

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

Mgr. Lucie Klementová, Ph.D.

Teze disertační práce



**Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně**  
**Fakulta technologická**

Teze disertační práce

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

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

Autor: **Mgr. Lucie Klementová, Ph.D. (roz. Berčíková)**

Studijní program: P2901 Chemie a technologie potravin  
Studijní obor: 2901V013 Technologie potravin

Školitel: prof. RNDr. Leona Buňková, Ph.D.  
Konzultant: Mgr. Petra Jančová, Ph.D.

Oponenti: prof. Ing. Miroslava Kačániová, Ph.D.  
doc. Ing. Mária Greifová, Ph.D.  
doc. Ing. Marcela Pejchalová, Ph.D.

Zlín, leden 2024

© Lucie Klementová

Vydala **Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně** v edici **Doctoral Thesis Summary**.  
Publikace byla vydána v roce 2024.

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

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

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

ISBN 978-80-7678-224-2

## **Poděkování:**

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

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

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

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

## ABSTRAKT

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

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

## ABSTRACT

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

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

# OBSAH

1. SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY .....	9
1.1 Biogenní aminy – charakteristika rozdělení .....	9
1.2 Toxicita biogenních aminů .....	9
1.3 Potraviny s vyšším obsahem biogenních aminů .....	9
1.4 Mikroorganismy se schopností degradovat aminy .....	10
1.5 Enzymy podílející se na odbourávání BA u bakterií .....	10
2. MATERIÁL A METODIKA .....	11
2.1 Mikroorganismus .....	11
2.2 Experiment I – Vliv vybraných faktorů na redukční schopnost <i>Lacticaseibacillus casei in vitro</i> .....	11
2.2.1 Předkolonová derivatizace dansylchloridem a stanovení biogenních aminů pomocí HPLC/DAD .....	12
2.3 Experiment II – Vliv vybraných faktorů na redukční schopnost <i>Lacticaseibacillus casei</i> v reálné potravíně .....	14
2.4 Experiment III – detekce enzymu multicopperoxidázy .....	15
2.4.1 Stanovení přítomnosti a aktivity enzymu MCO .....	15
2.5 Statistické vyhodnocení dat .....	16
3. VÝSLEDKY PRÁCE .....	16
3.1 Výsledky experimentu I – Vliv vybraných faktorů na redukční schopnost bakterie <i>in vitro</i> .....	16
3.1.1 Vliv faktorů na redukci histaminu <i>in vitro</i> .....	16
3.1.2 Vliv faktorů na redukci ostatních biogenních aminů <i>in vitro</i> .....	22
3.1.3 Vliv cysteinu na redukci biogenních aminů .....	24
3.2 Výsledky experimentu II – Vliv technologických parametrů na degradační schopnost <i>Lacticaseibacillus casei</i> v mléce .....	25
3.2.1 Vliv faktorů na redukci histaminu v mléce .....	25
3.2.2 Vliv faktorů na redukci tyraminu v mléce .....	25
3.2.3 Redukce putrescinu v mléce .....	27
3.2.4 Redukce kadaverin v mléce .....	27

3.2.5	Redukce fenylethylaminu v mléce .....	27
3.3	Experiment III – detekce aktivity multicopperoxidázy.....	28
3.3.1	Stanovení přítomnosti enzymu multicopperoxidázy v gelu .....	28
3.3.2	Spektrofotometrické stanovení: .....	28
4.	DISKUSE.....	30
5.	ZÁVĚR .....	36
6.	PŘÍNOS PRO VĚDU A PRAXI .....	37
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....	38
	CURRICULUM VITAE.....	45
	<b>PŘEHLED PUBLIKAČNÍ ČINNOSTI.....</b>	<b>45</b>
	<b>KONFERENČNÍ PŘÍSPĚVKY .....</b>	<b>46</b>

## CÍLE PRÁCE

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

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

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



## ÚVOD

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

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

# 1. SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

## 1.1 Biogenní aminy – charakteristika rozdělení

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

Biogenní aminy vznikají především dekarboxylací příslušných aminokyselin enzymy dekarboxylázami. Dekarboxylázy jsou skupina enzymů, která selektivně působí na specifické aminokyseliny odstraněním karboxylové skupiny za vzniku odpovídajících aminů a uvolnění CO<sub>2</sub>. Ačkoliv mohou vznikat u všech organismů, největší a nejvýznamnější dekarboxylázová aktivita byla zjištěna u bakterií (Comas-Basté et al., 2020).

## 1.2 Toxicita biogenních aminů

U zdravých osob dochází k dostatečně rychlé redukci potravou získaných biogenních aminů, avšak u osob s nízkou aktivitou aminooxidáz, která může být způsobena genetickou dysfunkcí, působením inhibitorů (např. antidepressiv, některých dalších léků, alkoholu) nebo nadměrného příjmu BA z potravy, dochází k jejich akumulaci a mohou mít následně negativní vliv na člověka a způsobit intoxikaci organismu. Obecně se jedná o bolesti hlavy, kopřivku, střevní potíže, zvýšený nebo snížený krevní tlak. Navíc některé aminy mohou vytvářet karcinogenní nitrosaminy (Santos, 1996; Ladero et al., 2010; Alvarez a Moreno-Arribas., 2014). Toxické účinky mohou mít různé stupně závažnosti v závislosti na množství příjmu exogenních biogenních aminů, na poměru jednotlivých aminů v potravině a na zdravotním stavu konzumenta (Sarkadi, 2019).

