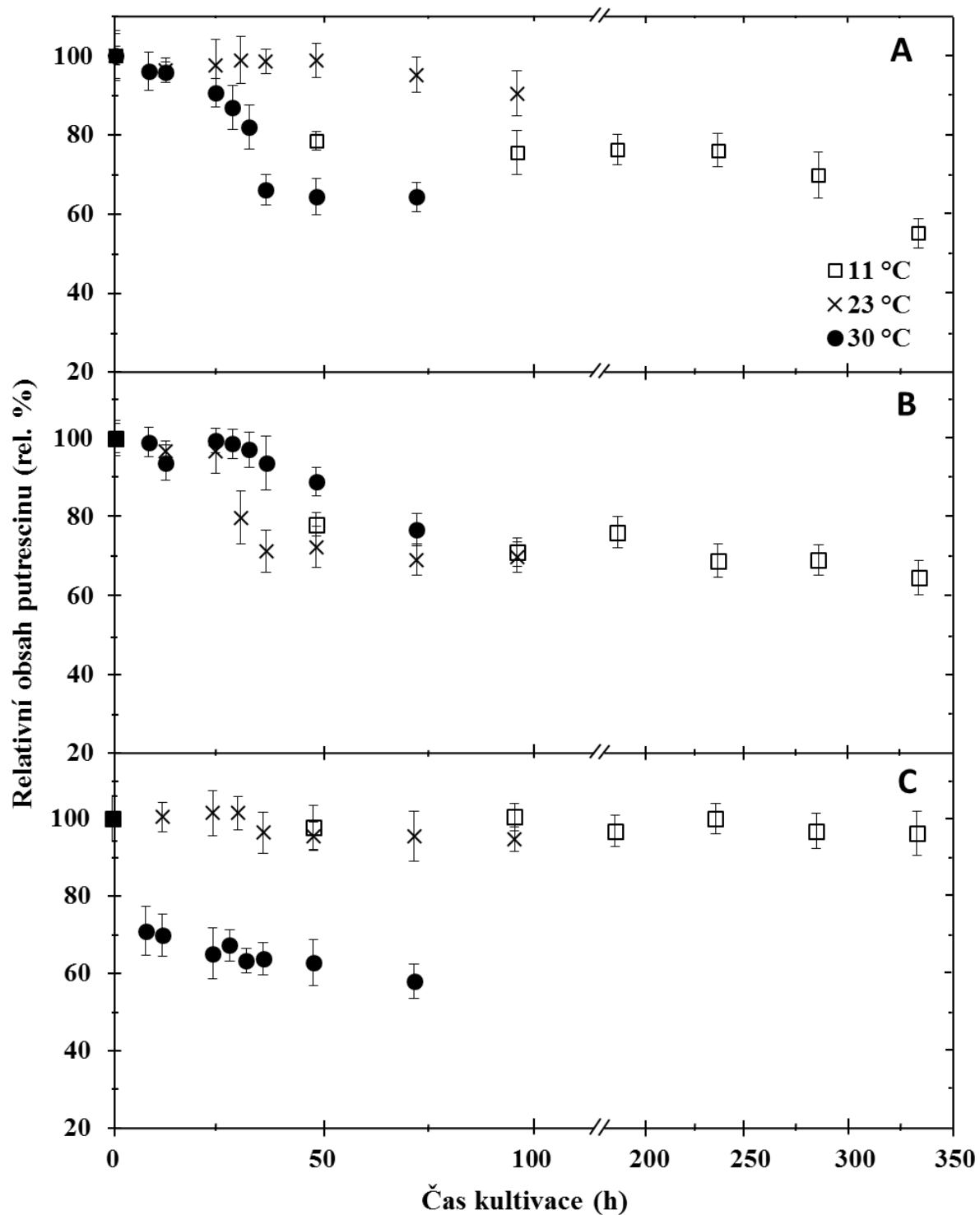
Obr. 7: Vývoj relativního obsahu tyraminu (rel. %) při degradaci bakterií *Lacticaseibacillus casei* CCDM 198 po přidavku 1% cysteinu v neúplném MRS bujónu s počáteční koncentrací tyraminu $0,2 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ v závislosti na době kultivace (h) pro inkubační teploty $11 \text{ }^\circ\text{C}$, $23 \text{ }^\circ\text{C}$ a $30 \text{ }^\circ\text{C}$; počáteční relativní obsah tyraminu v čase nula byl vždy 100 %. Inkubace byla prováděna při $\text{pH} = 5,4$ (části A), $\text{pH} = 6,2$ (části B) a $\text{pH} = 7,0$ (části C). Výsledky jsou prezentovány pomocí průměrů a standardních odchylek (sloupce; $n = 6$).



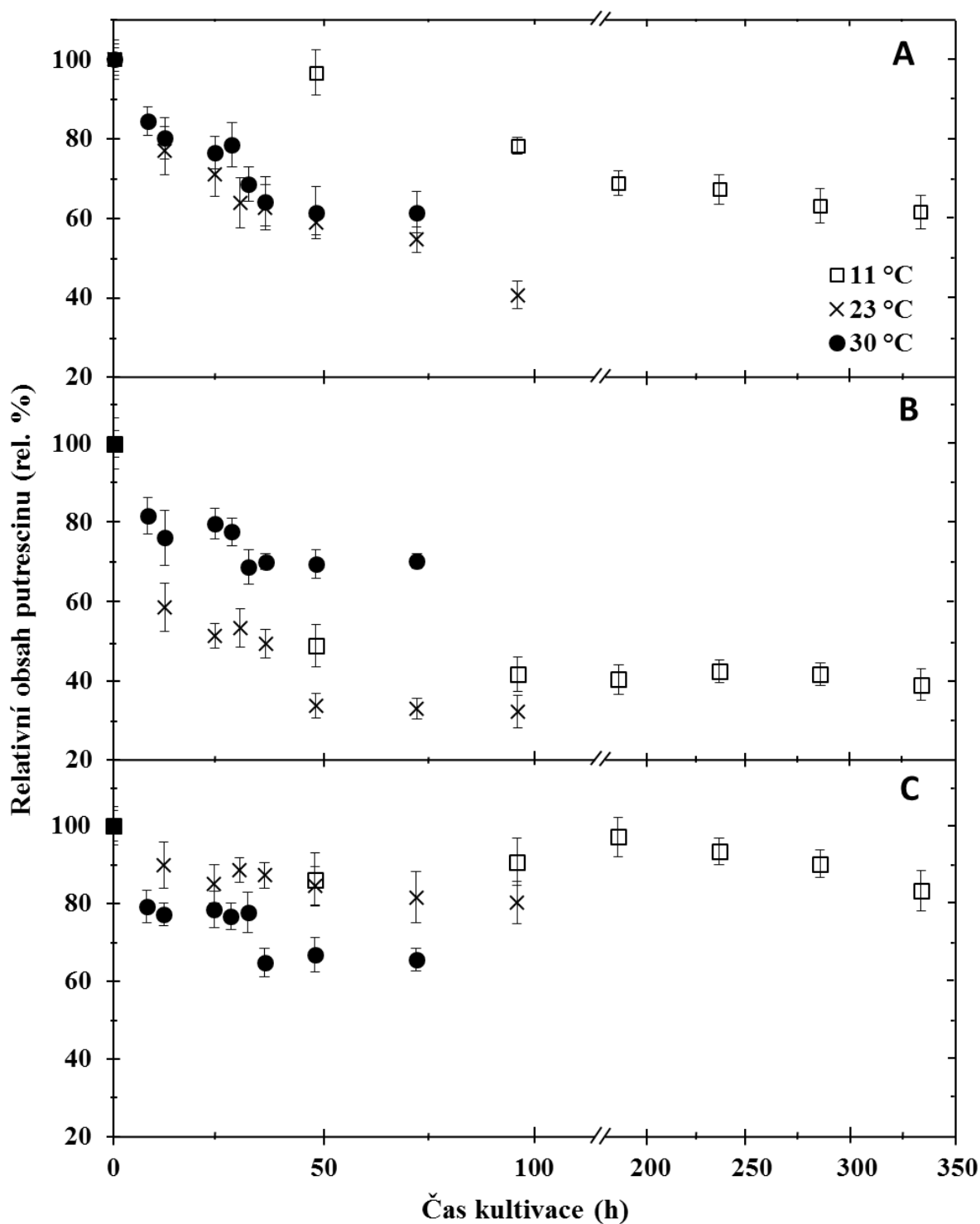
Obr. 8: Vývoj relativního obsahu tyraminu (rel. %) při degradaci bakterií *Lactocaseibacillus casei* CCDM 198 po přidavku 1% cysteinu v neúplném MRS bujónu s počáteční koncentrací tyraminu $0,4 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ v závislosti na době kultivace (h) pro inkubační teploty $11 \text{ }^\circ\text{C}$, $23 \text{ }^\circ\text{C}$ a $30 \text{ }^\circ\text{C}$; počáteční relativní obsah tyraminu v čase nula byl vždy 100 %. Inkubace byla prováděna při $\text{pH} = 5,4$ (části A), $\text{pH} = 6,2$ (části B) a $\text{pH} = 7,0$ (části C). Výsledky jsou prezentovány pomocí průměrů a standardních odchylek (sloupce; $n = 6$).



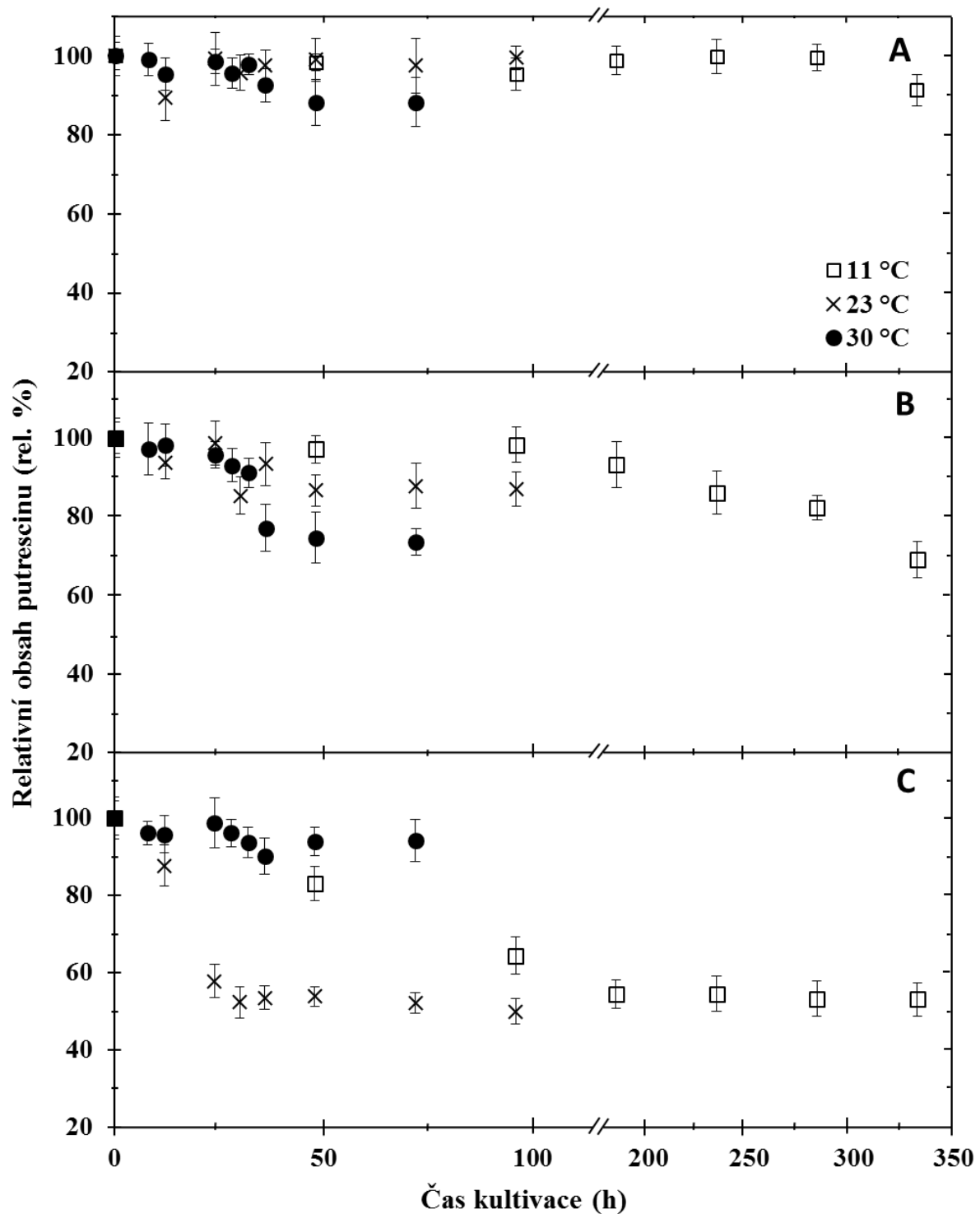
Obr. 9: Vývoj relativního obsahu putrescinu (rel. %) při degradaci bakterií *Lacticaseibacillus casei* CCDM 198 po přidavku 1% cysteinu v úplném MRS bujónu s počáteční koncentrací putrescinu $0,2 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ v závislosti na době kultivace (h) pro inkubační teploty $11 \text{ }^\circ\text{C}$, $23 \text{ }^\circ\text{C}$ a $30 \text{ }^\circ\text{C}$; počáteční relativní obsah putrescinu v čase nula byl vždy 100 %. Inkubace byla prováděna při $\text{pH} = 5,4$ (části A), $\text{pH} = 6,2$ (části B) a $\text{pH} = 7,0$ (části C). Výsledky jsou prezentovány pomocí průměrů a standardních odchylek (sloupce; $n = 6$).



