

Studium degradace biogenních aminů

Mgr. Irena Butor, Ph.D.

Teze disertační práce

Teze disertační práce

Studium degradace biogenních aminů

Study of the biogenic amines degradation

Autor: Mgr. Irena Butor, Ph.D.

Studijní program: Chemie a technologie potravin (P2901)

Studijní obor: Technologie potravin (2901V013)

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

Oponenti: prof. Ing. Miroslava Kačániová, PhD.
prof. Ing. Eva Vlková, Ph.D.
doc. Ing. Mária Greifová, PhD.

Zlín, září 2023

© Irena Butor

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

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

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

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

ISBN 978-80-7678-188-7

ABSTRAKT

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

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

ABSTRACT

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

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

OBSAH

ABSTRAKT	3
ABSTRACT	4
1. SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	7
1. 1. KLINICKÉ ASPEKTY A TOXIKOLOGIE	8
1. 2. VÝSKYT BIOGENNÍCH AMINŮ V POTRAVINÁCH	9
1. 3. MOŽNOSTI SNÍŽENÍ BIOGENNÍCH AMINŮ V POTRAVINÁCH	10
1. 3. 1. Změna pH.....	10
1. 3. 2. Změna koncentrace NaCl.....	11
1. 3. 3. Změna teploty	11
1. 3. 4. Změna tlaku	11
1. 3. 5. Vliv ionizujícího záření	12
1. 3. 7. Použití startérových kultur.....	12
1. 4. DETEKCE A KVANTIFIKACE BIOGENNÍCH AMINŮ	13
1. 5. MIKROORGANISMY DEGRADUJÍCÍ BIOGENNÍ AMINY	14
2. CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE	17
3. MATERIÁL A METODIKA	18
3. 1. POUŽITÉ MIKROORGANIZMY	18
3. 2. ZVOLENÁ METODIKA A POSTUP ZPRACOVÁNÍ.....	18
3. 2. 1. Skrínig a izolace.....	18
3. 2. 2. Metoda hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF	19
3. 2. 3. Sekvenování kmenů schopných degradovat biogenní aminy	19
3. 2. 4. Sledování kinetiky degradace biogenních aminů	20
3. 2. 5. Detekce biogenních aminů metodou HPLC	21
3. 2. 6. Statistické metody	21
4. VÝSLEDKY	22
4. 1. EXPERIMENT I – SKRÍNING MIKROORGANISMŮ NA SCHOPNOST DEGRADACE BIOGENNÍCH AMINŮ	22
4. 1. 1. Identifikace pomocí MALDI-TOF	22
4. 1. 2. Identifikace pomocí sekvenace genu pro 16S rRNA.....	22
4. 2. EXPERIMENT II – MÍRA DEGRADACE BIOGENNÍCH AMINŮ.....	23
4. 3. EXPERIMENT III – DEGRADACE BIOGENNÍCH AMINŮ KMENEM <i>BACILLUS SUBTILIS</i> IB23 V ZÁVISLOSTI NA VNĚJŠÍCH PODMÍNKÁCH	24
4. 4. EXPERIMENT IV – SROVNÁNÍ DEGRADACE BIOGENNÍCH AMINŮ KMENY <i>BACILLUS SUBTILIS</i> IB23 A <i>BACILLUS PUMILUS</i> IB26 V ZÁVISLOSTI NA VNĚJŠÍCH PODMÍNKÁCH.....	26
4. 4. 1. Kinetika degradace biogenních aminů kmenem <i>Bacillus subtilis</i> IB23	27

4. 4. 2. Kinetika degradace biogenních aminů kmenem <i>Bacillus pumilus</i> IB26	29
5. SOUHRNNÁ DISKUZE	32
6. ZÁVĚR	39
7. PŘÍNOS PRO VĚDU A PRAXI.....	41
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	42
SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	52
SEZNAM TABULEK A OBRÁZKŮ	53
CURRICULUM VITAE	54
SEZNAM PUBLIKACÍ	55

1. SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

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

Biogenní aminy jsou syntetizovány a degradovány během normálního metabolismu živočichů, rostlin a mikroorganismů. Vznikají především dekarboxylací jednotlivých AMK nebo aminací a transaminací aldehydů a ketonů. Biogenní aminy hrají důležitou roli v mnoha lidských fyziologických funkcích, jako je mozková aktivita, sekrece žaludeční kyseliny, imunitní reakce (Shalaby, 1996) či buněčný růst a diferenciace (Ladero et al., 2010). Díky činnosti mikroorganismů a jejich metabolické aktivitě se mohou BA ve vysokých koncentracích akumulovat v potravinách. Zvýšená hladina BA může ukazovat na kažení zejména nefermentovaných potravin a jejich přítomnost tak může sloužit jako indikátor kvality a čerstvosti daných potravin (Gardini et al., 2016; Durak-Dados et al., 2020; Dabadé et al., 2021). Nadměrný perorální příjem BA může způsobit zdravotní potíže. Možné zdravotní komplikace se týkají především citlivých jedinců, jejichž detoxikační systémy pracují méně dobře (Bodmer et al., 1999). U těchto jedinců jsou příčinou genetická alterace, alergie, nadměrný příjem alkoholu a/nebo užívání některých druhů antidepresiv (Alvarez a Moreno-Arribas, 2014; Jairath et al., 2015), jako jsou inhibitory monoaminoxidázy (Hernandez-Jover et al., 1997; Yongmei et al., 2009), léků používaných pro léčbu Alzheimerovy a Parkinsonovy choroby, případně léků proti bolesti (Mohedano et al., 2015). Vzhledem k možným nepříznivým účinkům BA na lidské zdraví, je potřeba zabránit jejich hromadění v potravinách (EFSA, 2011).

Potraviny, které mohou často obsahovat vysoké hladiny BA, jsou ryby, výrobky z ryb a fermentované produkty (ten Brink et al., 1990; Halász et al., 1994; Linares et al., 2011; Fusek et al., 2020). Jednou z nejčastějších fermentovaných potravin spojených s otravou BA jsou sýry. Pro označení intoxikace tyraminem se dokonce používá termín „cheese reaction“ (ten Brink et al., 1990). V sýru byly také zaznamenány koncentrace BA vyšší než 1 g/kg, a to nejčastěji zvýšené koncentrace tyraminu a histaminu. Tyto aminy se zároveň vyskytují nejhojněji ze všech BA (Stratton et al., 1991; Fernández et al., 2007a), podle stanoviska EFSA se současně jedná o nejvíce toxické BA. Jejich toxicita může být pak dále umocňována přítomností jiných BA (EFSA, 2011), nejčastěji kadaverinem a putrescinem (Ladero et al., 2010). Pro snížení produkce a následné akumulace

BA v potravinách byly navrženy různé strategie, jako je například inhibice bakterií produkujících BA (např. přidavkem siřičitanu do vína), snížení viability producentů BA, např. pomocí pasterizace mléka, které má být použito při výrobě sýrů, snížení proteolytické aktivity (tedy snížení dostupnosti aminokyselinových prekurzorů biogenních aminů) atd. Dalším z možných způsobů, jak snížit obsah BA v potravinách, je jejich přímé odstranění ze suroviny pomocí mikroorganismů. Je známo, že například někteří zástupci rodů *Brevibacterium*, *Lactobacillus* a dalších mléčných tyčinek, *Pediococcus* a *Micrococcus* jsou schopni BA degradovat a snížit tak jejich koncentraci v potravinách (Herrero-Fresno et al., 2012).

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

1. 1. Klinické aspekty a toxikologie

Biogenní aminy jsou přírodní antinutriční faktory a jsou důležité z hygienického a toxikologického hlediska, neboť jsou identifikovány jako původci řady otrav jídlem a jsou také schopny iniciovat různé farmakologické reakce. Histamin, putrescin, kadaverin, tyramin, tryptamin, β -fenylethylamin, spermin a spermidin jsou považovány za nejdůležitější biogenní aminy vyskytující se v potravinách. Tyto aminy jsou označeny jako biogenní, protože jsou vytvořeny působením živých organismů (Shalaby, 1996). Vztah mezi úrovní BA a otravami jídlem byl široce studován a bylo zjištěno, že intoxikace histaminem a tyraminem jsou dvěma nejčastěji hlášenými potravinovými intoxikacemi (EFSA, 2011). Lidé běžně konzumují potraviny s určitým množstvím BA, tyto jsou detoxikovány ve střevní sliznici enzymatickými reakcemi (oxidázami). Při nadměrném perorálním příjmu BA může zvýšená koncentrace těchto látek vyvolat v organismu řadu nežádoucích účinků, jako jsou nevolnost, střevní problémy, alergie, bolest hlavy, vyrážku a změny krevního tlaku (Ladero et al., 2010). Výjimečně může nastat hypertenze, způsobující nevratné poškození srdce nebo centrálního nervového systému (Alvarez, Moreno-Arribas, 2014). V mnohých případech potravinových otrav je jako původce označován právě histamin, zatímco tyramin a β -fenylethylamin byly označeny jako iniciátory hypertenzní krize. Histamin, tryptamin, β -fenylethylamin a tyramin mají významné fyziologické účinky na člověka, obvykle buď psychoaktivní nebo vazoaktivní. Psychoaktivní aminy ovlivňují nervový systém působením na neurotransmitery, zatímco vazoaktivní aminy působí na vaskulární systém (Lovenberg, 1973).

Konzumace potravin obsahujících biogenní aminy zodpovídá za mnoho fyziologických efektů, které mohou vést k několika typům alimentárních

onemocnění, včetně otravy histaminem a tyraminem. Toxické působení BA na organismus bylo zaznamenáno i u kuřat, kde byla popsána výrazná ztráta hmotnosti, u těžkých intoxikací byla hlášena i zvýšená mortalita. Škodlivé účinky vyplývající ze zvýšené konzumace potravin bohatých na biogenní aminy lze očekávat pouze tehdy, když jsou tyto látky schopny dostat se do krevního řečiště (Joosten, 1988). Biogenní aminy byly také studovány jako karcinogenní prekurzory (Shalaby, 1996).

1. 2. Výskyt biogenních aminů v potravinách

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

Obsah BA v různých potravinách a krmivech byl studován mnoha vědci a bylo již zmíněno, že jejich nejčastější výskyt byl pozorován u sýrů, ryb (např. sardinky, ančovičky a sledi), masných výrobků, dále byla přítomnost těchto látek zaznamenána u vajec, ovoce, zeleniny (Ramos et al., 2009; Figueiredo et al., 2013; Vasconcelos et al., 2021) a hub (Kalač a Křížek, 1997; Dadáková et al., 2009b). Fermentované potraviny jsou náchylnější k vyššímu obsahu BA. Fermentace je přirozená metoda používaná k výrobě potravin s jedinečnými organoleptickými vlastnostmi, jako jsou barva, chuť a konzistence, které spotřebitelé preferují. Navzdory výhodám tohoto způsobu zpracování potravin může vést fermentace k tvorbě toxických látek, mezi které patří BA. Fermentace je založena na aktivitě mikroorganismů, kdy jsou BA produkovány několika kvasinkovými a bakteriálními kmeny, z nichž nejvýznamnější jsou BMK (bakterie mléčného kvašení). Velká část této skupiny bakterií je dekarboxyláza pozitivní, což znamená, že mají schopnost transformovat aminokyseliny na BA (Świder et al., 2020). U potravin nebo jejich částí, které prošly fermentačním procesem, nebo byly vystaveny mikrobiální kontaminaci během technologického procesu výroby nebo skladování, je pravděpodobné, že obsahují biogenní aminy. BA mohou být obsaženy také v alkoholických nápojích, jako jsou pivo a víno, ale i v dalších fermentovaných potravinách, jako je např. kysané zelí a výrobky ze sójových bobů. U čerstvých a fermentovaných produktů a u produktů živočišného a rostlinného původu jsou nalezené BA a také jejich koncentrace různé. Tyto odchylky lze odůvodnit typem zpracování, dostupností a typem aminokyselin přítomných v potravine, podmínkami a dobou a teplotou skladování, typem balení a přítomností pozitivních dekarboxylázových

mikroorganismů. Vysoké koncentrace BA byly prokázány také u různých druhů ovoce a zeleniny. BA byly proto dříve považovány za endogenní látky rostlinného původu. BA jsou vytvářeny v potravinách v důsledku mikrobiální činnosti v průběhu jejich stárnutí a skladování (Shalaby, 1996).