## 1.3 Potraviny s vyšším obsahem biogenních aminů

Největším rizikem akumulace biogenních aminů v potravinách je skutečnost, že za určitých podmínek v důsledku nekontrolované mikrobiální aktivity se mohou hromadit ve vysokých koncentracích, které pak mnohonásobně překračují kapacitu detoxikačního mechanismu konzumenta. Teoreticky u všech potravin, které obsahují volné aminokyseliny nebo bílkoviny a jsou vystaveny podmínkám umožňující mikrobiální nebo biochemickou aktivitu, lze očekávat přítomnost BA. Množství a profil jednotlivých aminů se může lišit v závislosti na vnějších a vnitřních faktorech během výrobního procesu, jako jsou podmínky zrání, fyzikálně-chemické a proteolytické parametry a také přítomnost a vývoj mikroflóry. Význam hraje také původ produktu či způsob výroby. Dále existují

významné rozdíly ve složení biogenních aminů u fermentovaných a nefermentovaných potravin. Nefermentované potraviny lze považovat za nízkorizikové v souvislosti s přítomností biogenních aminů ve srovnání s produkty mikrobiální fermentace (víno, pivo, mléčné výrobky, fermentované masné výrobky), které často obsahují vysoké množství těchto sloučenin a jsou brány jako nebezpečnější. Nadměrný výskyt aminů u nefermentovaných potravin je známkou nežádoucí mikrobiální aktivity, která může být způsobena například nevhodnou manipulací a skladovací teplotou (Sarkadi, 2019; Papageorgiou et al., 2018).

#### **1.4 Mikroorganismy se schopností degradovat aminy**

Jedna ze strategií, jak účinně ovlivňovat tvorbu aminů, je cílené enzymatické odbourávání BA pomocí mikroorganismů. V současné době bylo nalezeno nespočet mikroorganismů podílejících se na odbourávání aminů v modelovém systému nebo v potravinách, a to například *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus carnosus*, *Staphylococcus xylosus*, *Staphylococcus intermedius*, *Lactobacillus casei* (dříve *Lactobacillus casei*), *Lactiplantibacillus plantarum* (dříve *Lactobacillus plantarum*), *Lentilactobacillus hilgardii* (dříve *Lactobacillus hilgardii*), *Kocuria varians* nebo *Micrococcus varians* či *Pediococcus acidilactici* (Martuscelli et al., 2000; Gardini et al., 2002; Zaman et al., 2010, 2011; Herrero-Fresno et al., 2012; Capozzi et al., 2012; Alvarez a Moreno-Arribas., 2014; Callejón et al., 2014; Eom et al., 2015).

#### **1.5 Enzymy podílející se na odbourávání BA u bakterií**

Ačkoliv enzymatická redukce aminů u člověka je dobře charakterizována, množství informací týkajících se identifikace mikrobiálního mechanismu redukce BA v potravinách je velmi vzácná. Většina dosavadních studií tyto enzymatické aktivity připisovala především aminoroxidázám (AO). Toto tvrzení vyvrátili autoři Callejón et al. (2014, 2016, 2017) ve svých studiích, ve kterých dokázali přítomnost enzymů multicopperoxidáz (MCO), subtypu lakázy. V současné době roste zájem o lakázy a mikroorganismy disponující těmito enzymy pro potenciální aplikaci v potravinářském průmyslu. Avšak dostupné publikace poukazují na skutečnost, že bakteriální MCO vykazují širokou substrátovou specifitu a jejich optimální pH a teplota se liší v závislosti na jednotlivých substrátech včetně BA. Navíc vyplývá, že katalytická schopnost lakáz vůči stejným BA je u jednotlivých mikroorganismů odlišná (Callejón et al., 2016, 2017; Li et al., 2020; Olmeda et al., 2021; Ni et al., 2022; Tepkasikul et al., 2022; Wang et al., 2022). Z těchto důvodů použití těchto enzymů v praxi je stále omezené. Před reálnou aplikací konkrétního kmene LAB je vždy nutné experimentálně analyzovat jeho degradační schopnost za specifických podmínek, které jsou dané konkrétní potravinovou maticí.

## 2. MATERIÁL A METODIKA

### 2.1 Mikroorganismus

Pro studium degradace biogenních aminů byl zvolen bakteriální kmen *Lacticaseibacillus casei* (dříve *Lactobacillus casei*) CCDM 198 získaný ze Sbírký mlékárenských mikroorganismů Laktoflora (Culture Collection of Dairy Microorganisms – CCDM) na základě předchozího screeningu. Před jednotlivými metodami byl studovaný kmen z tuhé půdy asepticky resuspendován v kultivačním médiu MRS bujónu a 24 h anaerobně kultivován při teplotě  $30 \pm 1$  °C.

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

V rámci experimentu I byl studován vliv vybraných faktorů na redukční schopnost bakterie *Lacticaseibacillus casei* CCDM 198 *in vitro* vůči histaminu, tyraminu, fenylethylaminu, putrescinu a kadaverinu (vše Sigma-Aldrich, Německo) v kultivačním médiu MRS bujónu. Testovanými faktory byly rozdílná teplota kultivace ( $11 \pm 1$  °C;  $23 \pm 1$  °C a  $30 \pm 1$  °C), rozdílné pH kultivačního média (pH  $5,4 \pm 0,1$ ;  $6,2 \pm 0,1$  a  $7,0 \pm 0,1$ ), počáteční koncentrace biogenních aminů ( $0,2 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  a  $0,4 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ ), množství dostupných živin (úplné složení MRS bujónu – MRS; a neúplné složení MRS bujónu –  $\frac{1}{2}$  MRS) a čas kultivace (interval 0-72 hodin; 0-96 hodin resp. 0-336 hodin v závislosti na studované teplotě kultivace). Neúplný MRS bujón je MRS bujón připravený z poloviční navážky, která je doporučena výrobcem, a jedná se tedy o bujón o polovinu nižším množstvím živin. Všechny metody a vybrané technologické faktory v rámci experimentu I, jsou schematicky znázorněné na Obr. 2.1.