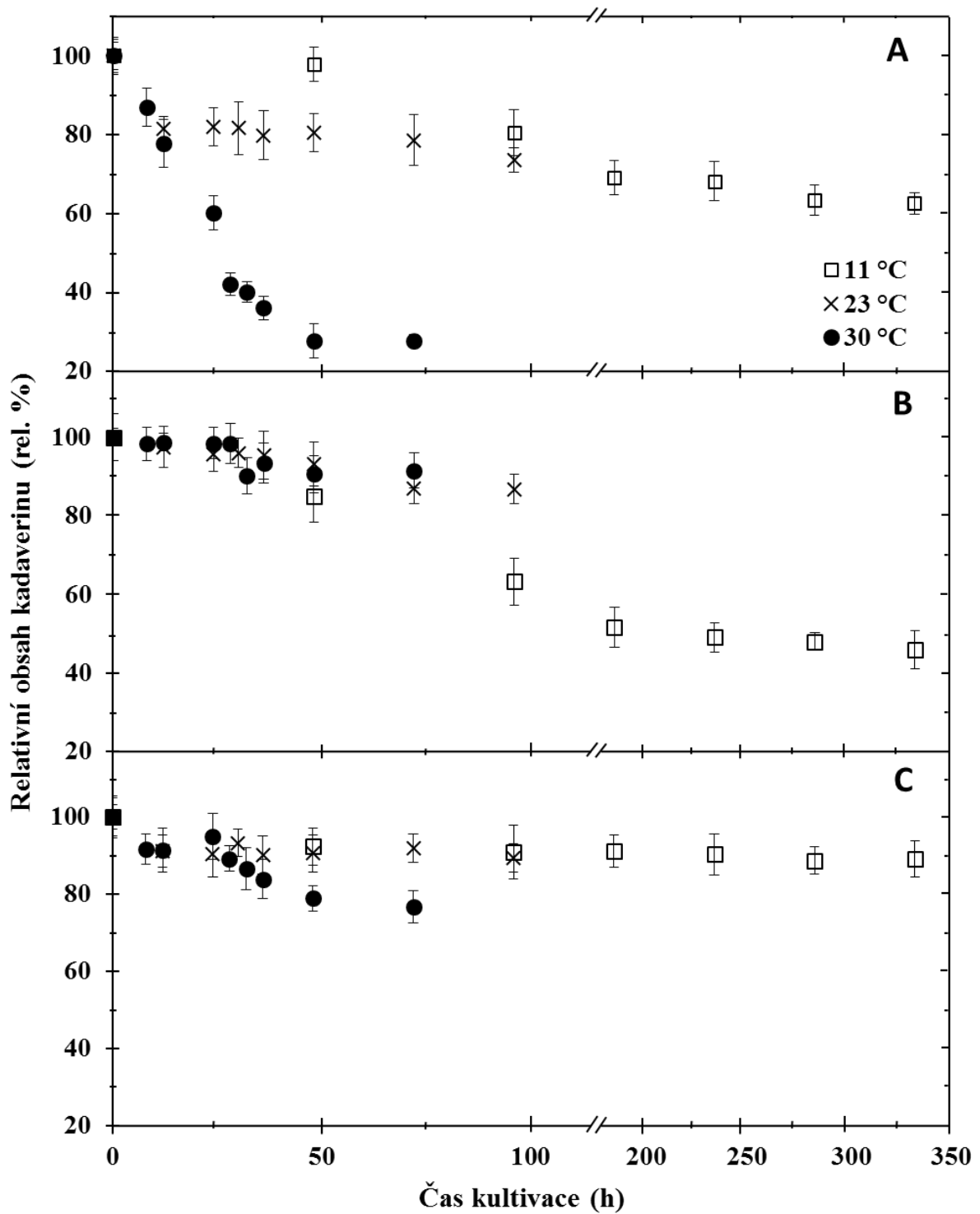
Obr. 10: Vývoj relativního obsahu putrescinu (rel. %) při degradaci bakterií *Lactocaseibacillus casei* CCDM 198 po přidavku 1% cysteinu v úplném MRS bujónu s počáteční koncentrací putrescinu $0,4 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ v závislosti na době kultivace (h) pro inkubační teploty 11 °C, 23 °C a 30 °C; počáteční relativní obsah putrescinu v čase nula byl vždy 100 %. Inkubace byla prováděna při pH = 5,4 (části A), pH = 6,2 (části B) a pH = 7,0 (části C). Výsledky jsou prezentovány pomocí průměrů a standardních odchylek (sloupce; n = 6).