Existuje několik faktorů, které mohou omezit akumulaci biogenních aminů v těchto potravinách, např. dostupnost substrátu, hodnota pH, koncentrace soli a teplota mají omezující účinky na hromadění biogenních aminů, respektive na přítomnost mikroorganismů a jejich schopnost přežívání a následného rozmnožování v daném substrátu. Koncentrace biogenních aminů se značně mění nejen u různých druhů potravin, ale v rámci různého zpracování a skladování stejných druhů potravin (Shalaby, 1996). BA jsou přítomny ve fermentovaných produktech (např. sýr 5-4500 mg/kg, víno 5-130 mg/l, pivo 2,8-13 mg/l, kysané zelí 110-300 mg/kg) a v nesprávně uchovávaných potravinách (ryby 2400-5000 mg/kg, hovězí játra cca 340 mg/kg, hotová masa 10-700 mg/kg). Také mnohé zkažené potraviny jsou obvykle bohaté na BA, nejčastěji obsahují vysoké hladiny putrescinu a kadaverinu (Károvičová a Kohajdová, 2005).

1. 3. Možnosti snížení obsahu biogenních aminů v potravinách

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

1. 3. 1. Změna pH

Hodnoty pH prostředí jsou důležitými faktory, které ovlivňují aktivitu bakteriálních dekarboxyláz (Linares et al., 2011). Aktivita dekarboxyláz bývá vyšší spolu s vyšší aciditou prostředí. pH optimum je v takových případech mezi 4 až 5,5 (Halász et al., 2002). Pohyb v takovém prostředí bakterie stimuluje k vyšší tvorbě dekarboxyláz, které produkují jako součást svých obranných mechanismů proti kyselému prostředí (Majjala et al., 1993). Na druhou stranu výrazné snížení či zvýšení pH inhibuje růst mikroorganismů, a tedy zamezuje tvorbě BA působením jejich dekarboxylačních enzymů (Bover-Cid et al., 2008; Fernández et al., 2007a).

1. 3. 2. Změna koncentrace NaCl

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

1. 3. 3. Změna teploty

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

1. 3. 4. Změna tlaku

Vysoký tlak (HHP, high hydrostatic pressure) je netermický způsob konzervace některých potravin, který poškozují buněčné membrány mikroorganismů, což vede k jejich inaktivaci nebo na ně má subletální účinky (Rivas et al., 2008). Vysoký tlak je užitečná metoda pro rozrušení buněk, která mění propustnost buněčné membrány. Tento stav způsobuje snížení možnosti střetu s volnými AMK a díky denaturaci membránových proteinů způsobuje poškození nebo smrt buňky (Lanciotti et al., 2007). Prostřednictvím inaktivace mikroorganismů HHP prodlužuje životnost potravin při zachování původní chuti a vlastností (Patterson, 2005). Jedná se o relativně nový způsob ošetření potravin, u kterých zvýšení či snížení teploty mění jejich organoleptické vlastnosti (Ercan et al., 2013). Ošetření potravin HPP je běžné např. v USA,

Japonsku a Španělsku (Patterson 2005). Je-li HHP aplikován na výchozí suroviny nebo konečné produkty fermentace, snížení počtu bakterií může inhibovat tvorbu BA. Např. při aplikaci HPP (200 MPa) na syrovou masovou hmotu pro výrobu fermentovaných masných výrobků byl inhibován růst enterobakterií a současně oddaloval akumulaci putrescinu a kadaverinu (Latorre-Moratalla et al., 2007). Inhibice tvorby biogenních aminů, závisí na úrovni použitého tlaku (Novella-Rodriguez et al., 2002).

1. 3. 5. Vliv ionizujícího záření

Ozařování potravin se v mnoha zemích používá pro účely inhibice klíčení, znehodnocení potravin hmyzem a parazity, oddálení fyziologického zrání, prodloužení trvanlivosti nebo zlepšení technologických vlastností potravin (Loaharanu, 1989; Radomyski et al., 1994; Thayer, 1994). Ozařování je účinné při redukci počtu životaschopných mikroorganismů a virů a je známé jako dobrá metoda pro inaktivaci patogenů v potravinářských materiálech. Kromě sanitárních účelů se technologie ozařování používá také ke snížení obsahu karcinogenních nitrosaminů a dusitanů v masných výrobcích (Ahn et al., 2002). Ahn, et al. (2002) uvádí, že ozáření může vyvolat radiolýzu karcinogenních N-nitrosaminů ve vodném modelovém systému a je účinné i pro snížení obsahu N-nitrosaminů v masných výrobcích. Všechny potraviny obsahující vodu pravděpodobně procházejí během ozařování jak oxidačními, tak redukčními reakcemi, protože radiolytické produkty vody, zejména hydroxylový radikál, jsou silná oxidační činidla a vodný elektron nebo atom vodíku je redukčním činidlem (Brewer, 2009). Ozařování jako způsob prodloužení trvanlivosti a zajištění bezpečnosti potravin bylo zavedeno v roce 1950 (Mbarki et al., 2009), zároveň se tak vyskytla možnost snížení používání chemických konzervačních látek (Loaharanu, 1989; Radomyski et al., 1994). Ozařování může snížit hodnoty BA v potravinách dvěma způsoby – přímou radiolýzou aminů v potravinách (Mbarki et al., 2009) nebo snížením počtu bakterií, které BA produkují (Kim et al., 2003). V modelovém systému byla prokázána radiolytická degradace biogenních aminů. Histamin, kadaverin, putrescin, spermidin, spermin, tryptamin, tyramin a agmatin byly rozpuštěny v destilované vodě v koncentraci 100 mg/kg a následně ozářeny 2,5; 5; 10; 20 a 25 kGy. Degradace byla pozorována v rozmezí 5 až 100 %, průměrně však bylo pozorováno 95% snížení všech BA při 20 kGy (Kim et al., 2004).

1. 3. 6. Použití startérových kultur

Startérové kultury jsou čisté nebo smíšené prospěšné mikroorganismy používané ve fermentovaných potravinářských výrobcích. Aplikace startérových kultur s aminoxidázovou aktivitou je důležitá kvůli inhibici tvorby biogenních aminů (Karovičová a Kohajdová, 2005). Bylo pozorováno, že rychlé snížení pH pomocí amin negativních startérových kultur může do značné míry zabránit

akumulaci biogenních aminů ve fermentovaných potravinách. Použití amin negativních startérů, jako je *Lactilactobacillus sakei* (dříve *Lactobacillus sakei*) nebo *Pediococcus pentosaceus*, by mohlo zabránit tvorbě biogenních aminů ve fermentovaných masných výrobcích (Maijala et al., 1995). Také startérové kultury schopné nutričně konkurovat nstartérovým mikroorganismům, zejména během procesu dozrávání a po celou dobu skladování, mohou dále zabránit nadměrné produkci biogenních aminů (Stadnik a Dolatowski, 2010).

1. 4. Detekce a kvantifikace biogenních aminů

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

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

Pro separaci a kvantifikaci biogenních aminů byla vyvinuta řada HPLC technik. Většina metod vyžaduje derivatizaci aminů před detekcí pomocí UV-VIS absorpce nebo fluorescence (Ordóñez et al., 2016; Ahmad et al., 2020). Pro derivatizaci jsou používána různá chemická činidla, zejména dansylchlorid, dabsylchlorid a o-ftaldehyd (OPA) s předkolonovou, kolonovou nebo postkolonovou derivatizací. Nedávno vyvinuté metody ultra-HPLC (U-HPLC) zvyšují rychlost, rozlišení a citlivost použitím částic menších než 2 μm , kratších kolon a vyšších průtoků. Rychlá metoda U-HPLC spojená s on-line OPA postkolonovou derivatizací a fluorescenční detekcí umožnila stanovení 12 biogenních aminů v sýru za méně než 7 minut chromatografické eluce. U různých druhů sýrů U-HPLC s předkolonovou derivatizací s 6-aminochinolyl-N-hydroxy-sukcinmydilkarbamátem (AQC) oddělila 20 primárních a sekundárních biogenních aminů během 9 minut, zatímco pro HPLC separaci

bylo zapotřebí 24 minut (Mayer et al., 2010; Nuñez a Medina, 2011). Autoři uvádějí limity detekce od 0,4 do 16,2 mg/kg a limity kvantifikace mezi 1,6 a 60,9 mg/kg. Byla vyvinuta také rychlá metoda nukleární magnetické rezonance s limitem detekce 0,6-1 mg/kg pro histamin (Schievano et al., 2009).

Molekulárně-biologické metody pro časnou a rychlou detekci bakterií produkujících BA se stávají alternativou k tradičním kultivačním metodám. Metody PCR zacílené na geny kódující dekarboxylační enzymy jsou rychlé a citlivé a umožňují identifikaci mikroorganismů produkujících BA v potravinách ještě před tím, než je sloučenina produkována. Multiplex PCR testy byly vyvinuty pro detekci potenciálních producentů histaminu, tyraminu, putrescinu a kadaverinu širokou škálou Gram-pozitivních a Gram-negativních bakterií (Fernandez et al., 2006).

Enzymatické metody jsou ve stanovení BA stejně důležité jako metody chromatografické a molekulárně-biologické. ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) je založena na vazbě specifického antigenu na protilátku. Tato reakce je detekována změnou barvy za použití vázaného enzymu konjugovaného se substrátem (Nuñez a Medina, 2011). Enzymatické imunotesty slouží k identifikaci a stanovení koncentrace různých látek v biologických tekutinách. Použití reakcí antigen-protilátka činí tuto metodu selektivní, protože je specifická pro každou molekulu, konkrétně proteiny, hormony, vitaminy nebo léky (Aydin, 2015). Metody založené na ELISA již byly aplikovány i u stanovení BA jako slibná méně časově náročná a snadnější analytická technika (Sadeghi et al., 2019).

1. 5. Mikroorganismy degradující biogenní aminy

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

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

z nejslibnějších biotechnologických strategií prevence hromadění BA v hotových potravinách. Takový způsob ošetření surovin způsobuje minimální nebo žádné změny organoleptických vlastností výsledné potraviny.

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

O pár let později byla zkoumána schopnost čtyř kmenů *Lb. sakei* degradovat histamin v modelovém systému, tyto kmeny byly izolovány z přirozeně fermentované rybí paštiky. Autoři došli k závěru, že použitím tohoto kmene pro výrobky z ryb by mohli úspěšně snížit riziko zvýšené koncentrace tohoto aminu (Dapkevicius et al., 2000). Ve studiích prováděných na rybách a fermentovaných masných výrobcích (suchých klobásách) byla zjištěna přítomnost určitých bakteriálních kmenů, které byly schopny snižovat obsah BA, i když přesný mechanismus, díky kterému k bakteriální degradaci BA dochází, není dosud znám (Dapkevicius et al., 2000; Fadda et al., 2001; Gardini et al., 2002). García-Ruiz et al. (2011) ve své studii sledovali skupinu BMK asociovaných s výrobou vína. Studovali jejich schopnost rozkládat BA a bylo ověřeno, že jeden kmen *Lb. casei*, *Lentilactobacillus hilgardii* (dříve *Lactobacillus hilgardii*), *Pediococcus parvulus*, *Oenococcus oeni*, dva kmeny *L. plantarum* a tři kmeny *Pediococcus pentosaceus* významně snižují koncentraci histaminu, tyraminu a putrescinu v kultivačním médiu. Dále bylo ověřeno, že jsou tyto kmeny schopny růstu ve vínu podobném médiu a vykazují užitečnou schopnost rozkládat kyselinu jablečnou. U druhů *Penicillium citrinum*, *Alternaria* sp., *Phoma* sp., *Ulocladium chartaruma*, *Epicoccum nigrum* bylo zjištěno, že vykazují nejvyšší kapacitu pro degradaci BA (Alvarez a Moreno-Arribas, 2014). Společně tato zjištění ukazují, že přídavek degradujících mikrobiálních kmenů schopných snížit obsah BA může být použit při výrobě sýrů a dalších fermentovaných potravin (Herrero-Fresno et al., 2012). Mezi takové mikroorganismy patří např. BMK *Companilactobacillus farciminis* (dříve *Lactobacillus farciminis*), *Lactiplantibacillus plantarum* nebo *Pediococcus acidilactici* (Lee et al., 2021). Vzorky z různých sýrů byly testovány na přítomnost BA-degradujících bakterií mléčného kvašení a bylo zachyceno 17 izolátů, které byly schopny rozkládat tyramin a histamin, tyto kmeny byly identifikovány pomocí sekvenování genu pro16S rRNA (Herrero-Fresno et al., 2012).