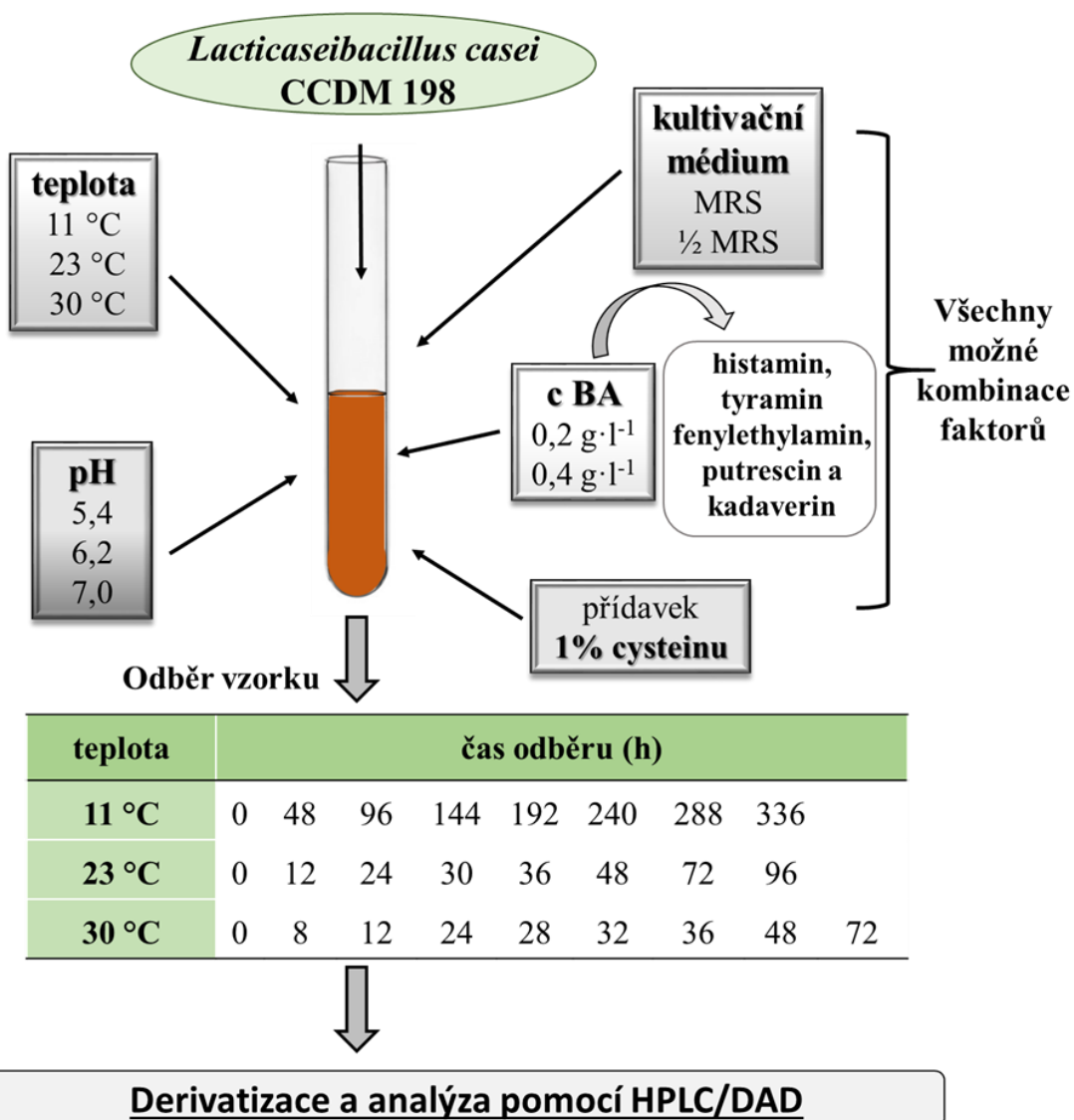
Do 7 ml MRS bujónu se studovanými faktory byla zaočkována 24hodinově narostlá bakteriální kultura tak, aby počáteční koncentrace buněk v bujónu byla  $5,9 \pm 0,2 \text{ log CFU}\cdot\text{ml}^{-1}$ . Mikroorganismus byl kultivován v MRS bujónu za studovaných podmínek a odebírán v příslušných časových intervalech tak, jak je uvedeno na Obr. 2.1. Jako kontrola (čas 0 h) sloužil bujón s BA, který nebyl zaočkován bakterií. Odběry byly prováděny ve třech paralelních zkumavkách, v případě kontroly (čas 0 h) ve dvou. V případě sad s obsahem cysteinu byl navíc před zaočkováním bakterií přidán cystein o koncentraci 1 % (w/v) (Sigma-Aldrich, Německo). V experimentálně zvolených časech byly vzorky postupně odebírány, centrifugovány (4600 otáček/min, 7 minut) a z každé zkumavky bylo odebráno 650  $\mu\text{l}$  supernatantu do dvou mikrozkuvek a přidáno  $1,2 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$   $\text{HClO}_4$  v poměru 1:1 (Merck Německo). Takto upravené vzorky byly zamrazeny při  $-80$  °C a uchovávány pro následující experimenty.