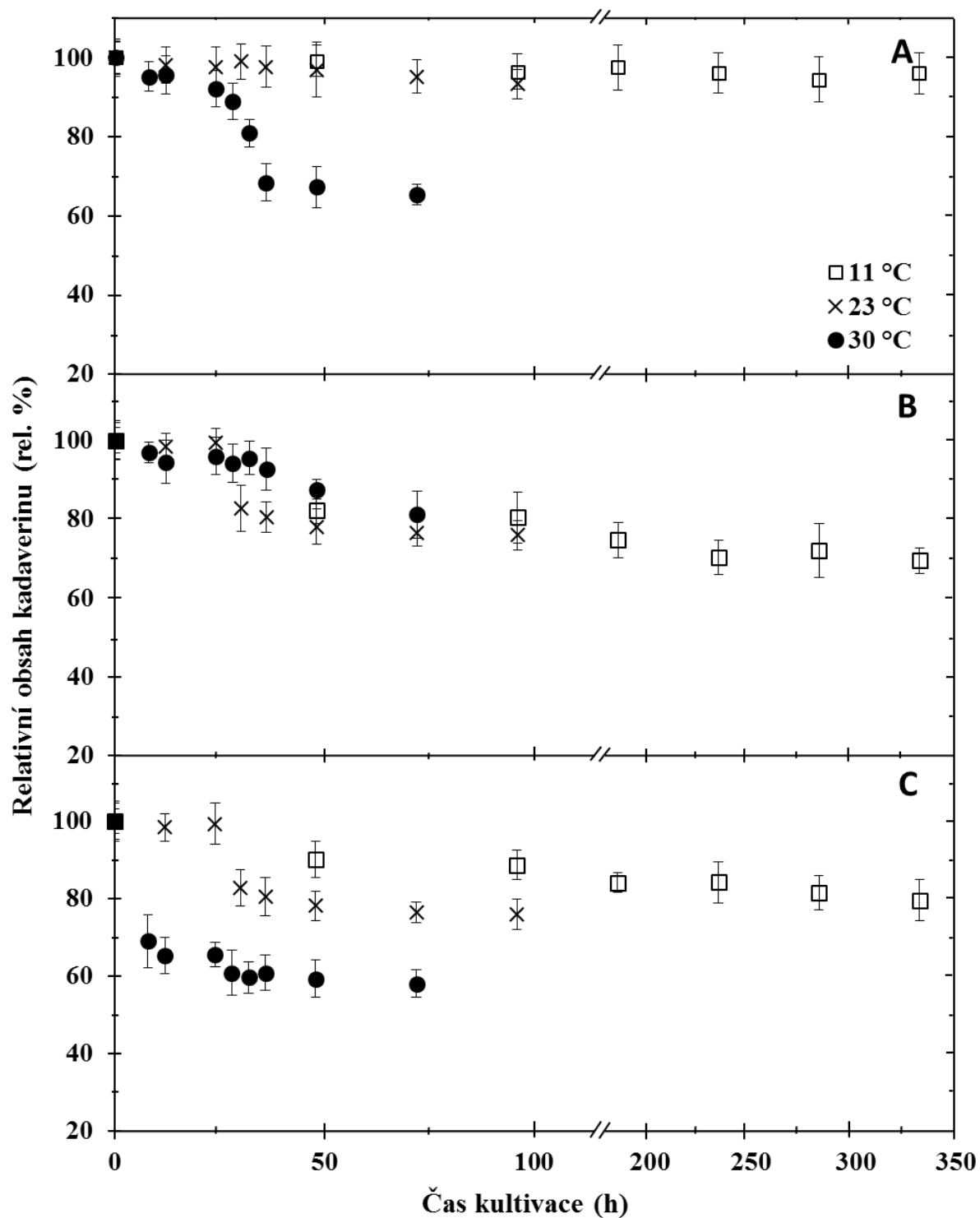
Obr. 11: Vývoj relativního obsahu putrescinu (rel. %) při degradaci bakterií *Lactocaseibacillus casei* CCDM 198 po přidavku 1% cysteinu v neúplném MRS bujónu s počáteční koncentrací putrescinu $0,2 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ v závislosti na době kultivace (h) pro inkubační teploty 11 °C, 23 °C a 30 °C; počáteční relativní obsah putrescinu v čase nula byl vždy 100 %. Inkubace byla prováděna při pH = 5,4 (části A), pH = 6,2 (části B) a pH = 7,0 (části C). Výsledky jsou prezentovány pomocí průměrů a standardních odchylek (sloupce; n = 6).



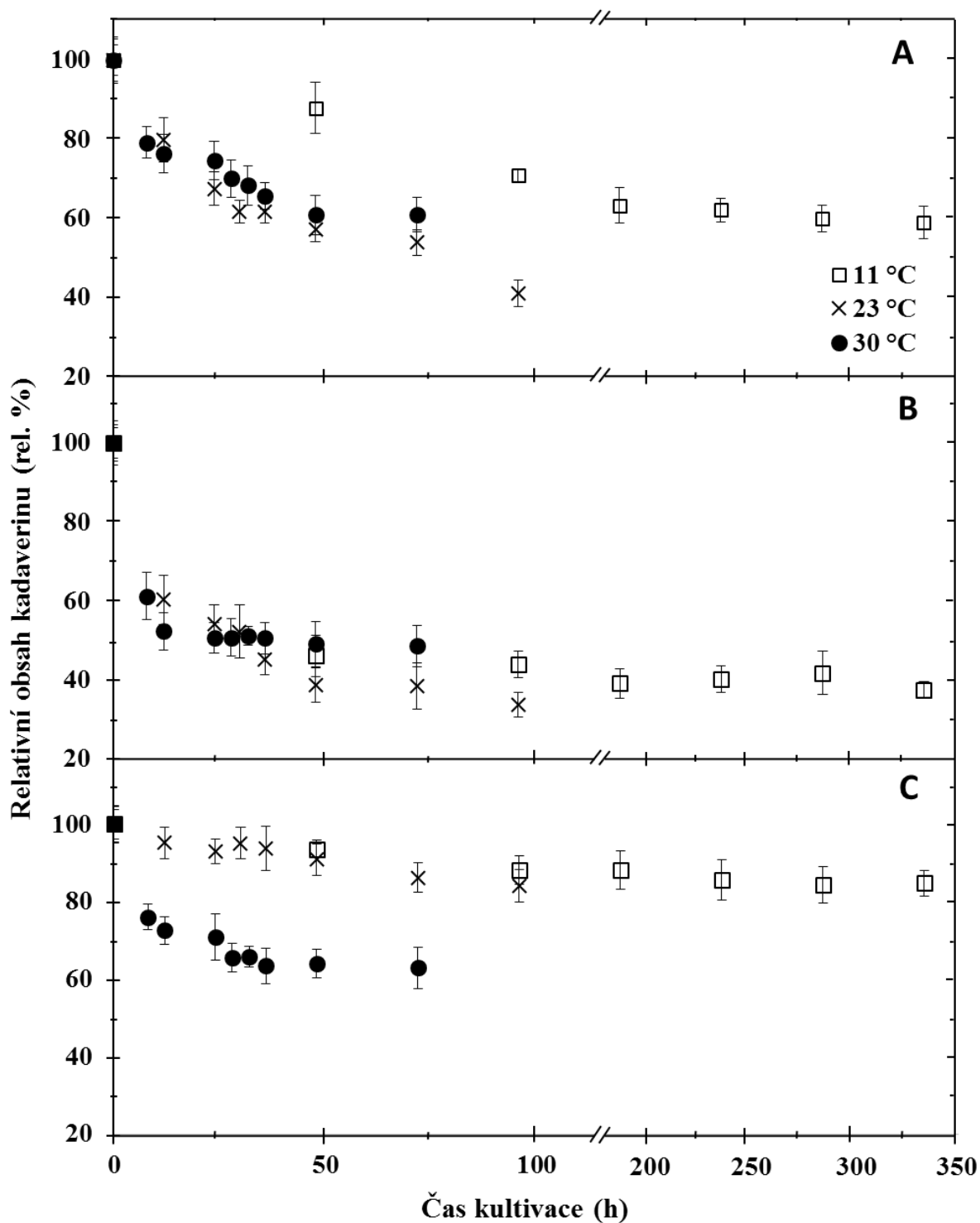
Obr. 12: Vývoj relativního obsahu putrescinu (rel. %) při degradaci bakterií *Lactocaseibacillus casei* CCDM 198 po přidavku 1% cysteinu v neúplném MRS bujónu s počáteční koncentrací putrescinu $0,4 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ v závislosti na době kultivace (h) pro inkubační teploty $11 \text{ }^\circ\text{C}$, $23 \text{ }^\circ\text{C}$ a $30 \text{ }^\circ\text{C}$; počáteční relativní obsah putrescinu v čase nula byl vždy 100 %. Inkubace byla prováděna při $\text{pH} = 5,4$ (části A), $\text{pH} = 6,2$ (části B) a $\text{pH} = 7,0$ (části C). Výsledky jsou prezentovány pomocí průměrů a standardních odchylek (sloupce; $n = 6$).