Některé kmeny *Bacillus amyloliquefaciens* a *Staphylococcus carnosus* schopné rozkládat histamin a *Staphylococcus intermedius* a *Bacillus subtilis* degradující putrescin a kadaverin byly izolovány z malajské rybí omáčky (Tepkasikul et al., 2023; Zaman et al., 2014). Bylo také zjištěno, že *B. amyloliquefaciens* a *S. carnosus* jsou schopné snížit hladiny histaminu v rybí omáčce v průběhu fermentace (Zaman et al., 2011). Martuscelli et al. (2000) ve své práci uvádějí, že některé kmeny jiných druhů rodu *Staphylococcus*, např. *Staphylococcus xylosus*, izolované z italských fermentovaných salámů, jsou schopny degradovat histamin. Použití jednoho z těchto kmenů jako startérové kultury u sušených klobás mírně snížilo obsah BA (Gardini et al., 2002). Studie také ukázaly, že hladiny histaminu jsou významně sníženy, když se do fermentovaných masných výrobků přidá směs startérových kultur (*Lacticaseibacillus casei* a *Staphylococcus xylosus*). Použití *L. casei* jako startérové kultury může vyvolat rychlé okyselení, inhibovat růst mikrobů a poškodit buněčnou membránu, což má za následek snížení aktivity mikrobiální dekarboxylace a tím snížení tvorby biogenních aminů (Zeng et al., 2021). Kmeny *Lacticaseibacillus casei* a *Lb. plantarum* izolované z fermentovaných masných výrobků vyráběných v Argentině byly schopny snížit hladiny tyraminu, i když s různou účinností (Fadda et al., 2001). Qiang a Zhenjiang (2021) testovali pět kmenů bakterií BMK s vysokou účinností degradace BA, mezi nimiž měl nejlepší schopnost odbourávat biogenní aminy kmen *Lactiplantibacillus plantarum* 30. *L. plantarum* 30 byl schopen redukovat histamin o 74 % a tyramin o 90 %. Tento kmen dobře rostl v prostředí s obsahem soli 0-9 % a při pH 4,5-8,5. Daný kmen nevykazoval žádnou dekarboxylační aktivitu, proto se jeví jako ideální startérová kultura (Zeng et al., 2021). Některé kmeny *Kocuria varians* (dříve *Micrococcus varians*) jsou také schopny rozkládat tyramin, ale zároveň jsou označovány jako producenti tyraminu a/nebo histaminu. Kmeny *Lb. casei* izolované z různých zdrojů byly také schopny degradovat BA. Je pozoruhodné, že klidové buňky jednoho kmene *Lb. casei* byly schopny degradovat 98 hmotnostních procent 2,5 mM roztoku tyraminu za 96 hodin. Naočkování kmene *Lb. casei* z komerčního preparátu může snížit koncentraci BA v různých rostlinných silážích (Nishino et al., 2007), i když autoři tvrdí, že se zde může jednat o specifický antagonismus *Lb. casei* proti BA-produkujícím mikroorganismům.

Použití bakterií s aminoxidační aktivitou, popř. oxidačních enzymů bylo popsáno v několika studiích. Naila et al. (2012) studovali míru degradace histaminu diaminoxidázou v modelovém (pufr) a skutečném systému (tuňáková polévka z rybí pasty). Pomocí enzymu diaminoxidázy byli schopni redukovat obsah histaminu v obou systémech z 500 mg/l na nedetekovatelné hladiny (<0,5 mg/kg). Bylo také zjištěno, že histamin může být degradován při vysokých koncentracích soli (12 %) a pH 6,7, ale také se v tomto stavu mohou lišit požadované organoleptické vlastnosti produktu.

2. CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE

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

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

3. MATERIÁL A METODIKA

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

3. 1. Použité mikroorganismy

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

Bacillus altitudinis IB84, *Bacillus pumilus* IB26, *Bacillus safensis* IB731, *Bacillus subtilis* IB23, *Acinetobacter pittii* IB5, *Micrococcus luteus* IB16, *Enterobacter cloacae* IB62, *Serratia marcescens* IB11, *Pseudomonas koreensis* IB431, *Pseudomonas fulva* IB266, *Serratia ureilytica* IB1, *Agrobacterium radiobacter* (dříve *Agrobacterium tumefaciens*, *Rhizobium radiobacter*) IB102

3. 2. Zvolená metodika a postup zpracování

3. 2. 1. Skríníng a izolace

V experimentu I byl proveden skríníng mikroorganismů degradujících BA. Tento skríníng byl prováděn v 895 vzorcích potravin rostlinného i živočišného původu a nápojů (Tab. 1).

Tab. 1: Seznam potravin a nápojů, u nichž se prováděl skríníng na přítomnost mikroorganismů degradujících biogenní aminy

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

Ze získaných vzorků potravin bylo sterilně odebráno 5 g materiálu, který byl zředěn v poměru 1:9 ve sterilním fyziologickém roztoku a následně zhomogenizován ve stomacheru. Inokulum bylo následně připraveno vždy ve 3 opakováních. Do 5 ml tekutého minerálního média MM1 s přísávkem BA bylo zaočkováno 100 μ l testované suspenze dané potraviny. V případě nápojů

bylo do MM1 rovnou očkováno 100 μ l testovaného nápoje. Schopnost růstu v minerálním médiu byla srovnávána s kontrolním vzorkem, kde byla sledována schopnost růstu bakterií v MM1 bez přítomnosti BA. Tyto vzorky byly v dalším kroku kultivovány při teplotě 30 °C po dobu 24, 48, 72 hodin a jednoho týdne. V těchto časových intervalech byl sledován růst dané bakteriální kultury. Při pozitivním záchytu byla kultura následně přeočkována na tuhé MM1 s přídatkem BA a dále kultivována po dobu 24 a 48 hodin při 30 °C. Jednotlivé kolonie byly poté izolovány a identifikovány.

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

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

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

Další metodou identifikace vybraných izolovaných kmenů byla sekvenční analýza genu pro 16S rRNA. Před samotnou izolací DNA byly kultury nejdříve oživeny. Ze zásobních kultur byly provedeny křížové roztěry na NB agar, které byly následně kultivovány 24 hodin při 30 °C. Izolace DNA byla provedena odebráním jedné bakteriální kolonie a jejím resuspendováním v 50 μ l deionizované vody. Suspenze bakteriálních buněk byla povařena v termobloku po dobu 5 minut při teplotě 98 °C. Bakteriální lyzát byl centrifugován 3 minuty při 4500 RPM. Pro PCR bylo odebráno 1 μ l supernatantu. Metodologie této části práce vychází z publikací Christensen a Bisgaard, 2010; Simmon et al., 2006. Pro následnou amplifikaci byl použit forward primer 341F a reverse primer 907R, oba o koncentraci 0,4 μ mol/l (Zhao et al., 2008). PCR byla provedena pomocí G2 Hot Start Green Master Mix (ROCHE, Germany). Amplifikované produkty byly analyzovány na 1% (w/v) agarózovém gelu s přídatkem ethidiumbromidu. Analýza probíhala při 90 V, 400 mA po dobu 25 minut. Detekce produktů byla provedena pomocí UV transluminátoru. Pro následnou sekvenaci bylo 5 μ l amplifikované a purifikované DNA smícháno s 5 μ l primeru (5 μ M) 907R. Samotné sekvenování bylo prováděno externí firmou SEQme s.r.o. (SEQme,

Dobříš). Získané sekvence byly upraveny v programu GATC Viewer a výsledky sekvenování byly zpracovány a vyhodnoceny pomocí algoritmu BLAST. Tento algoritmus pro analýzu výsledků sekvenovaných genů využívá databázi MicroSeq, GenBank nebo SmartGeneIDN (Simmon et al., 2006).

3. 2. 5. Sledování kinetiky degradace biogenních aminů

Vliv vnějších podmínek na míru degradace biogenních aminů byl studován v rámci kultivace jednotlivých kmenů za různě definovaných podmínek a jejich kombinací. Kultivace vybraných kmenů probíhala aerobně i anaerobně v médiu o různých hodnotách pH (5,0; 6,0; 7,0; 8,0), různých koncentrací NaCl (0 %, 1 %, 2 %, 3 % w/v) a za různých teplot (8 °C, 10 °C, 23 °C a 30 °C).

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

Sledování všeobecné schopnosti degradace

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

Izolované zásobní kultury byly oživeny přenesením inokula do NB bujónu, kde byly kultivovány 24 hodin při 30 °C. Po nárůstu kultury bylo 100 μ l bakteriální suspenze zaočkováno do 5 ml MM1 s BA. Jako kontrola pro stanovení výchozího obsahu BA v bujónu sloužily 3 vzorky MM1 s BA, které nebyly zaočkovány MO a byly odebrány k analýze v čase, kdy byly ostatní zkumavky s bujónem zaočkovány. Takto připravené vzorky byly opět kultivovány 12 hod. při 30 °C. Po kultivaci byla živná média centrifugována (4500 RPM, 10 minut). Do mikrozkušavky bylo odebráno 650 μ l supernatantu a následně přidáno 650 μ l kyseliny chloristé v koncentraci 1,2 mol/l. Následující analýzy každého vzorku byly zhotoveny vždy ve 3 opakováních. Takto připravené vzorky byly zamrazeny a přichystány na derivatizaci. Stejným způsobem byly odebrány vzorky v časech 24, 36, 48 a 72 hod. u kmenů *Bacillus subtilis* IB23, *Bacillus pumilus* IB26, *Acinetobacter pittii* IB5, *Micrococcus luteus* IB16, *Enterobacter cloacae* IB62, *Bacillus safensis* IB731, *Bacillus altitudinis* IB84 *Agrobacterium radiobacter* IB102, *Serratia ureilytica* IB1, *Serratia marcescens* IB11, *Pseudomonas koreensis* IB431, *Klebsiella pneumoniae* IB148, *Pseudomonas fulva* IB266.

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

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

Pro práci s kmenem *B. subtilis* IB23 byly připraveny 4 varianty MM1 s BA, kdy bylo jeho pH postupně pomocí HCl a NaOH upraveno na 5,0; 6,0; 7,0 a 8,0 \pm 0,1. Do 5 ml takto připraveného média bylo zaočkováno 100 μ l 24 hod.

pomnožené kultury. Všechna zaočkovaná média o různých variantách pH byla kultivována aerobně i anaerobně při různých teplotách, pro které byly stanoveny odběrové časy v závislosti na kultivační teplotě.

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

3. 2. 6. Detekce biogenních aminů metodou HPLC

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

Derivatizace

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

Chromatografické stanovení biogenních aminů

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

3. 2. 7. Statistické metody

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

4. VÝSLEDKY

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

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

4. 1. 1. Identifikace pomocí MALDI-TOF

Izoláty pozitivní na degradaci BA byly identifikovány na Slovenské poľnohospodárskej univerzite v Nitře pomocí MALDI-TOF MS. Ze všech testovaných potravin bylo získáno 22 různých druhů mikroorganismů. 16 izolátů se zvolenou metodou nepodařilo identifikovat. Důvodem pro nemožnost identifikace mohla být směsná kultura mikroorganismů, jejich příliš nízká koncentrace nebo absence daného hmotnostního spektra v použitých knihovnách, které jsou dodavatelem sestavovány především k identifikaci klinických izolátů. Degradéři byli izolováni zejména z mléčných výrobků. Pro další experimenty byly vybrány právě izoláty z těchto potravin a jeden izolát nalezený v ovoci. Z množství identifikovaných mikroorganismů bylo pro další experimenty zvoleno 13 těch, které pro daný druh vykazovaly nejlepší identifikační skóre.