### **2.2.1 Předkolonová derivatizace dansylchloridem a stanovení biogenních aminů pomocí HPLC/DAD**

Derivatizace dansylchloridem byla provedena podle metodiky publikované v článku Dadáková et al. (2009). Do derivatizační nádoby byl napipetován 1 ml vzorku, 100  $\mu$ l vnitřního standardu a 1,5 ml karbonátového pufru o pH 11,1 – 11,2. Následně byl přidán 1 ml roztoku dansylchloridu a celý obsah byl ponechán 20 h ve tmě na třepačce. Po této době bylo přidáno 200  $\mu$ l roztoku prolinu o koncentraci 0,9 mol $\cdot$ l<sup>-1</sup> (Merck, Darmstadt, Německo) a vzorky byly ponechány další 1 h ve tmě za neustálého třepání. Po uplynutí 1 hodiny byly připipetovány 3 ml heptanu (CHROMASOLV, pro HPLC,  $\geq$  99%; Sigma-Aldrich, Německo) a celý obsah byl ručně třepán po dobu 3 minut. 1 ml horní heptanové vrstvy obsahující biogenní aminy byl přenesen do malých vialek a obsah byl odpařen při teplotě 65 °C pod proudem dusíku. Vzniklý odparek byl rozpuštěn v 1,5 ml acetonitrilu (CHROMASOLV Plus, pro HPLC,  $\geq$  99,9%; Sigma-Aldrich, Německo) a uchován při teplotě -18°C do samotné analýzy.

Před samotnou analýzou byly vzorky zfiltrány přes stříkačkový filtr s porozitou 0,22  $\mu$ m. Koncentrace biogenních aminů byly analyzovány podle publikace Smělá et al. (2004) pomocí HPLC/DAD – gradientová eluce (10% acetonitril ve vodě/acetonitril) na koloně Agilent Zorbax RRHD Eclipse Plus C18 s parametry 50 x 3,0 mm, s velikostí částic 1,8  $\mu$ m (Agilent, Paolo Alto, USA), průtokem kolonou 0,450 ml/min a teplotou 30 °C. Pro detekci byl použit detektor diodového pole (DAD) (vlnová délka 254 nm). Získané výsledky byly vyhodnoceny pomocí softwaru Agilent OpenLab Data Analysis. Degradace jednotlivých BA v čase byla vyjádřena jako relativní obsah jednotlivých BA v % (vztaženo k původní koncentraci v čase 0 h).