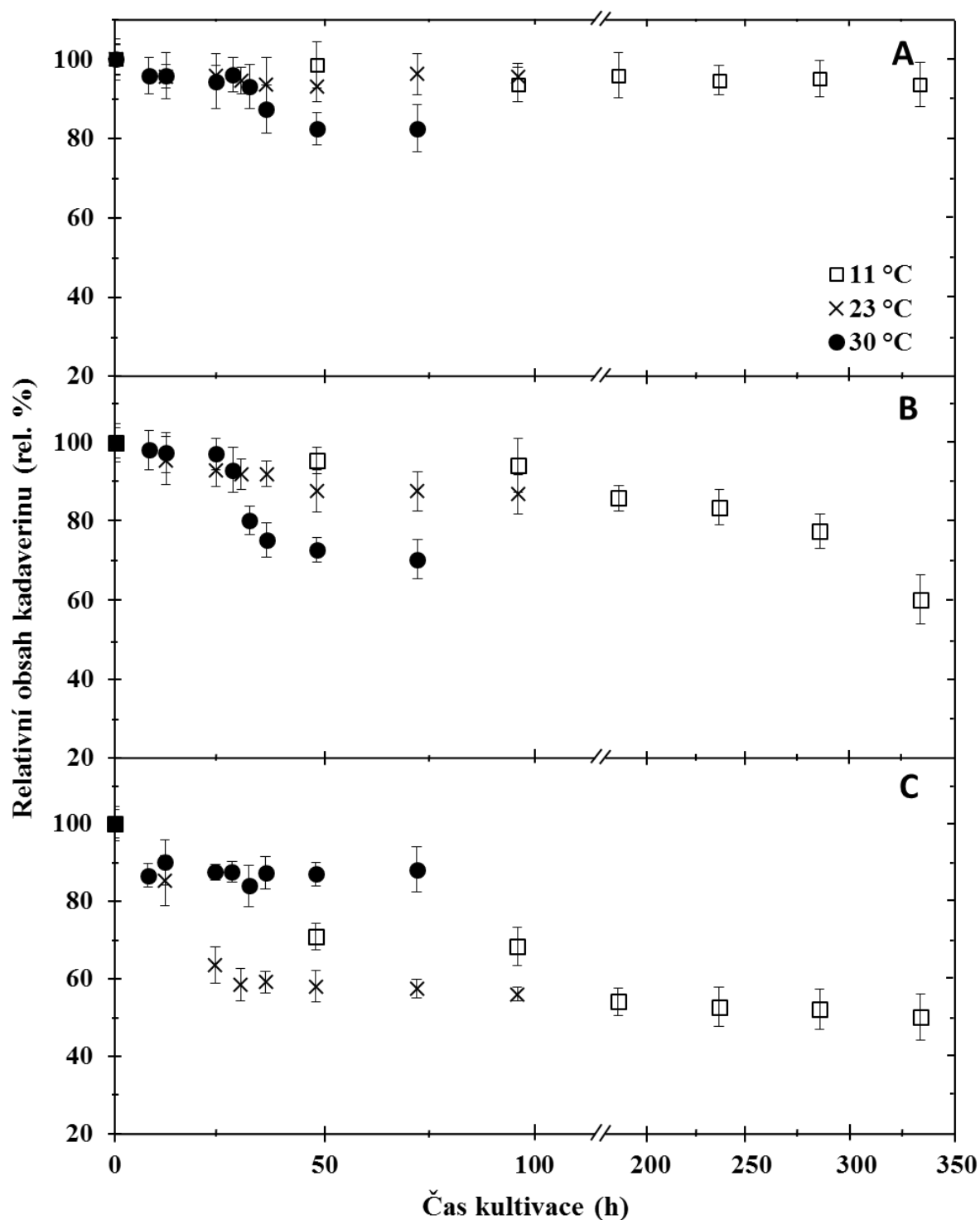
Obr. 13: Vývoj relativního obsahu kadaverinu (rel. %) při degradaci bakterií *Lacticaseibacillus casei* CCDM 198 po přidavku 1% cysteinu v úplném MRS bujónu s počáteční koncentrací kadaverinu $0,2 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ v závislosti na době kultivace (h) pro inkubační teploty $11 \text{ }^\circ\text{C}$, $23 \text{ }^\circ\text{C}$ a $30 \text{ }^\circ\text{C}$; počáteční relativní obsah kadaverinu v čase nula byl vždy 100 %. Inkubace byla prováděna při $\text{pH} = 5,4$ (části A), $\text{pH} = 6,2$ (části B) a $\text{pH} = 7,0$ (části C). Výsledky jsou prezentovány pomocí průměrů a standardních odchylek (sloupce; $n = 6$).