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

Identifikace 13 mikroorganismů, které byly vybrány pro další práci, byla ověřena pomocí PCR a následným sekvenováním části genu pro 16S rRNA firmou SEQme s.r.o. Identifikace všech izolátů vybraných na základě analýzy MALDI-TOF MS se shodovala s výsledky sekvenování PCR produktů na úrovni druhu. Kmeny zvolené pro další pokusy byly pomocí databáze GeneBank identifikovány jako *Acinetobacter pittii*, *Agrobacterium radiobacter*, *Bacillus*

altitudinis, *Bacillus pumilus*, *Bacillus safensis*, *Bacillus subtilis*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Micrococcus luteus*, *Pseudomonas koreensis*, *Pseudomonas fulva*, *Serratia marcescens*, *Serratia ureilytica*.

Kmeny *Bacillus subtilis* IB23 a *Bacillus pumilus* IB26 byly identifikovány se 100% shodou.

4. 2. Experiment II - Míra degradace biogenních aminů

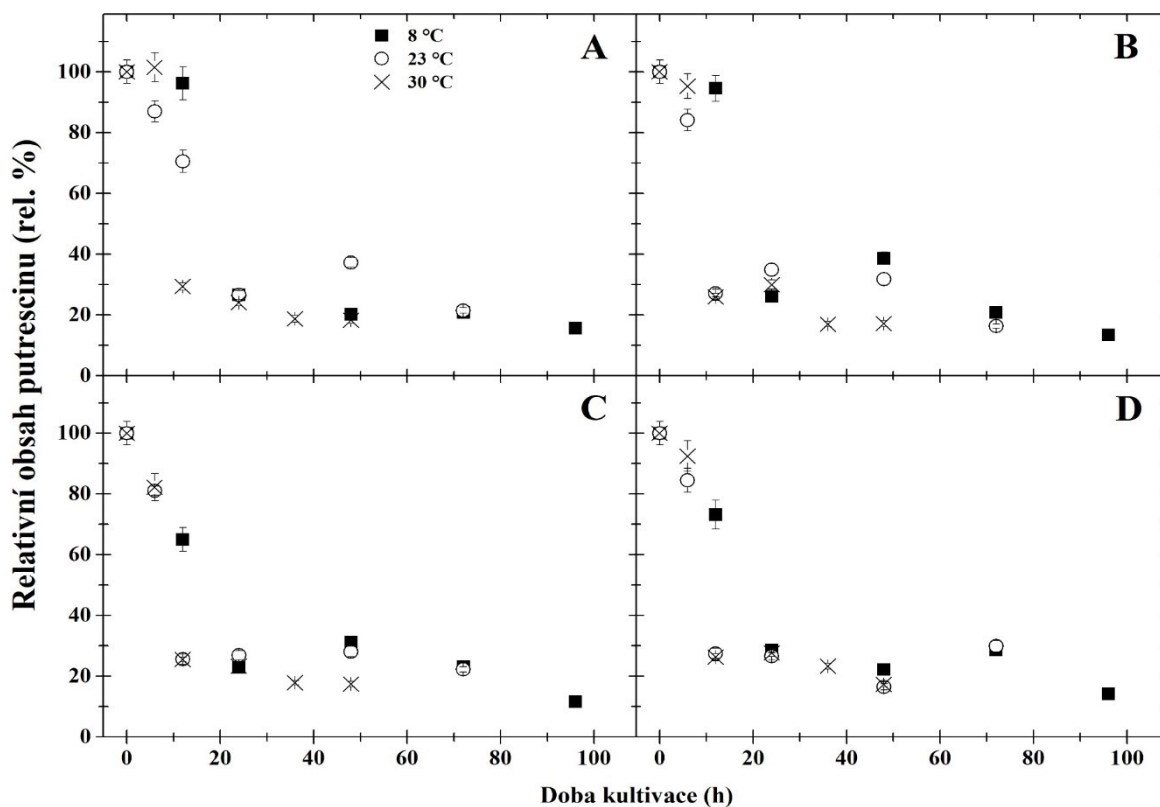
U kmenů získaných a identifikovaných v předchozím experimentu byl stanoven úbytek jednotlivých BA v časech 0-72 hodin. Pro tento pokus bylo vybráno 13 kmenů pozitivních na degradaci biogenních aminů. Průběh degradace v jednotlivých časech byl sledován pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie. Všechny zvolené kmeny byly schopny degradovat všechny testované BA aspoň o 8,5 % za 72 h. Kmen *Acinetobacter pitii* IB5 vykazoval po 72 hodinách nejnížší míru degradace u TRY, a to jen o 8,5 %, naopak byl schopen degradovat KAD o čtvrtinu. Podobnou schopnost degradace TRY vykazoval kmen *Agrobacterium radiobacter* IB102, který po 72 hodinách dokázal snížit jeho koncentraci o 9,65 %. Koncentrace TYM po 72 h kultivace klesla téměř o polovinu. Jednalo se o nejvyšší úbytek ze všech BA v tomto čase. Koncentrace všech BA degradovaných kmenem *Bacillus altitudinis* IB84 pozvolna klesala v rozmezí 13-36 %. Nejvyšší míru degradace vykazoval *B. altitudinis* u TRY. Stejně jako u dvou předchozích kmenů byl největší úbytek zaznamenán u TYM. Velice podobnou míru degradační aktivity jako *B. altitudinis* vykazoval v čase 72 h i *B. pumilus* IB26. Shodně degradoval TYM o 36 %. *Bacillus safensis* IB731 po 72 h kultivace dokázal nejvíce snížit hladinu PUT, a to téměř o polovinu, obdobně jako v předchozích měřeních degradoval nejméně TRY, v tomto případě však téměř o čtvrtinu. Vůbec nejvyšší snížení koncentrace BA byla zaznamenána u *B. subtilis* IB23. Tento kmen byl schopen výrazně snížit obsahy všech BA, nejméně byl po 72 h opět degradován TRY o 22,68 %, PEA o bezmála 35 %. Nejvyšší snížení koncentrace bylo pozorováno u PUT, kdy se po 72 h kultivace dostal k téměř nulovým hodnotám, podobně úspěšně byly degradovány i KAD a HIM o 92,4 resp. 97 %. Z námi zachycených degradérů se právě *B. subtilis* IB23 ukázal jako nejúspěšnější kmen. *Enterobacter cloacae* IB62 vykazoval po 72 h nejvyšší míru degradace u PUT o téměř 44 %, nejnížší podobně jako v předchozích případech u tryptaminu. Zde se jeho obsah za 72 h snížil o 15,46 %. Vysokou efektivitu degradace BA vykazovaly také kmeny *Klebsiella pneumoniae* IB148 a *Micrococcus luteus* IB16, kdy oba kmeny byly schopné po 72 h degradovat PUT o více než 90 % a TRY a PEA o více než 60 %, ale pouze o 9 % byla snížena koncentrace HIM kmenem *M. luteus* IB16. Oba testované kmeny *Pseudomonas* byly schopny snížit hladinu PUT o více než 90 %, o více než polovinu dokázaly snížit obsahy TRY, PEA i TYM. U obou kmenů byl po 72 h detekován nejnížší úbytek histaminu. Obdobně jako u kmenů *Pseudomonas* i u testovaných izolátů *Serratia* byl zaznamenán úbytek PUT o více než 90 %,

nejmenší snížení koncentrace u kmene *Serratia marcescens* IB11 po 72 h bylo detekováno u HIM a KAD shodně o necelých 34 %, u kmene *Serratia ureilytica* IB1 u HIM a PEA, kdy hladiny těchto aminů klesly 66 a 65 %.

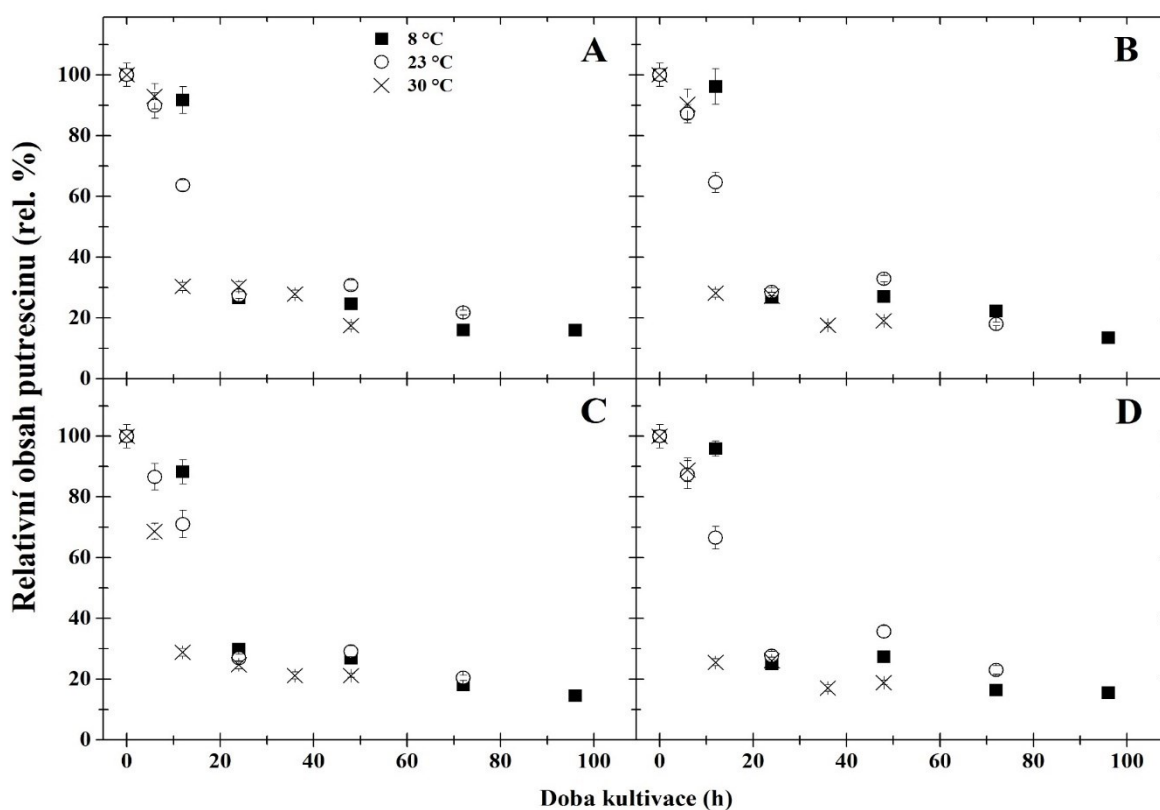
4. 3. Experiment III - Degradace biogenních aminů kmenem *Bacillus subtilis* IB23 v závislosti na vnějších podmínkách

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

Nejvíce ze všech testovaných BA byl po 96 h při kultivační teplotě 8 °C redukován obsah putrescinu, a to až na 12 % během kultivace v médiu o pH 7 (Obr. 1). Na rozdíl od kultivací v médiích o pH 7 a 8, kde bylo opět patrné výrazné snížení množství PUT již během prvních 12 h kultivace (pokles o 36 %), v kyselějším prostředí se koncentrace pohybovala na 95 % původního obsahu. Během dalších 12 h bylo pozorováno zrychlení rozkladu putrescinu, kdy se jeho koncentrace ve všech typech médií a za všech teplot pohybovala v rozmezí od 22 do 34 %. Během prvních 12 h kultivace byl PUT nejpomaleji rozkládán v médiu o pH 5 při teplotě 8 °C (pokles o 4 %) a 23 °C (pokles o 30 %). V AN prostředí byl pozorován opačný trend (Obr. 2), kdy byl během prvních 12 h kultivace putrescin při pH 5 a teplotě 23 °C degradován nejvíce. Při teplotě 30 °C byl PUT po 48 h degradován nejméně při pH 7 (na 21 %), nejvíce naopak při nejnižším testovaném pH, kdy byl degradován na 17 % původního obsahu.