## Kultivace mikroorganismu za studovaných podmínek v médiu

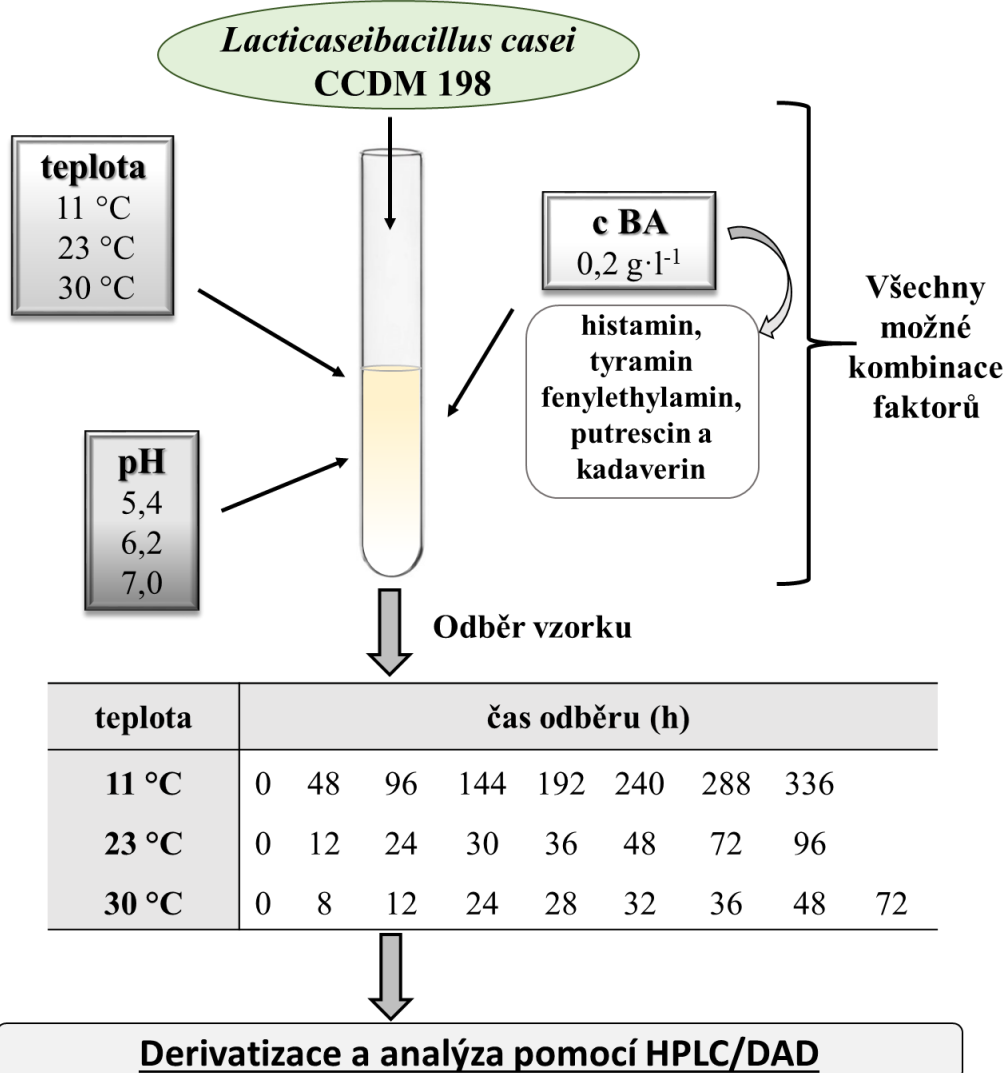


Obr. 2.1: Schématické shrnutí metodického postupu při studiu vlivu vybraných faktorů na redukční schopnosti bakterie *Lacticaseibacillus casei* CCDM 198 v kultivačním MRS bujónu.

## 2.3 Experiment II – Vliv vybraných faktorů na redukční schopnost *Lactocaseibacillus casei* v reálné potravíně

V rámci disertační práce byla také zjišťována schopnost bakteriálního kmene *Lactocaseibacillus casei* CCDM 198 redukovat všech 5 studovaných biogenních aminů v závislosti na kombinaci faktorů v reálné potravíně – v mléce (UHT, odstředěné 0,3% Progolaktos), které je výchozí surovinou při výrobě fermentovaných mléčných výrobků, jako jsou například sýry, ve kterých byly detekovány biogenní aminy. Schématické znázornění metod a vybrané technologické faktory v rámci experimentu II je uvedeno na Obr. 2.2. Sběr vzorků a následné stanovení množství BA bylo provedeno podle metodiky v podkapitole 2.2.1 Předkolonová derivatizace dansylchloridem a stanovení biogenních aminů pomocí HPLC/DAD popsané za *in vitro* podmínek.

### Kultivace mikroorganismu za studovaných podmínek v mléce



Obr. 2.2: Schématické shrnutí metodického postupu při studiu vlivu vybraných faktorů na redukční schopnosti bakterie *Lactocaseibacillus casei* CCDM 198 v mléce.

## 2.4 Experiment III – detekce enzymu multicopperoxidázy

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

### 2.4.1 Stanovení přítomnosti a aktivity enzymu MCO

#### Extrakce

50 ml bakteriální kultury v MRS bujónu narostlé přes noc (při  $30 \pm 1$  °C) s počátečním počtem buněk  $5,9 \pm 0,2$  log CFU·ml<sup>-1</sup> bylo zcentrifugováno (6 500 otáček/min, 20 minut) a následně byl pelet dvakrát promyt 25 ml 50 mmol·l<sup>-1</sup> sodnofosforečnanovým pufrům o pH 7,4 a resuspendován ve 500 µl stejného pufru s přídatkem 1 mmol·l<sup>-1</sup> fenylmethylsulfonylfluoridu (PMSF). Lýze buněk byla provedena 1 g skleněných kuliček (Sigma-Aldrich, Německo): 3 cykly po 3 minutách, mezi cykly byly vzorky chlazeny 5 minut v ledu. Po centrifugaci (12 000 otáček/min, 15 minut) byl supernatant použit ke stanovení přítomnosti enzymu v polyakrylamidovém gelu a stanovení aktivity enzymu spektrofotometricky. Koncentrace celkových proteinů byla stanovena metodou Bradfordové (Bradford, 1976).

#### Stanovení přítomnosti enzymu v polyakrylamidovém gelu

Bezbuněčný extrakt byl smíchán se vzorkovacím pufrům (10% glycerol, 50 mmol·l<sup>-1</sup> Tris-HCl, pH 6,8, bromfenolová modř) a nanesen do jamek gelu. Po nativní elektroforéze (4% zaostřovací a 8% dělicí gel, napětí 50 V v zaostřovacím a 80 V v dělicím gelu) byl gel umístěn do 100 mmol·l<sup>-1</sup> acetátového pufru o pH 4 s 10 mmol·l<sup>-1</sup> 2,6-dimethoxyfenolu (DMP, Sigma-Aldrich, Německo). Po 5 minutách byl roztok nahrazen novým stejným pufrům obsahujícím 1 mmol·l<sup>-1</sup> CuSO<sub>4</sub>. Přítomnost enzymu MCO byla prokázána oranžově žlutého zabarvením v místě enzymu.

#### Stanovení aktivity spektrofotometricky

Aktivita MCO byla stanovena monitorováním nárůstu absorbance při 420 nm během oxidace substrátu ABTS (Sigma-Aldrich, USA). Měření reakční směsi 20 µl vzorku (bezbuněčný extrakt), 160 µl 100 mmol·l<sup>-1</sup> octanového pufru o pH 4 a 20 µl 5 mmol·l<sup>-1</sup> ABST (Sigma-Aldrich, Německo) bylo prováděno v 96 jamkových mikrotitračních destičkách na přístroji TECAN In-finite M200 PRO po dobu 12 minut. Jednotka enzymové aktivity byla vyjádřena jako množství enzymu potřebného k oxidaci 1 µmol ABTS za minutu. Vypočítaná enzymová



aktivita byla poté vynesena jako procentuální relativní aktivita vztažena k maximální enzymatické aktivitě 100 % ve studovaných časech (0, 24, 48 a 72 h).