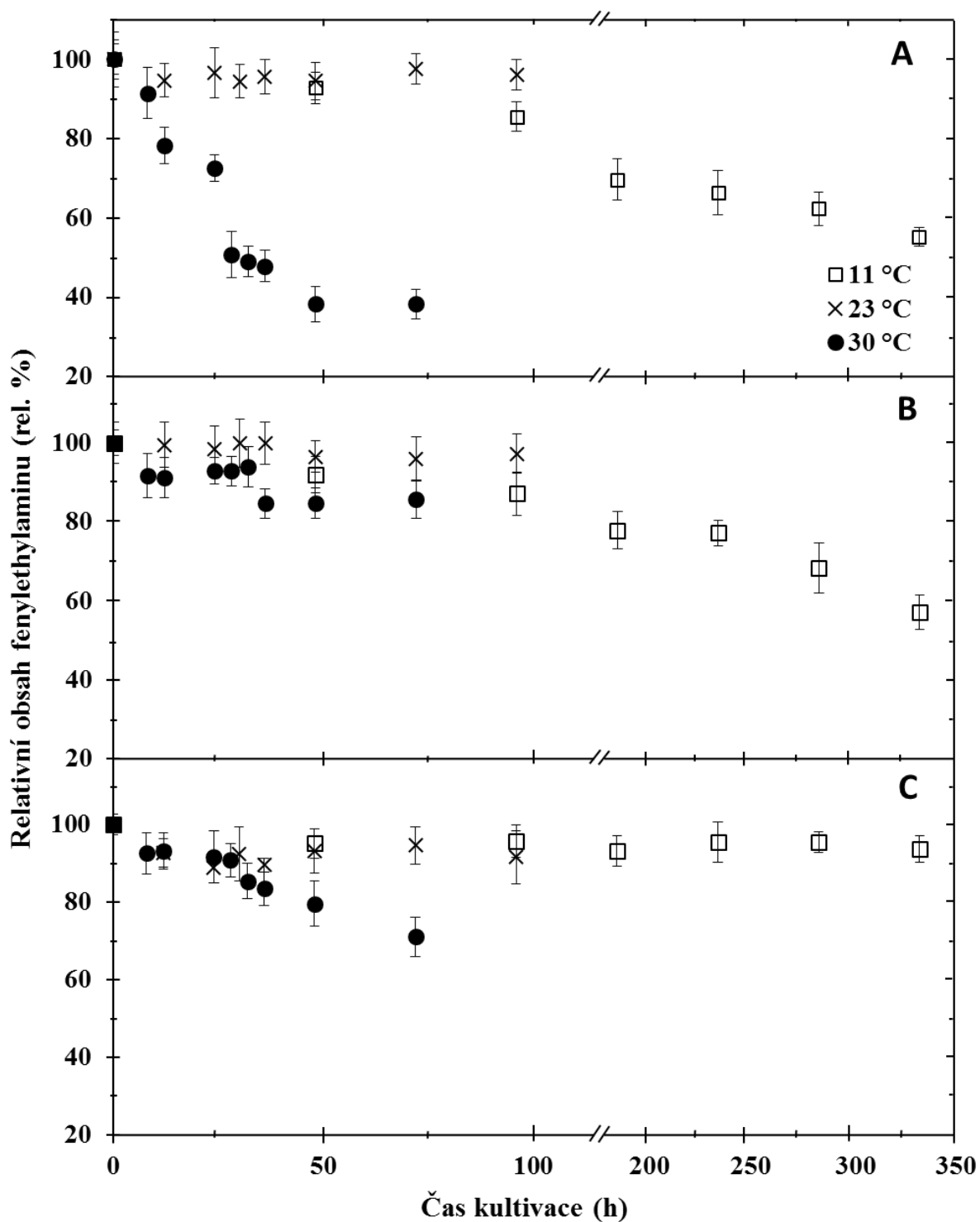
Obr. 14: Vývoj relativního obsahu kadaverinu (rel. %) při degradaci bakterií *Lactocaseibacillus casei* CCDM 198 po přidavku 1% cysteinu v úplném MRS bujónu s počáteční koncentrací kadaverinu $0,4 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ v závislosti na době kultivace (h) pro inkubační teploty $11 \text{ }^\circ\text{C}$, $23 \text{ }^\circ\text{C}$ a $30 \text{ }^\circ\text{C}$; počáteční relativní obsah kadaverinu v čase nula byl vždy 100 %. Inkubace byla prováděna při $\text{pH} = 5,4$ (části A), $\text{pH} = 6,2$ (části B) a $\text{pH} = 7,0$ (části C). Výsledky jsou prezentovány pomocí průměrů a standardních odchylek (sloupce; $n = 6$).



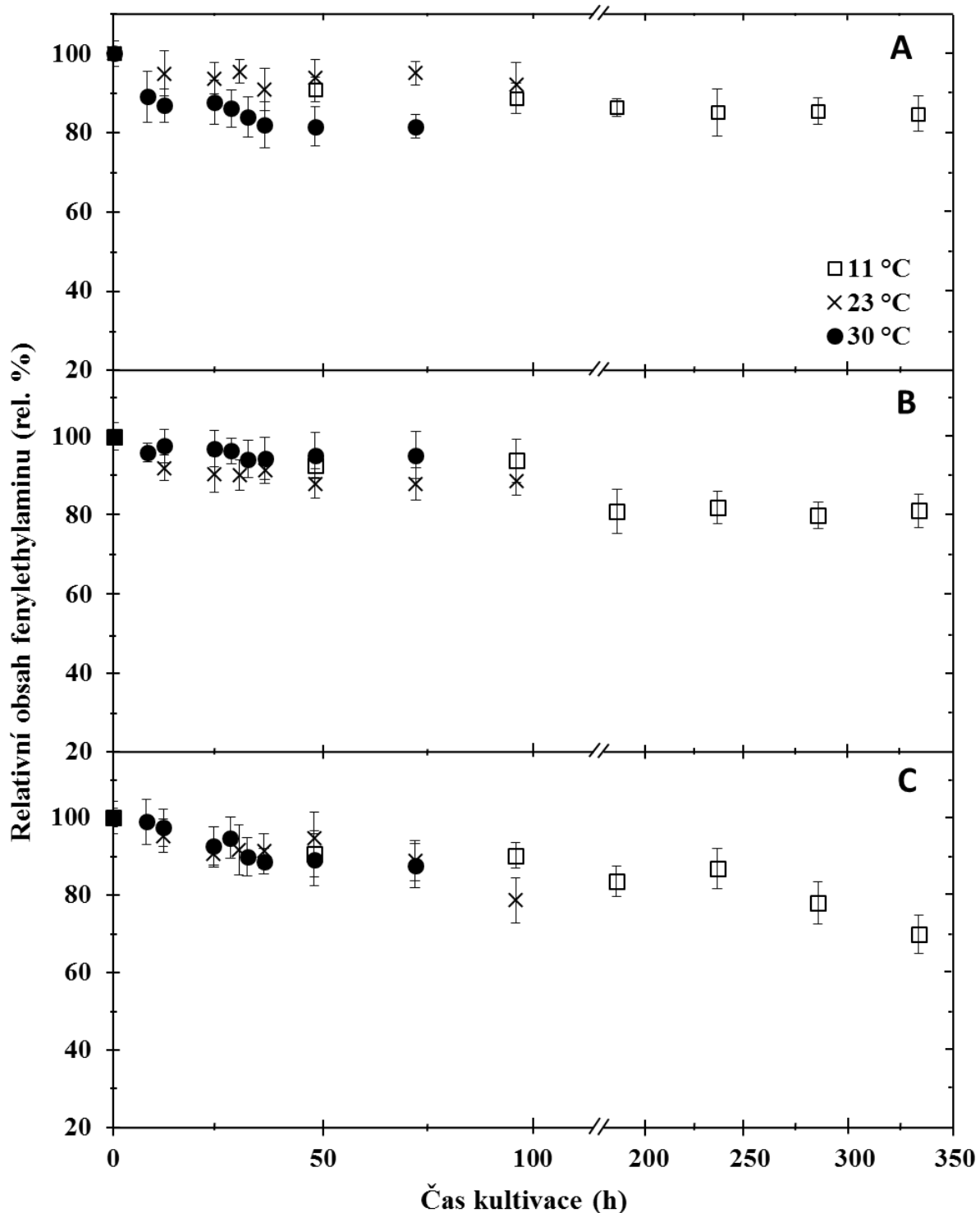
Obr. 15: Vývoj relativního obsahu kadaverinu (rel. %) při degradaci bakterií *Lacticaseibacillus casei* CCDM 198 po přidavku 1% cysteinu v neúplném MRS bujónu s počáteční koncentrací kadaverinu $0,2 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ v závislosti na době kultivace (h) pro inkubační teploty $11 \text{ }^\circ\text{C}$, $23 \text{ }^\circ\text{C}$ a $30 \text{ }^\circ\text{C}$; počáteční relativní obsah kadaverinu v čase nula byl vždy 100 %. Inkubace byla prováděna při $\text{pH} = 5,4$ (části A), $\text{pH} = 6,2$ (části B) a $\text{pH} = 7,0$ (části C). Výsledky jsou prezentovány pomocí průměrů a standardních odchylek (sloupce; $n = 6$).