Obr. 1: Degradace putrescinu kmenem *B. subtilis* IB23 v minerálním médiu za aerobních podmínek; A – pH 5, B – pH 6, C – pH 7, D – pH 8



Obr. 2: Degradace putrescinu kmenem *B. subtilis* IB23 v minerálním médiu za anaerobních podmínek; A – pH 5, B – pH 6, C – pH 7, D – pH 8

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

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

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

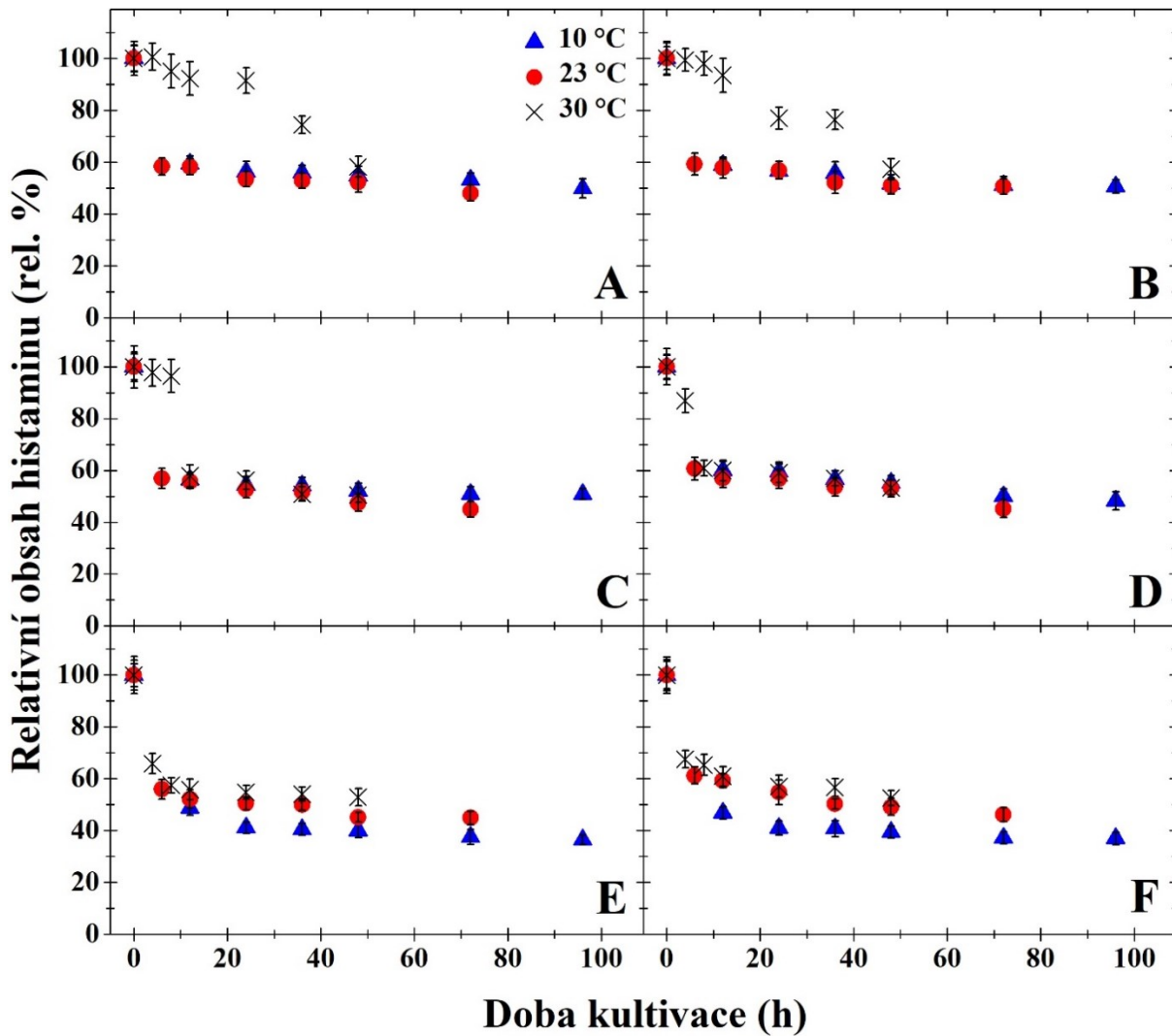
za aerobních a anaerobních podmínek v experimentu III byly oba kmeny kultivovány pouze aerobně.

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

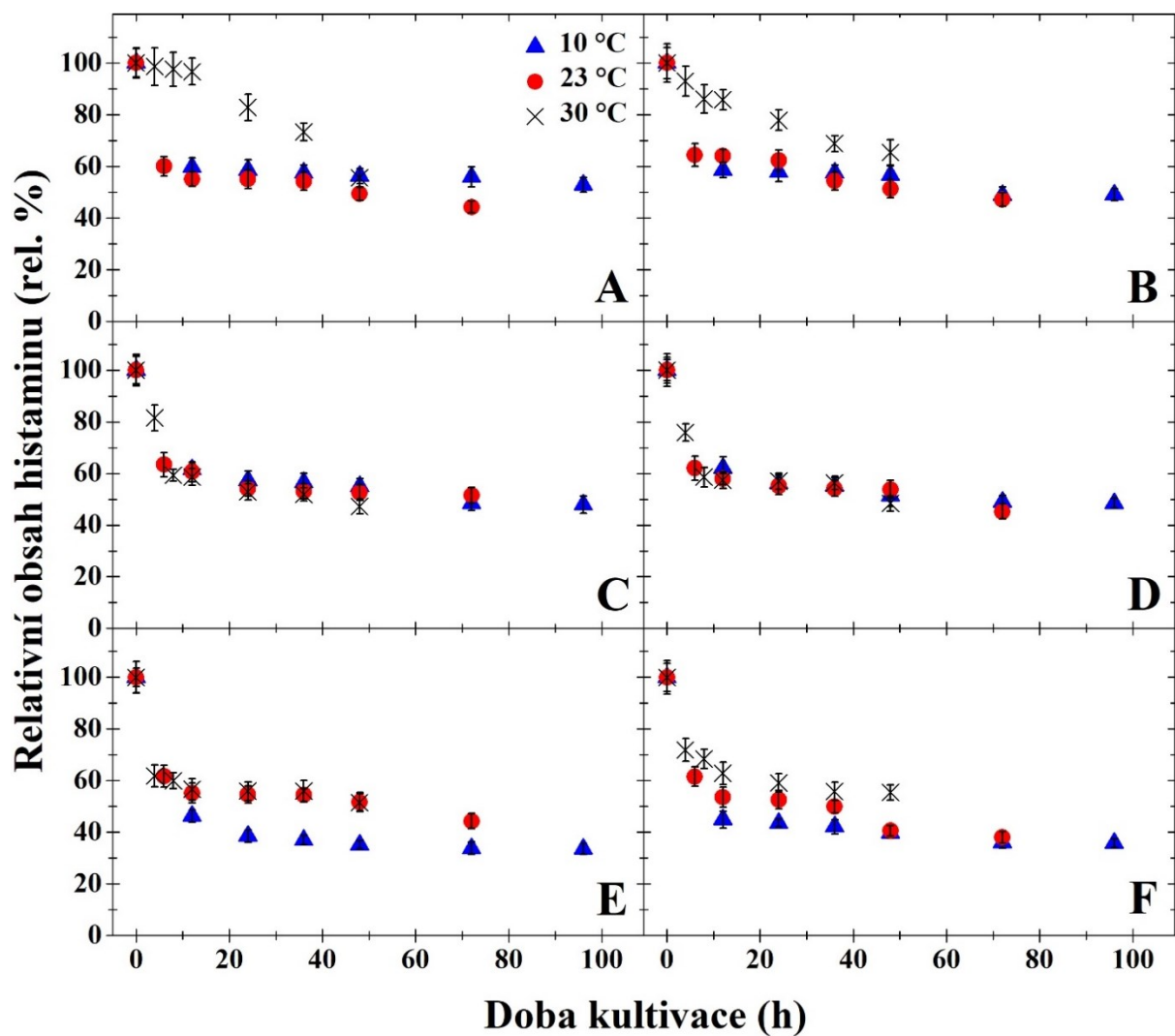
Kmen *B. subtilis* IB 23 byl schopen HIM degradovat nejvíce ze všech testovaných aminů, nejefektivněji v médiu o pH 8 při teplotě 10 °C. Výsledná koncentrace se napříč variantami médií ale příliš nelišila. Po 96 h kultivace byl výsledný obsah histaminu 39 % jak v médiu bez obsahu soli, tak v médiu obsahujícím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

V nutrient broth probíhala degradace bez přídavku soli nejefektivněji při 30 °C (Obr. 5). Během prvních 12 h klesaly hodnoty histaminu velice podobným tempem i při 23 °C a 10 °C. Po 96 h kultivace při 10 °C klesl obsah HIM o 41 % v médiu bez soli. Ve stejné variantě MM1 klesl obsah histaminu o 48 %. Nejnižší množství HIM bylo v dané variantě média zjištěno po 48 h při teplotě 30 °C, kdy se jeho obsah snížil o 40 %. V žádné z testovaných variant médií neklesl při teplotě 30 °C obsah histaminu během 48 h o více než 51 %, během 72 h při teplotě 23 °C o více než 62 % a během 96 h při teplotě 10 °C o více než 65 %. V NB s přídavkem soli klesala koncentrace HIM za prvních 24 h nejvíce během kultivace při 23 °C. I v případě nutričně bohatšího média měl přídavek soli vliv

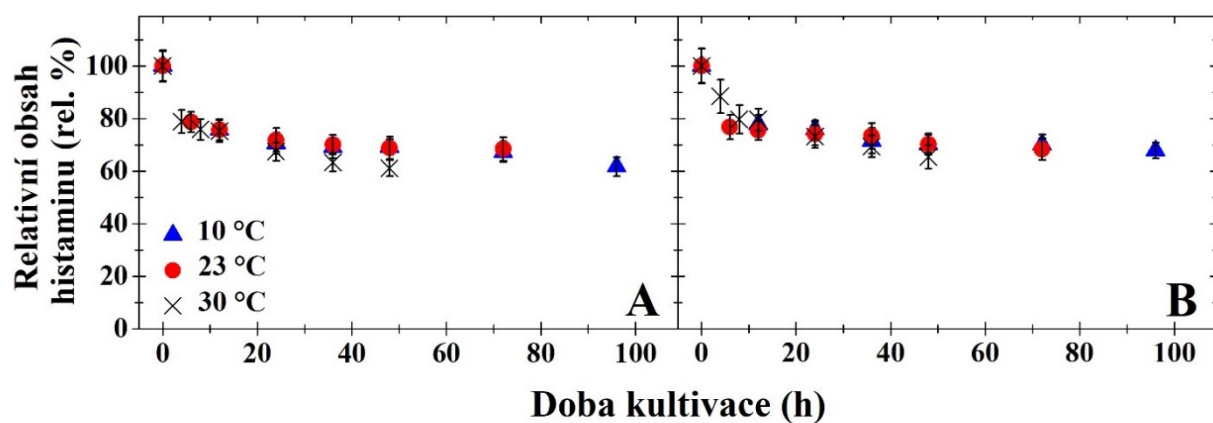
na průběh degradace. Po 96 h kultivace byl při 10 °C úbytek histaminu v médiu s 2 % NaCl o 6 % nižší než u varianty bez soli a o 15 % nižší než u stejné varianty v minerálním médiu. Výsledky degradace histaminu byly nejvíce ovlivněny různými hodnotami pH.