## 2.5 Statistické vyhodnocení dat

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

# 3. VÝSLEDKY PRÁCE

## 3.1 Výsledky experimentu I – Vliv vybraných faktorů na redukční schopnost bakterie *in vitro*

V předkládané disertační práci prvním cílem bylo zmapovat vliv vybraných technologických faktorů na schopnost testované kultury *Lacticaseibacillus casei* CCDM 198 degradovat biogenní aminy *in vitro*. Získané výsledky jsou rozděleny do podkapitol podle jednotlivých biogenních aminů. Poslední podkapitola shrnuje experimentálně získaná data zabývající se vlivem cysteinu na redukční schopnost *L. casei* CCDM 198 *in vitro*.

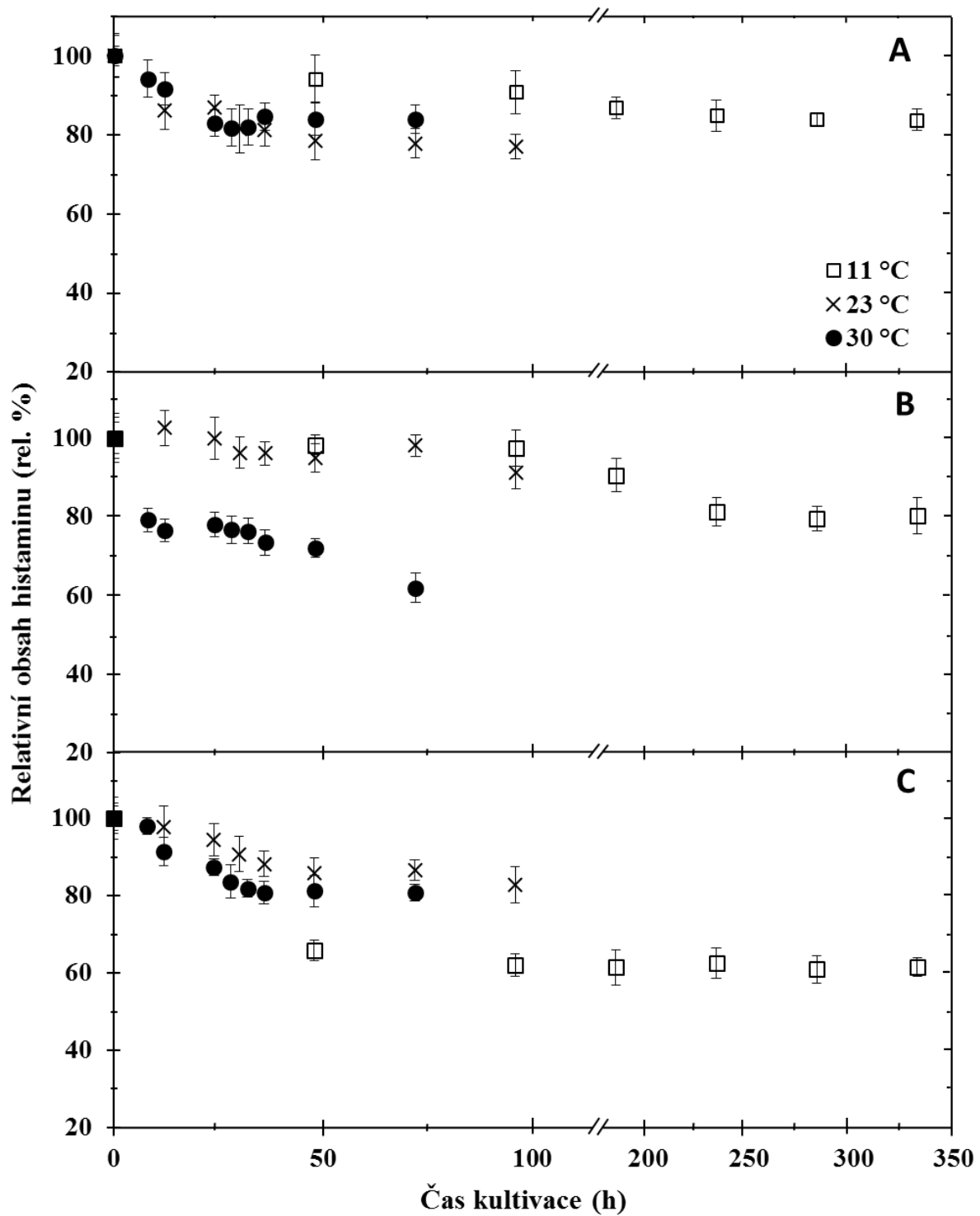
### 3.1.1 Vliv faktorů na redukcí histaminu *in vitro*