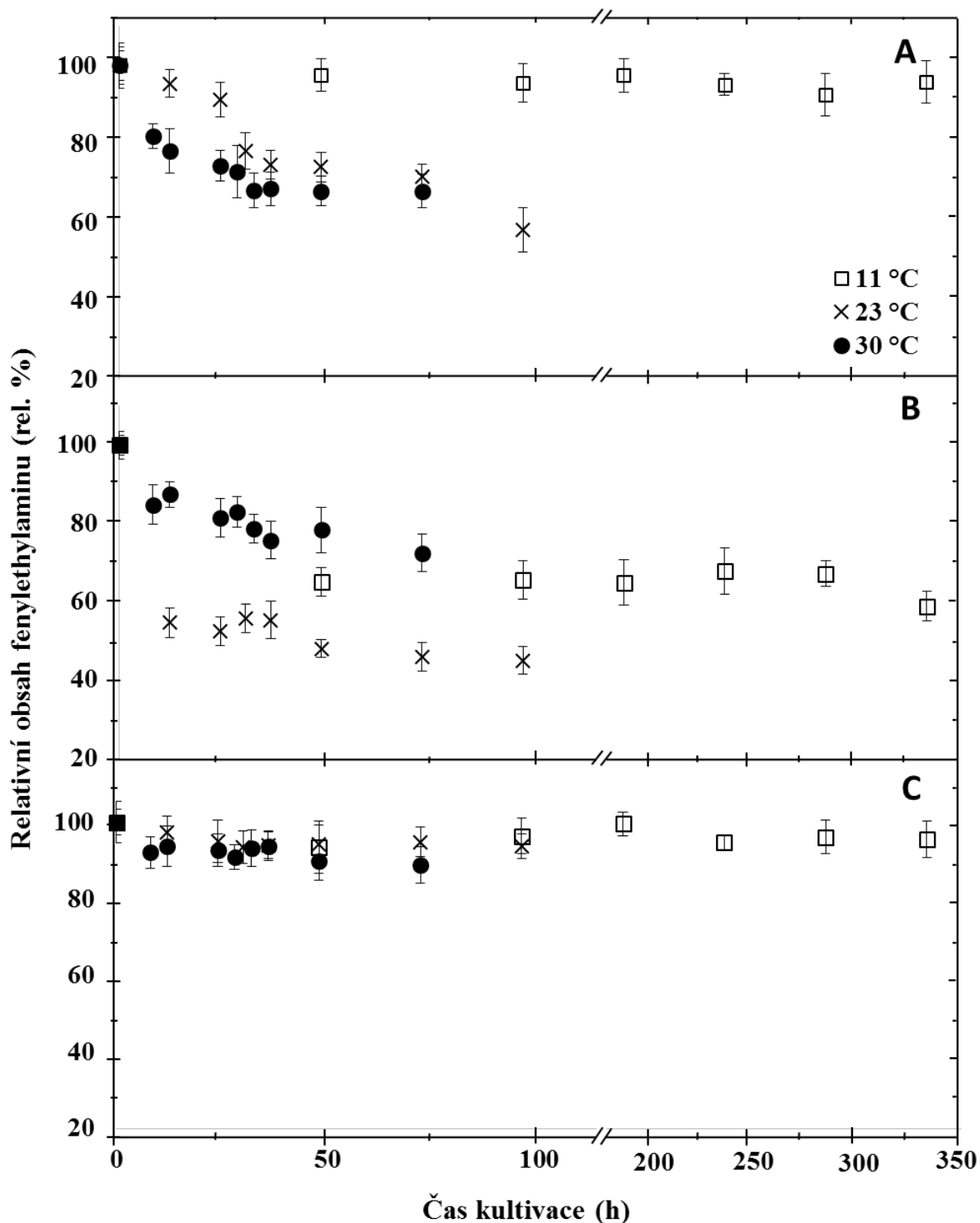
Obr. 16: Vývoj relativního obsahu kadaverinu (rel. %) při degradaci bakterií *Lacticaseibacillus casei* CCDM 198 po přidavku 1% cysteinu v neúplném MRS bujónu s počáteční koncentrací kadaverinu $0,4 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ v závislosti na době kultivace (h) pro inkubační teploty 11 °C, 23 °C a 30 °C; počáteční relativní obsah kadaverinu v čase nula byl vždy 100 %. Inkubace byla prováděna při pH = 5,4 (části A), pH = 6,2 (části B) a pH = 7,0 (části C). Výsledky jsou prezentovány pomocí průměrů a standardních odchylek (sloupce; n = 6).