Obr. 3: Degradace histaminu kmenem *B. subtilis* IB23 v minerálním médiu bez přídavku soli a s 1 % NaCl; A, B – pH 5; C, D – pH 7; E, F – pH 8; A, C, E – 0 % NaCl; B, D, F – 1 % NaCl



Obr. 4: Degradace histaminu kmenem *B. subtilis* IB23 v minerálním médiu s 2 a 3 % NaCl; A, B – pH 5; C, D – pH 7; E, F – pH 8; A, C, E – 2 % NaCl; B, D, F – 3 % NaCl

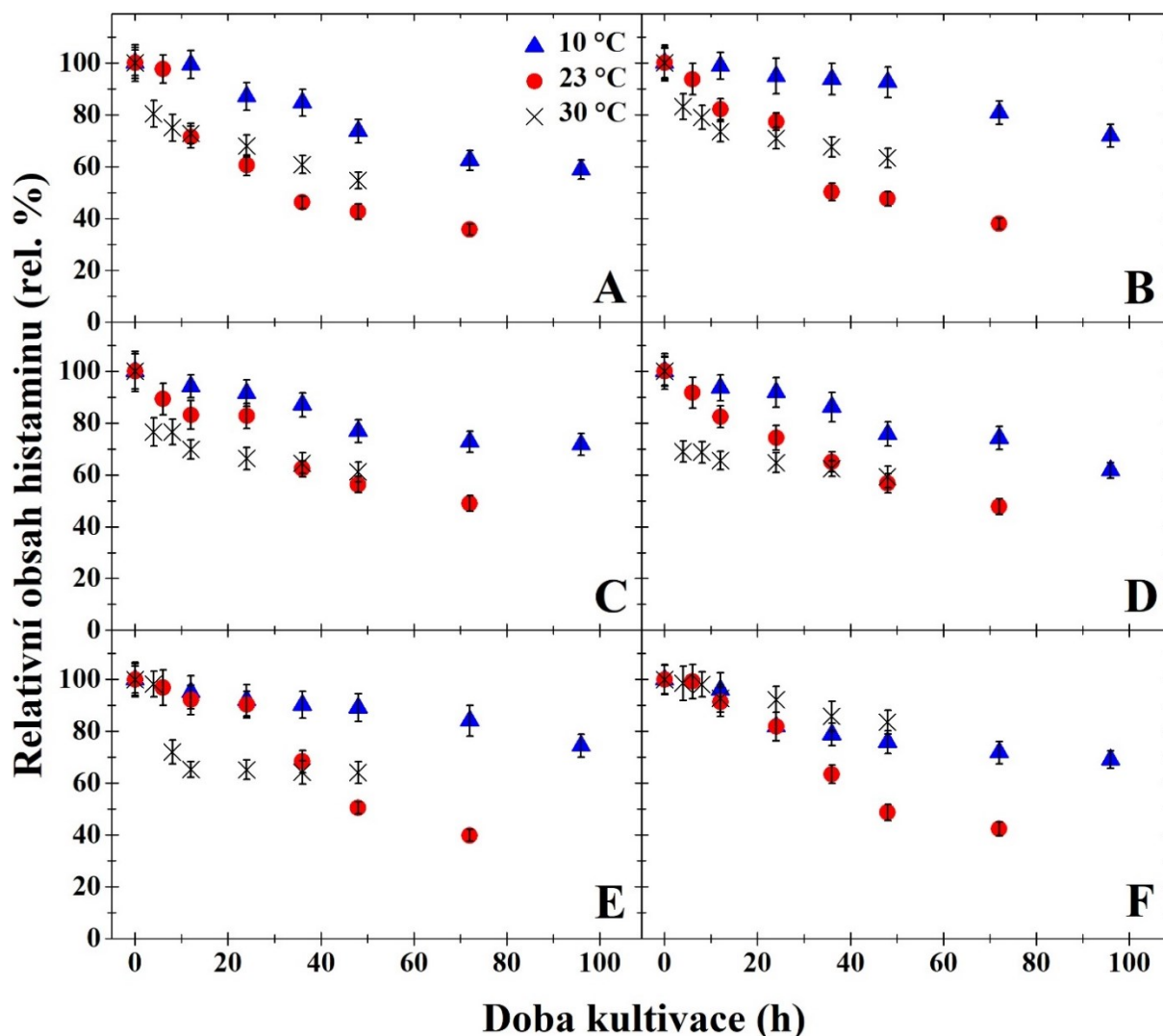


Obr. 5: Degradace histaminu kmenem *B. subtilis* IB23 v nutrient broth; A – 0 % NaCl, B – 2 % NaCl

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

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

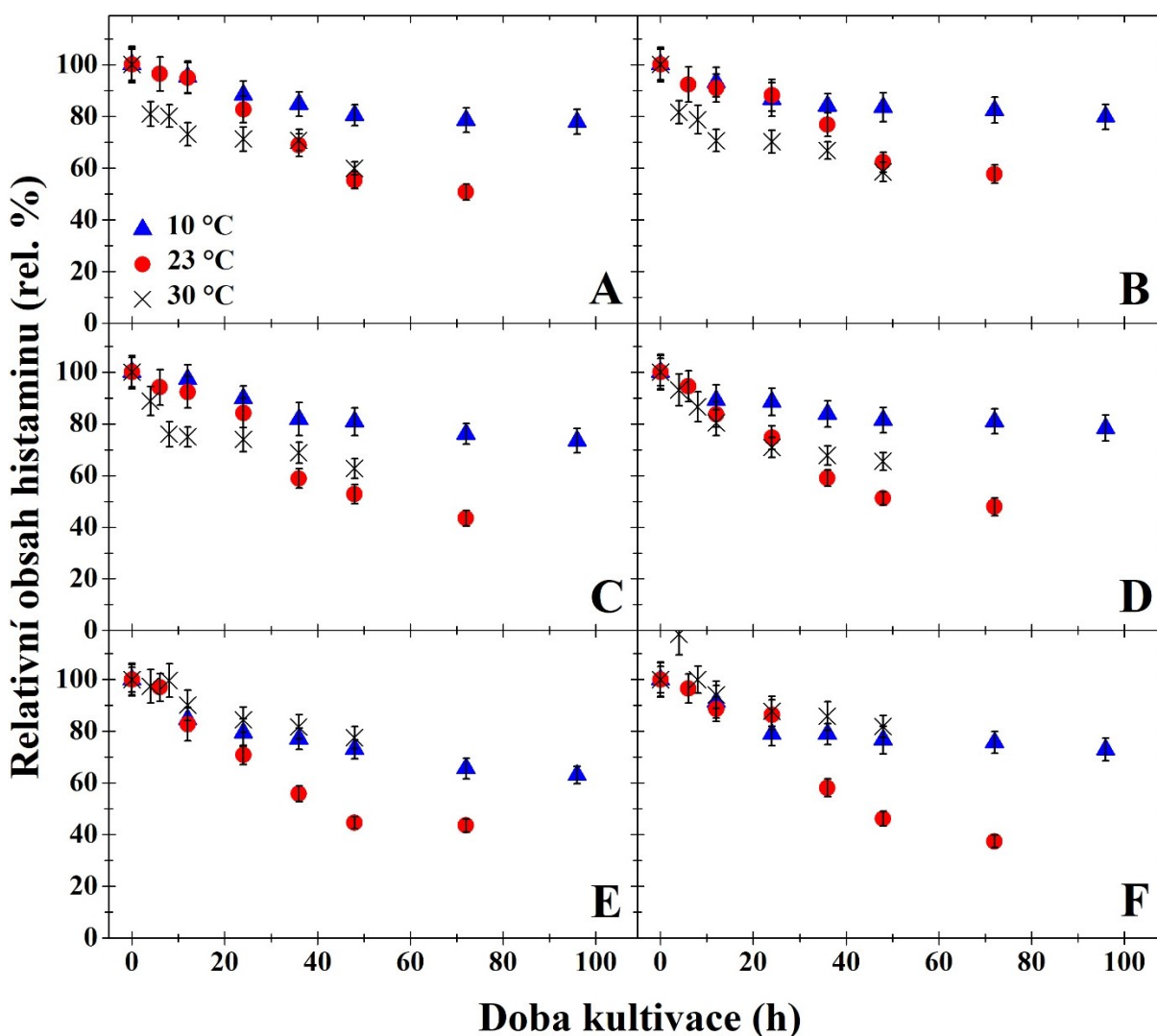
Z testovaných biogenních aminů byl kmen *B. pumilus* IB26 schopen nejlépe rozkládat také histamin. Po 72 h kultivace při 23 °C byl jeho nejnižší obsah detekován v prostředí o pH 5 v médiu bez soli (Obr. 6). Jeho koncentrace po 72 h kultivace klesla o 63 %. Čím vyšší koncentrace soli byla v médiu, tím méně byl HIM degradován. V médiu se 3 % NaCl kleslo množství histaminu po 72 h o 42 %. V prostředí o pH 8 v médiu bez soli a v médiu s 3 % NaCl byl shodně zaznamenán 61% pokles koncentrace HIM. V médiu o pH 8 s 1 % soli jeho koncentrace mírně stoupla na 41 %, v médiu s obsahem soli 2 % dále koncentrace HIM mírně rostla až na 45 %, v médiu s nejvyšším testovaným obsahem soli koncentrace histaminu po 72 h opět klesla na 39 % (Obr. 7). V médiu o iniciačním pH 7 byl histamin degradován nejméně u varianty s nejvyšší sledovanou koncentrací soli. Jeho obsah byl při 23 °C po 72 h redukován o 52 %. Nejméně byl HIM degradován během kultivace při 10 °C ve všech variantách testovaných médií. Nejnižší dosažená koncentrace při 10 °C po 96 h inkubace byla detekována v prostředí o pH 5 v médiu bez přidané soli. I v tomto případě se míra degradace snižovala v médiích s vyšším obsahem NaCl. Histamin byl při teplotě 10 °C v prostředí o pH 5 redukován pomaleji. Po 36 h inkubace byla jeho minimální koncentrace 85 %. V prostředí o vyšším pH byl HIM při 10 °C redukován rychleji. V prostředí o pH 8 při teplotě 30 °C byl histamin redukován nejméně ze všech testovaných teplot v médiích s přídavkem soli.



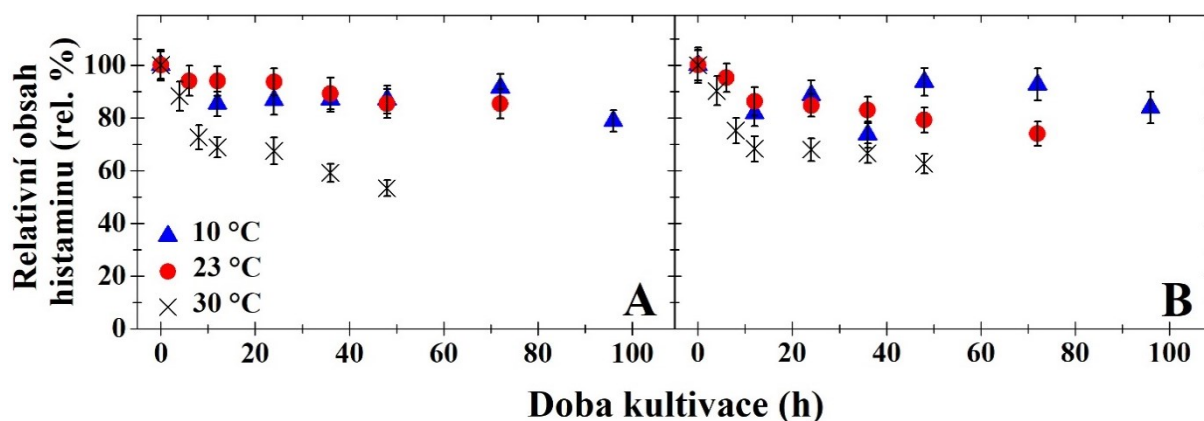
Obr. 6: Degradace histaminu kmenem *B. pumilus* IB26 v minerálním médiu bez přídavku soli a s 1 % NaCl; A, B – pH 5; C, D – pH 7; E, F – pH 8; A, C, E – 0 % NaCl; B, D, F – 1 % NaCl