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

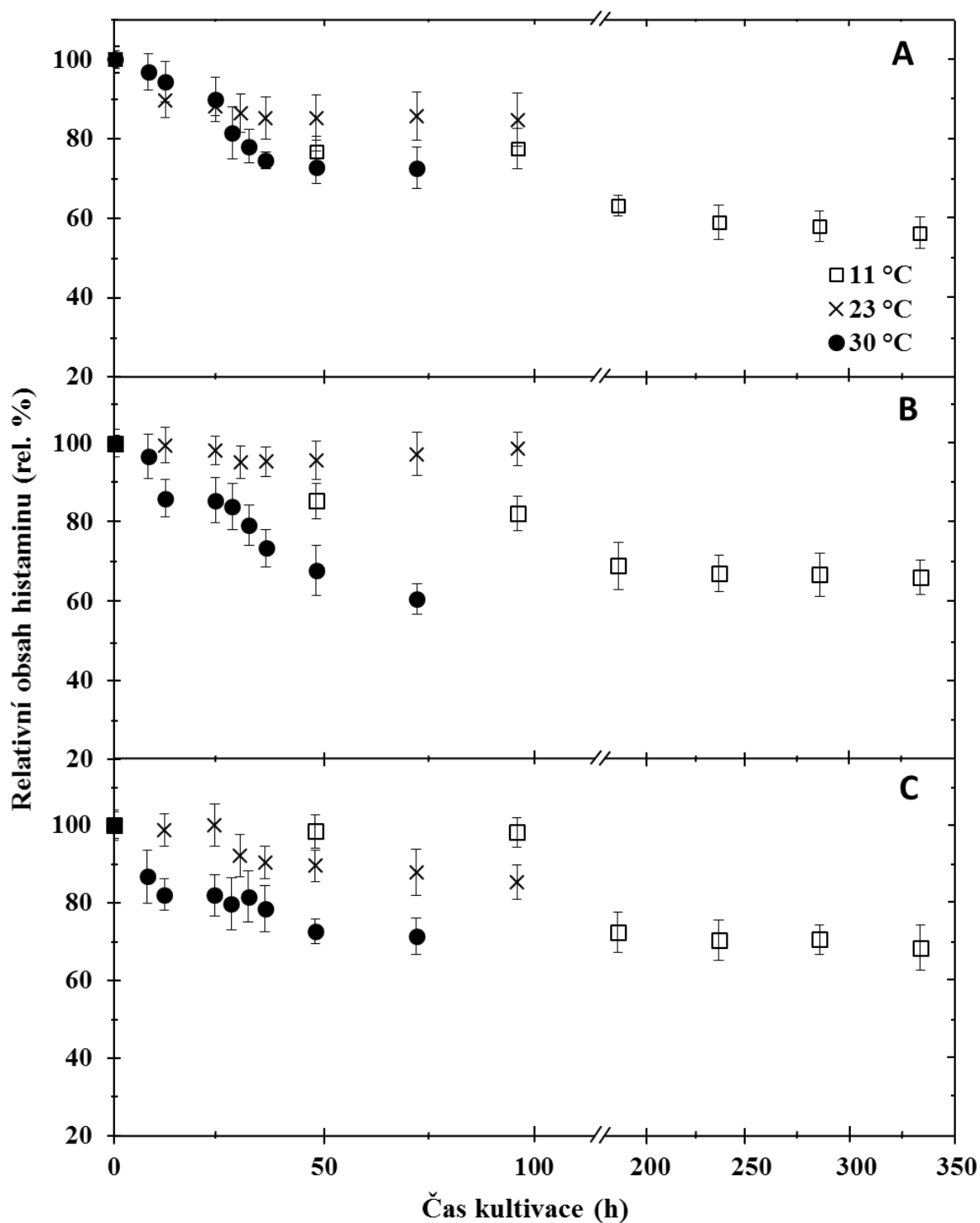
Nejprve byl zmapován vývoj histaminu v úplném MRS bujónu (Obr. 3.1 a 3.2). Obr. 3.1 popisuje celý vývoj relativního obsahu (rel. %) v úplném MRS bujónu při počáteční koncentraci histaminu  $0,2 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ . Při teplotě  $11 \text{ }^\circ\text{C}$  nejvyšší redukce histaminu byla zjištěna v médiu o pH 7. Za těchto podmínek došlo k signifikantnímu ( $P < 0,05$ ) snížení histaminu už po 48 hodinách a do konce kultivace došlo k maximální redukci téměř o 40 %. Při zbylých dvou testovaných pH hodnotách redukce histaminu na konci kultivace byla okolo 20 %. Kultivační teplota  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  také podporovala degradační schopnosti studované bakterie. Nejvhodnějším prostředím při této teplotě bylo médium o pH 6,2, ve kterém bakterie *L. casei* CCDM 198 po 72 hodinách enzymaticky odbourávala histamin téměř o 40 %. Teplota  $23 \text{ }^\circ\text{C}$  byla nejméně vhodnou teplotou ze studovaných teplot v úplném MRS bujónu, kdy maximální redukce histaminu dosahovala

pouze 23 % při všech testovaných pH hodnotách. Na Obr. 3.2 je znázorněn průběh degradace histaminu v úplném MRS bujónu při počáteční koncentraci  $0,4 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ . Jak je patrné z grafů k nejvýznamnějšímu snížení histaminu ( $P < 0,05$ ) došlo v médiu o pH 5,4 a teplotě  $11 \text{ }^\circ\text{C}$ . Významná redukce byla zjištěna už po 48 hodinách kultivace, kdy došlo ke snížení o více než 23 % a následně o více než 43 % na konci doby kultivace (po 336 hodinách) ve srovnání s počáteční koncentrací v čase 0. Koncentrace histaminu měla signifikantní vliv ( $P < 0,05$ ) na redukci histaminu, kdy redukce histaminu s nižší počáteční koncentrací nepřesáhla přes 17 % za stejných podmínek. Stejně jako u nižší počáteční koncentraci při teplotě  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  docházelo k významné redukci při všech studovaných teplotách v rozmezí od 28 % do 40 %. Nejméně vhodnou teplotou za těchto podmínek byla opět teplota  $23 \text{ }^\circ\text{C}$ .