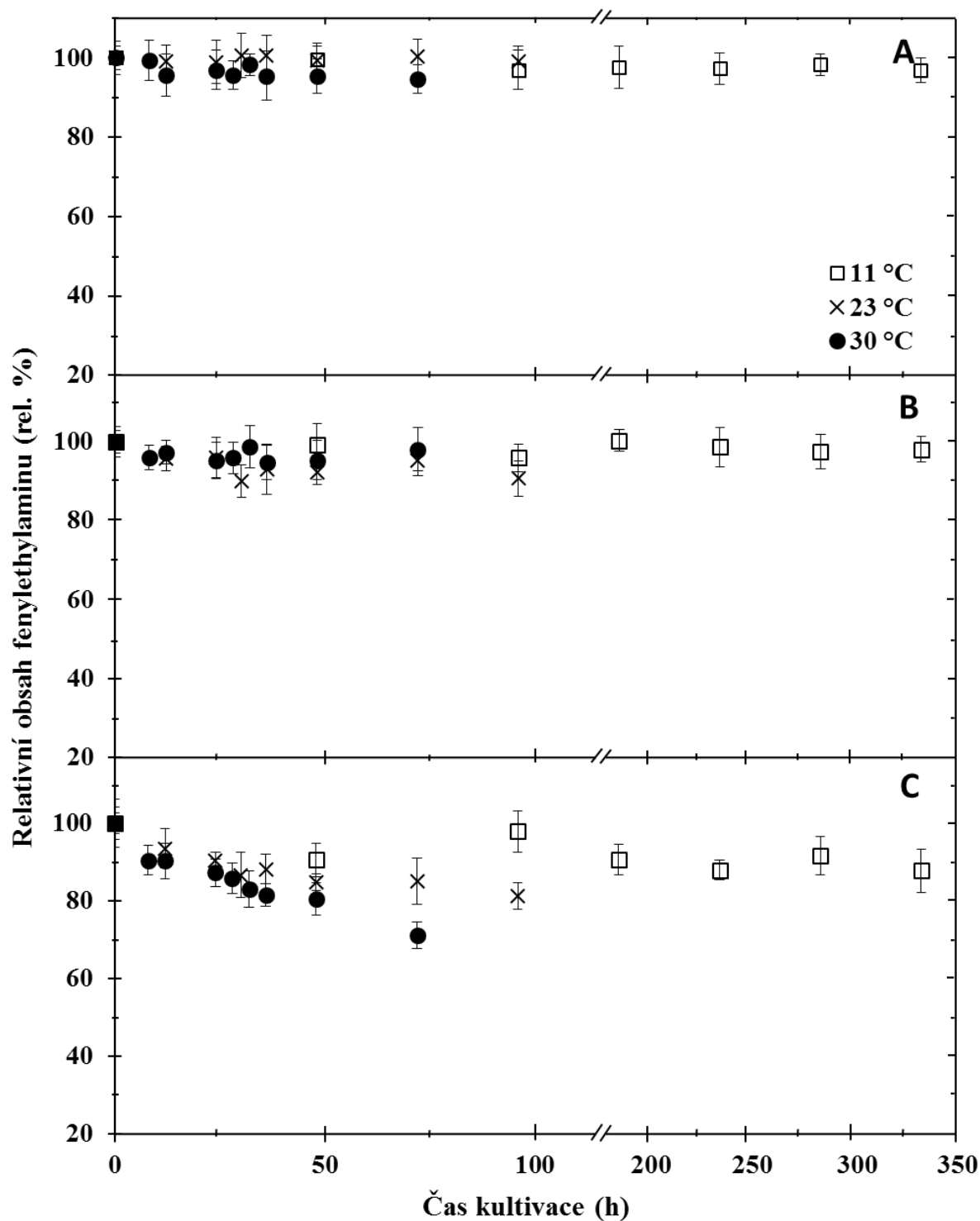
Obr. 17: Vývoj relativního obsahu fenylethylaminu (rel. %) při degradaci bakterií *Lacticaseibacillus casei* CCDM 198 po přidavku 1% cysteinu v úplném MRS bujónu s počáteční koncentrací fenylethylaminu $0,2 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ v závislosti na době kultivace (h) pro inkubační teploty $11 \text{ }^\circ\text{C}$, $23 \text{ }^\circ\text{C}$ a $30 \text{ }^\circ\text{C}$; počáteční relativní obsah fenylethylaminu v čase nula byl vždy 100 %. Inkubace byla prováděna při $\text{pH} = 5,4$ (části A), $\text{pH} = 6,2$ (části B) a $\text{pH} = 7,0$ (části C). Výsledky jsou prezentovány pomocí průměrů a standardních odchylek (sloupce; $n = 6$).



Obr. 18: Vývoj relativního obsahu fenylethylaminu (rel. %) při degradaci bakterií *Lacticaseibacillus casei* CCDM 198 po přidavku 1% cysteinu v úplném MRS bujónu s počáteční koncentrací fenylethylaminu $0,4 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ v závislosti na době kultivace (h) pro inkubační teploty $11 \text{ }^\circ\text{C}$, $23 \text{ }^\circ\text{C}$ a $30 \text{ }^\circ\text{C}$; počáteční relativní obsah fenylethylaminu v čase nula byl vždy 100 %. Inkubace byla prováděna při $\text{pH} = 5,4$ (části A), $\text{pH} = 6,2$ (části B) a $\text{pH} = 7,0$ (části C). Výsledky jsou prezentovány pomocí průměrů a standardních odchylek (sloupce; $n = 6$).



Obr. 19: Vývoj relativního obsahu fenylethylaminu (rel. %) při degradaci bakterií *Lacticaseibacillus casei* CCDM 198 po přidavku 1% cysteinu v neúplném MRS bujónu s počáteční koncentrací fenylethylaminu $0,2 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ v závislosti na době kultivace (h) pro inkubační teploty $11 \text{ }^\circ\text{C}$, $23 \text{ }^\circ\text{C}$ a $30 \text{ }^\circ\text{C}$; počáteční relativní obsah fenylethylaminu v čase nula byl vždy 100 %. Inkubace byla prováděna při $\text{pH} = 5,4$ (části A), $\text{pH} = 6,2$ (části B) a $\text{pH} = 7,0$ (části C). Výsledky jsou prezentovány pomocí průměrů a standardních odchylek (sloupce; $n = 6$).



Obr. 20: Vývoj relativního obsahu fenylethylaminu (rel. %) při degradaci bakterií *Lacticaseibacillus casei* CCDM 198 po přidavku 1% cysteinu v neúplném MRS bujónu s počáteční koncentrací fenylethylaminu $0,2 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ v závislosti na době kultivace (h) pro inkubační teploty $11 \text{ }^\circ\text{C}$, $23 \text{ }^\circ\text{C}$ a $30 \text{ }^\circ\text{C}$; počáteční relativní obsah fenylethylaminu v čase nula byl vždy 100 %. Inkubace byla prováděna při $\text{pH} = 5,4$ (části A), $\text{pH} = 6,2$ (části B) a $\text{pH} = 7,0$ (části C). Výsledky jsou prezentovány pomocí průměrů a standardních odchylek (sloupce; $n = 6$).