V médiu bez soli byla po 48 h jeho nejnižší koncentrace 63 %, v médiích s přídavkem soli se jeho koncentrace po 48 h pohybovala v rozmezí od 79-83 %. Při teplotě 30 °C byl HIM nejlépe degradován v prostředí o iniciačním pH 7 s 1 % soli, kdy jeho koncentrace po 4 h klesla o 41 %. Rozklad histaminu v nutrient broth probíhal nejlépe při teplotě 30 °C (Obr. 8). Jeho obsah byl skokově redukován již během prvních 4 h kultivace, kdy jeho koncentrace klesla v médiu bez přídavku soli o 27 %, tento úbytek byl o 4% vyšší než u stejné varianty minerálního média. Po 48 h kultivace klesl obsah HIM v NB o 56 %, histamin byl tedy redukován o 5 % více než po 48 h v minerálním médiu. Naopak degradace při 23 °C probíhala v nutričně bohatém médiu výrazně pomaleji. Během prvních 12 h inkubace klesl obsah histaminu o 5 %, tedy o 12 % méně než v minerálním médiu. Po 72 h kultivace pozvolna klesal obsah histaminu až na 85 %. Ve stejné variantě MM1 byl po 72 h o 36 % nižší. Rozklad HIM

při teplotě 10 °C v NB nevykazoval v porovnání s redukcí histaminu v MM1 tak výrazné rozdíly jako u předchozí teploty. Během prvních 12 h inkubace klesl obsah HIM o 15 %, tedy o 10 % více než v minerálním médiu, po 96 h kultivace kleslo množství histaminu celkově o 20 %, tedy o 7 % méně než ve stejné variantě MM1. V NB s přidavkem 2 % NaCl byl histamin nejvíce redukován opět při teplotě 30 °C. Po 48 h dosahovala jeho koncentrace 62 %, koncentrace HIM ve stejné variantě minerálního média byla o 1 % vyšší. V 10 °C byl HIM degradován o 15 %, tedy méně než ve variantě bez přidavku soli. Při inkubaci ve 23 °C byl histamin redukován o 9 % více než u média bez přidavku NaCl.



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



Obr. 8: Degradace histaminu kmenem *B. pumilus* IB26 v nutrient broth; A – 0 % NaCl, B – 2 % NaCl

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

5. SOUHRNNÁ DISKUZE

Biogenní aminy mají negativní efekt na lidské zdraví. Reakce lidského organismu na přítomnost BA v potravinách je individuální, existují však jedinci, kteří jsou na přítomnost těchto látek citlivější a zvýšený příjem jim může způsobovat zdravotní problémy (Emborg a Dalgaard, 2008). Vzhledem k této skutečnosti přetrvávají v potravinářském průmyslu tendence kontrolovat obsah BA v potravinách a nápojích. Bylo navrženo mnoho strategií, které by mohly

výsledný obsah biogenních aminů ovlivnit. Většina těchto navržených technik se však soustřeďuje na potlačení růstu mikroorganismů s dekarboxylázovou aktivitou (Mohedano et al., 2015). Tyto metody mají možnost zabránit produkci BA, případně zpomalit proces jejich tvorby, ale neexistuje zde možnost eliminace již vytvořených BA. Jako možná alternativa se ukazuje využití mikroorganismů, které jsou schopny využít biogenní aminy, a tím jejich obsah v potravinách redukovat. Již v minulosti se některé studie zabývaly hledáním BA-degradujících mikroorganismů, které disponují enzymy aminoxidázami, jež jsou zodpovědné za rozklad BA (Mohedano et al., 2015; Liu et al., 2016; Xia et al., 2018).

Cílem první části této práce bylo vyhledat v potravinových matricích a nápojích takové mikroorganismy, které jsou schopny rozkládat biogenní aminy, tyto izolovat a následně je identifikovat pomocí instrumentálních a molekulárně-biologických metod. Izolace těchto mikroorganismů byla založena na kultivaci v definovaném minerálním médiu s přídavkem biogenních aminů jako jediných zdrojů uhlíku a dusíku. Degradace BA byla prokázána schopností růstu a množení získaných izolátů v daném médiu. Existuje několik prací, které se zabývaly mikrobiálním rozkladem biogenních aminů a jejich výsledky do jisté míry korelují se záchyty mikroorganismů uvedených v této práci (Alvarez a Moreno-Arribas, 2014; Cueva et al., 2012; Zaman et al., 2014). Herrero-Fresno et al. (2012) se ve své práci zabývali studiem 17 izolátů identifikovaných jako *Lactocaseibacillus casei* (dříve *Lactobacillus casei*) nalezených v sýru, u kterých byla popsána schopnost degradovat histamin a tyramin *in vitro*. Získané izoláty byly identifikovány sekvenováním části genu pro 16S rRNA.

V rámci dalších experimentů byly z potravin izolovány mikroorganismy schopné růstu v minerálním médiu obsahujícím biogenní aminy. Tyto izoláty byly identifikované jako *Acinetobacter pittii*, *Agrobacterium radiobacter*, *Bacillus altitudinis*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus safensis*, *Bacillus subtilis*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Micrococcus luteus*, *Pseudomonas koreensis*, *Pseudomonas fulva*, *Serratia marcescens*, *Serratia ureilytica* a následně byly podrobeny dalším analýzám. Byla sledována jejich schopnost degradace tryptaminu, fenylethylaminu, putrescinu, kadaverinu, histaminu a tyraminu v čase v podmínkách *in vitro*. V porovnání s ostatními izoláty vykazoval *Bacillus subtilis* IB23 nejvyšší degradační aktivitu. Byla pozorována téměř 100% degradace putrescinu, 97% degradace histaminu a rozklad 92 % kadaverinu. Tryptamin, fenylethylamin a tyramin byly po 72 hodinách degradovány v rozmezí 22-49 %. Kmeny *Acinetobacter pittii* IB5, *Agrobacterium radiobacter* IB102, *Bacillus altitudinis* IB84 a *Bacillus pumilus* IB26 vykazovaly nejvyšší degradační kapacitu pro tyramin, který degradovaly v rozmezí od 36 do 50 %, všechny ostatní sledované kmeny byly schopny nejvíce degradovat putrescin. Studium kinetiky degradace BA se zabývaly i mnohé další studie. V práci Lee et al. (2015) je popisována degradace histaminu u *B. subtilis*, kdy bylo během 24hodinové kultivace v bujónu degradováno 74 % jeho obsahu, u *Paenibacillus polymyxa* (dříve *Bacillus polymyxa*) bylo během této doby redukováno až 100 % histaminu.

Použití mikroorganismů s aminoxidázovou aktivitou a jejich aplikace do potravin při procesu jejich výroby má ovšem také svá omezení, a to zejména tehdy, pokud podmínky výrobního či skladovacího procesu nejsou souladu s podmínkami pro přežití těchto mikroorganismů, respektive s optimálními podmínkami pro katalytickou aktivitu degradujících enzymů, např. příliš vysoké teploty či koncentrace soli, čímž může být zabráněno degradaci přítomných BA (Tapingkae et al., 2010). Teplota, pH a obsah soli jsou klíčové environmentální prvky, které ovlivňují mikrobiální aktivitu v potravinách.

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

B. subtilis IB23 degradovat vybrané biogenní aminy. Ve všech variantách pH minerálního média, za všech teplot a u obou způsobů kultivace došlo ke snížení obsahu BA o 65-87 %. Přesto, že testování vlivu jednotlivých faktorů na míru degradace neukázalo příliš velké rozdíly ve výsledných koncentracích BA, můžeme obecně předpokládat, že se jedná o zajímavé výsledky, které naznačují využití v relativně širokém spektru vnějších podmínek, a to i u těch potravin, které se vyznačují náročnějšími výrobními procesy. V případech, kdy selhávají metody prevence vzniku těchto nežádoucích látek, naznačují získané výsledky možnost využití izolovaných degradérů BA ke snížení jejich obsahu v potravinách. V řadě dalších publikovaných studií (Zaman et al., 2014; Kim et al., 2012; Alvarez a Moreno-Arribas, 2014; Eom et al., 2015; Lee et al., 2015) byly zaznamenány pozitivní výsledky degradace biogenních aminů u *B. subtilis*.

Při porovnání degradace BA kmeny *B. subtilis* IB23 a *B. pumilus* IB26 byla pozorována vyšší degradační aktivita u prvního zmíněného kmene. Během inkubace při 30 °C v prostředí o pH 7 v médiu bez přidané soli degradoval po 48 h *B. subtilis* IB23 tryptamin o 50 %, fenylethylamin o 57 %, putrescin o 45 %, kadaverin o 47 %, histamin o 51 % a tyramin o 62 %, *B. pumilus* IB 26 degradoval ve stejném prostředí tryptamin o 47 %, fenylethylamin o 35 %, putrescin o 42 %, kadaverin o 41 %, histamin o 39 % a tyramin o 25 %, snížil tak koncentraci testovaných BA minimálně o čtvrtinu. Obdobně jako u předchozích pozorování měla na míru degradace největší vliv teplota. Obecně lze konstatovat, že biogenní aminy byly nejlépe degradovány při teplotě 30 °C, což je nejen teplotní optimum pro růst obou vybraných kmenů, ale také ideální teplota pro působení bakteriálních aminoxidáz (Cheng et al., 2020), se zvyšující se teplotou nad 45 °C dochází k denaturaci těchto enzymů, a tedy úplné inhibici degradace BA (Zaman et al., 2014). Se snižující se teplotou klesala degradační aktivita obou sledovaných kmenů. *B. pumilus* IB26 např. v prostředí o pH 7 v médiu bez přidané soli degradoval obsah putrescinu při 30 °C po 24 h o 41 %, při teplotě 23 °C o 24 % a při teplotě 10 °C jen o 2-3 %. Spolu se snižováním teploty se snižuje i rychlost metabolismu a růstu bakterií, proto i k redukci biogenních aminů dochází pomaleji. Při nejnižší sledované teplotě byla tedy kultivační doba prodloužena na 96 h. Po ukončení kultivace *B. pumilus* IB26 klesly obsahy všech sledovaných BA ve všech prostředích minimálně o čtvrtinu. Podobné výsledky jsou veskrze pozitivní např. pro výrobu dlouho zrajícího sýra, který je často zdrojem vysokého množství biogenních aminů. Zrácí teploty jsou závislé na individuálním druhu a vlastnostech sýra, ale obvykle se pohybují právě kolem 10 °C (Joosten a Nuñez, 1996). Námi sledované rozmezí pH míru degradace BA kmeny rodu *Bacillus* ovlivňovalo, ale ze získaných výsledků nelze přesně určit, zda nějaká ze sledovaných hodnot výrazně zesilovala či inhibovala degradaci. Pro příklad lze uvést degradaci histaminu kmenem *B. pumilus* IB26, který v médiu bez přídavku soli při inkubační teplotě 30 °C snížil po 48 h jeho koncentraci v prostředí o pH 5 o 43 %, v prostředí o pH 7 o 45 % a v prostředí o pH 8 o 27 %, naproti tomu hladina putrescinu byla ve stejných podmínkách v prostředí o pH 5 snížena

o 44 %, v prostředí o pH 7 o 37 % a v prostředí o pH 8 o 26 %. Cheng et al. (2020) izolovali z několika fermentovaných potravin kvasinky, které byly pomocí sekvenace části genu pro 16S rRNA identifikovány jako *Wickerhamomyces anomalus* a *Millerozyma farinosa*, u nichž sledovali aktivitu aminoxidáz v širokém rozpětí pH (3-10). Stejně jako u většiny bakteriálních aminoxidáz byla prokázána závislost míry degradace na hodnotách pH. Studie uvádí, že i pro tyto aminoxidázy je optimální pH 7, ale jejich aktivita se v rozmezí pH 5-8 příliš nelišila (Dapkevicius et al., 2010). Ke snížení degradace docházelo až v prostředích o pH < 5 a pH > 9 (Cheng et al., 2020). V podobném rozmezí testovali aktivitu aminoxidáz ve své práci i Ying et al., 2016, kdy sledovali míru degradace BA kmenem *Halomonas shantousis* SWA25. Degradace BA probíhala nejintenzivněji v prostředí o pH 7, které je optimem pro funkci bakteriálních aminoxidáz, ale vysokou degradační aktivitu si udržela i v rozmezí pH 5-8. Dalším ze sledovaných faktorů byla přítomnost NaCl. U některých potravin, pokud je koncentrace soli příliš nízká, je inhibiční účinek soli na některé nežádoucí mikroorganismy oslabený (Jia et al., 2020) a vede často k nepříjemným změnám organoleptických vlastností, jako je třeba kyselost a hořkost (Xie et al., 2022). Pokud nedojde k inhibici růstu mikrobioty, která produkuje BA, nastává opět problém s jejich akumulací (Chun et al., 2020; Li et al., 2020). V námi testovaném rozmezí (0-3 % w/v) byly *B. subtilis* IB23 i *B. pumilus* IB26 schopny degradovat všechny sledované biogenní aminy. S rostoucí koncentrací soli se ale míra degradace mírně snižovala. Na základě výsledků publikovaných ve studiích Cheng et al. (2020) a Xie et al. (2022), kteří testovali schopnost degradace BA izoláty získaných z potravin, lze předpokládat, že s dalším zvyšováním koncentrace NaCl by se dále snižovala i míra degradace BA až do úplného zastavení růstu dané mikrobioty. V literatuře je popsáno jen velmi málo druhů, které by byly schopny degradovat BA při vysokých koncentracích NaCl (> 10 % w/v) (Cheng et al., 2020). Jedním z nich je např. *Brevibacillus* sp. SK35, který byl schopen efektivně degradovat histamin, putrescin, kadaverin, tyramin a tryptamin při teplotě 35 °C v prostředí o pH 8 s 10% koncentrací NaCl. Se zvyšující se koncentrací soli nad 10 % (w/v) se rychlost degradace postupně snižovala (Sinsuwan et al., 2010). Obdobných výsledků bylo dosaženo i v práci Cheng et al. (2020), kdy testované kmeny *Wickerhamomyces anomalus* a *Millerozyma farinosa* vykazovaly pokles degradační aktivity spolu s růstem koncentrace NaCl nad 10 %. Když koncentrace soli dosáhla 30 % (w/v), dané kmeny v podstatě ztratily degradační schopnost pro KAD, PUT, HIM, TYM (<5 %), což může být způsobeno vysokou koncentrací soli inhibující růst daného kmene nebo koncentrace soli inhibující aktivitu aminoxidázy kmene, čímž se snižuje rychlost degradace (Kim et al., 2017). V práci Tapinkgkae et al. (2010) byly popsány druhy extrémně halofilních archeí, která jsou schopna BA rozkládat při velmi vysokých teplotách i koncentracích soli. Studie popsala degradační aktivitu *Natrinema gari*, kdy byla nejvyšší degradační kapacita zaznamenána při teplotě 40-55°C v prostředí o pH 6-8,5 a koncentrací soli 15-20 %. Ying et al.

(2016) testovali schopnost degradace osmi BA v médiu s obsahem NaCl halotolerantním mikroorganismem *Halomonas santhousis* SWA25. Přestože byl sledovaný kmen schopen redukovat množství všech testovaných BA v prostředí s 20 % NaCl o 10-20 %, nejvyšší degradační aktivity dosahoval v médiu s přídatkem 0-3 % NaCl (w/v), přičemž optimální koncentrace NaCl pro její růst je 3 % (w/v). Tato studie spolu se studiemi Zaman et al. (2010) a Tapingkae et al. (2010) naznačují, že k nejvyšší míře degradace BA různými mikroorganismy dochází v prostředí s optimální koncentrací NaCl pro jejich růst a různou citlivostí aminooxidáz. Tyto výsledky představují důležitý přínos pro potravinářský průmysl, jelikož takto vysoké koncentrace soli inhibují růst velké části mikroorganismů a teoreticky by se obtížně hledala náhrada, která je schopna v těchto koncentracích nejen růst, ale i redukovat množství přítomných BA.

Stejně jako ve studii Sun et al. (2023) bylo předpokládáno, že rozsah degradační aktivity bude mnohem patrnější v minerálním médiu, kde jedinými zdroji uhlíku a dusíku byly dodané biogenní aminy. Pokud byly sledované kmeny schopny růstu, musely nutně využít minimálně jeden z obsažených BA. Nutrient broth je ale nutričně bohatší médium, které ve svém složení obsahuje mj. glukózu, kvasničný extrakt a pepton, a proto se svou skladbou více podobá vzorku reálné potraviny. Jelikož jsou v médiu NB uhlík a dusík snáze dostupné z jiných zdrojů, bylo sledováno, v jaké míře degradace probíhá. Z toho důvodu také probíhalo sledování degradace *B. subtilis* IB23 a *B. pumilus* IB26 v menším rozsahu. Zajímavým zjištěním bylo, že i v nutričně bohatém médiu degradace BA probíhá při 30 °C poměrně efektivně. *B. subtilis* IB23 dokázal snížit obsah všech BA, během 48 h při kultivační 30 °C v médiu bez přídatku soli došlo k úbytku všech průměrně o 37 %. V případě média s 2 % soli bylo snížení koncentrace v daných podmínkách obdobné. *B. pumilus* IB26 vykazoval ve stejných podmínkách vyšší degradační schopnost a obsah všech testovaných BA snížil během 48 h o 45 %. I v tomto případě bylo v médiu s přídatkem soli dosaženo obdobných výsledků jako v médiu, které sůl neobsahovalo. Srovnání výsledků degradace mezi jednotlivými kmeny ukázalo, že *B. subtilis* IB23 degraduje v MM1 všechny testované biogenní aminy lépe, než kmen *B. pumilus* IB26, v médiu NB jsme došli k výsledkům opačným. K zajímavým výsledkům dospěli také Martuscelli et al., 2000 a Zaman et al., 2011, kdy izolovali stafylokoky (*S. xylosum*, *S. carnosus*), které byly schopny deaminovat tyramin a histamin *in vitro*, ale v reálných potravinových systémech byla jejich aktivita výrazně omezena přítomností jiných zdrojů dusíku, které byly pro tyto bakterie snadněji dostupné (Gardini et al., 2002). V kontrastu k těmto výsledkům byla zajímavější data získána v reálné potravinové matici chudé na dusík, jako je víno, ve kterém probíhala deaminace BA kmeny *Lactocaseibacillus casei*, *Lactiplantibacillus plantarum* a *Pediococcus* spp. výrazně lépe (García-Ruiz et al., 2011; Capozzi et al., 2012).

Využití námi izolovaných a testovaných sporulujících bakterií v potravinářském průmyslu ovšem vyžaduje další studie, které by se zabývaly

degradací BA přímo v potravinové matrici a zároveň by se soustředily na udržení jejich nezávadnosti a organoleptických vlastností (Kim et al., 2022). Podobně jako u *Weizmania coagulans* (dříve *Bacillus coagulans*) a *Geobacillus stearothermophilus*, které se vyznačují silným enzymatickým aparátem, je totiž přítomnost sporotvorného *B. subtilis* v potravinách nežádoucí (Harirchi et al., 2022). V kontrastu s tímto faktem je také důležité zmínit, že některé kmeny *B. subtilis* jsou řazeny mezi probiotika, která naopak pozitivně ovlivňují lidské zdraví (Lorencová et al., 2012). *B. subtilis* i *B. pumilus* je možné využít jako startérové kultury pro výrobu některých fermentovaných potravin (Ouoba et al., 2004).

6. ZÁVĚR

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

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

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

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

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

7. PŘÍNOS PRO VĚDU S PRAXI

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

Přínos pro vědu lze spatřit v následujících aspektech

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

Přínos pro praxi lze spatřit v následujících aspektech

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

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

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Nishino, N., Hattori, H., Wada, H., Touno, E. (2007). Biogenic amine production in grass, maize and total mixed ration silages inoculated with *Lactobacillus casei* or *Lactobacillus buchneri*. *Journal of Applied Microbiology*, 103, 325-332. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2006.03244.x

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Xie, S., Li, Z. Zhang, B. S. Y. (2022). Impact of salt concentration on bacterial diversity and changes in biogenic amines during fermentation of farmhouse soybean paste in Northeast China. *Current Research in Food Science*, 5, 1225-1234. DOI: 10.1016/j.crf.2022.07.012

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

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

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

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

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

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

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

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

SEZNAM TABULEK A OBRÁZKŮ

Seznam tabulek

Tab. 1:	Seznam potravin a nápojů, u nichž se prováděl skrining na přítomnost mikroorganismů degradujících biogenní aminy.....	19
---------	---	----

Seznam obrázků

Obr. 1:	Degradace putrescinu kmenem <i>B. subtilis</i> IB23 v minerálním médiu za aerobních podmínek; A – pH 5, B – pH 6, C – pH 7, D – pH 8.....	26
Obr. 2:	Degradace putrescinu kmenem <i>B. subtilis</i> IB23 v minerálním médiu za anaerobních podmínek; A – pH 5, B – pH 6, C – pH 7, D – pH 8.....	26
Obr. 3:	Degradace histaminu kmenem <i>B. subtilis</i> IB23 v minerálním médiu bez přídavku soli a s 1 % NaCl; A, B – pH 5; C, D – pH 7; E, F – pH 8; A, C, E – 0 % NaCl; B, D, F – 1 % NaCl.....	29
Obr. 4:	Degradace histaminu kmenem <i>B. subtilis</i> IB23 v minerálním médiu s 2 a 3 % NaCl; A, B – pH 5; C, D – pH 7; E, F – pH 8; A, C, E – 2 % NaCl; B, D, F – 3 % NaCl.....	30
Obr. 5:	Degradace histaminu kmenem <i>B. subtilis</i> IB23 v nutrient broth; A – 0 % NaCl, B – 2 % NaCl.....	30
Obr. 6:	Degradace histaminu kmenem <i>B. pumilus</i> IB26 v minerálním médiu bez přídavku soli a s 1 % NaCl; A, B – pH 5; C, D – pH 7; E, F – pH 8; A, C, E – 0 % NaCl; B, D, F – 1 % NaCl.....	32
Obr. 7:	Degradace histaminu kmenem <i>B. pumilus</i> IB26 v minerálním médiu s 2 a 3 % NaCl; A, B – pH 5; C, D – pH 7; E, F – pH 8; A, C, E – 2 % NaCl; B, D, F – 3 % NaCl.....	33
Obr. 8:	Degradace histaminu kmenem <i>B. pumilus</i> IB26 v nutrient broth; A – 0 % NaCl, B – 2 % NaCl.....	34

CURRICULUM VITAE

Osobní údaje

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

Dosažené vzdělání

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

Znalosti

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

Odborná příprava a zkušenosti

Účast na grantových projektech
2017 GAČR No. 17-09594S – Redukce obsahu biogenních aminů v
modelových systémech
IGA/FT/2017/003
Možnosti snížení výskytu nežádoucích látek v potravinách a v životním
prostředí
IGA/FT/2016/012
Výzkum procesů ovlivňujících kvalitu potravin a stav životního prostředí
IGA/FT/2015/005
Pokročilé chemické a biochemické metody v ochraně životního prostředí
IGA/FT/2014/013
Nepříznivé látky a faktory v životním prostředí a v potravinách

SEZNAM PUBLIKACÍ

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

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

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

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

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

Mgr. Irena Butor, Ph.D.

Studium degradace biogenních aminů

Study of the biogenic amines degradation

Teze disertační práce (14 pt)

Vydala Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně,

nám. T. G. Masaryka 5555, 760 01 Zlín.

Náklad: vyšlo elektronicky

Sazba: Mgr. Irena Butor, Ph.D.

Publikace neprošla jazykovou ani redakční úpravou.

Rok vydání 2023

Pořadí vydání: první

ISBN 978-80-7678-188-7