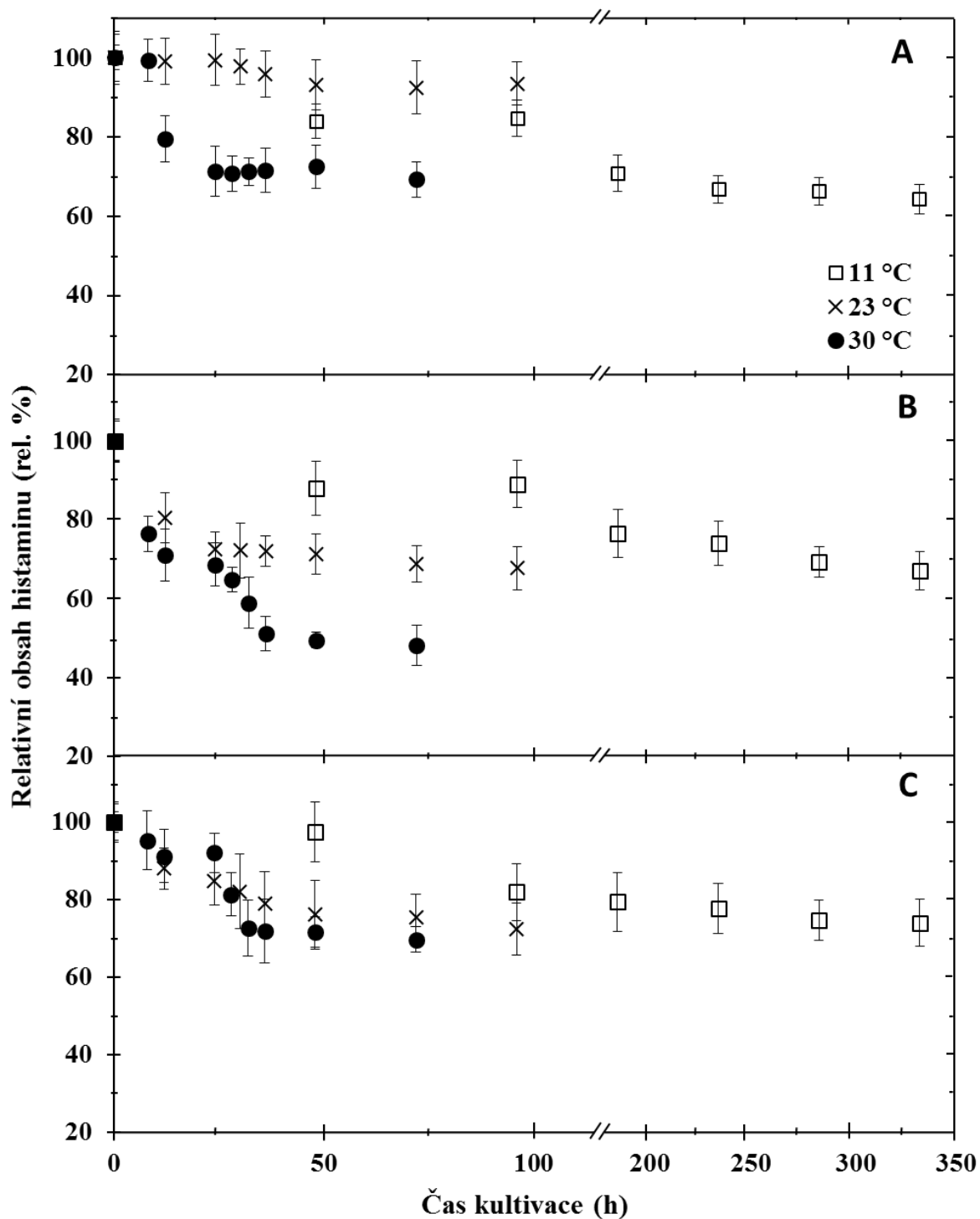
Vliv faktorů na redukční schopnost *L. casei* CCDM 198 *in vitro* byla také sledována v kultivačním médiu s neúplným složením živin (1/2 MRS). Výsledky jsou graficky shrnuty na Obr. 3.3 a 3.4. Výsledky naznačují, že *L. casei* CCDM 198 dosáhl signifikantně ( $P < 0,05$ ) vyššího úbytku histaminu v neúplném médiu při nižší počáteční koncentraci (Obr. 3.3), kdy nejvýznamnější degradace byla detekována při teplotě  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ . Po 72hodinové kultivaci došlo ke snížení množství o více než 51 % v médiu o pH 6,2 a o 30 % při zbylých dvou zkoumaných hodnotách (pH 5,4 a 7,0). Další signifikantní snížení bylo zaznamenáno při teplotě  $11 \text{ }^\circ\text{C}$ . Bakteriální kultura *L. casei* CCDM 198 snížila koncentraci histaminu téměř o 36 % nezávisle na pH ve srovnání v čase 0. K významné redukci došlo i při zkoumané teplotě  $23 \text{ }^\circ\text{C}$  v médiu o pH 6,2 (snížení o více než 32 %) a pH 7,0 (snížení o více než 27 %) na konci kultivace (po 96 hodinách). Jak lze vyčíst z Obr. 4.4 při vyšší počáteční koncentraci nebyl ve většině případů detekován úbytek histaminu o více než 20 %, s výjimkou následujících kombinací podmínek: kultivační teplota  $11 \text{ }^\circ\text{C}$  a  $23 \text{ }^\circ\text{C}$  v médiu o pH 6,4 a teplota  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  v médiu o pH 5,4 (úbytek přibližně o 24 %).



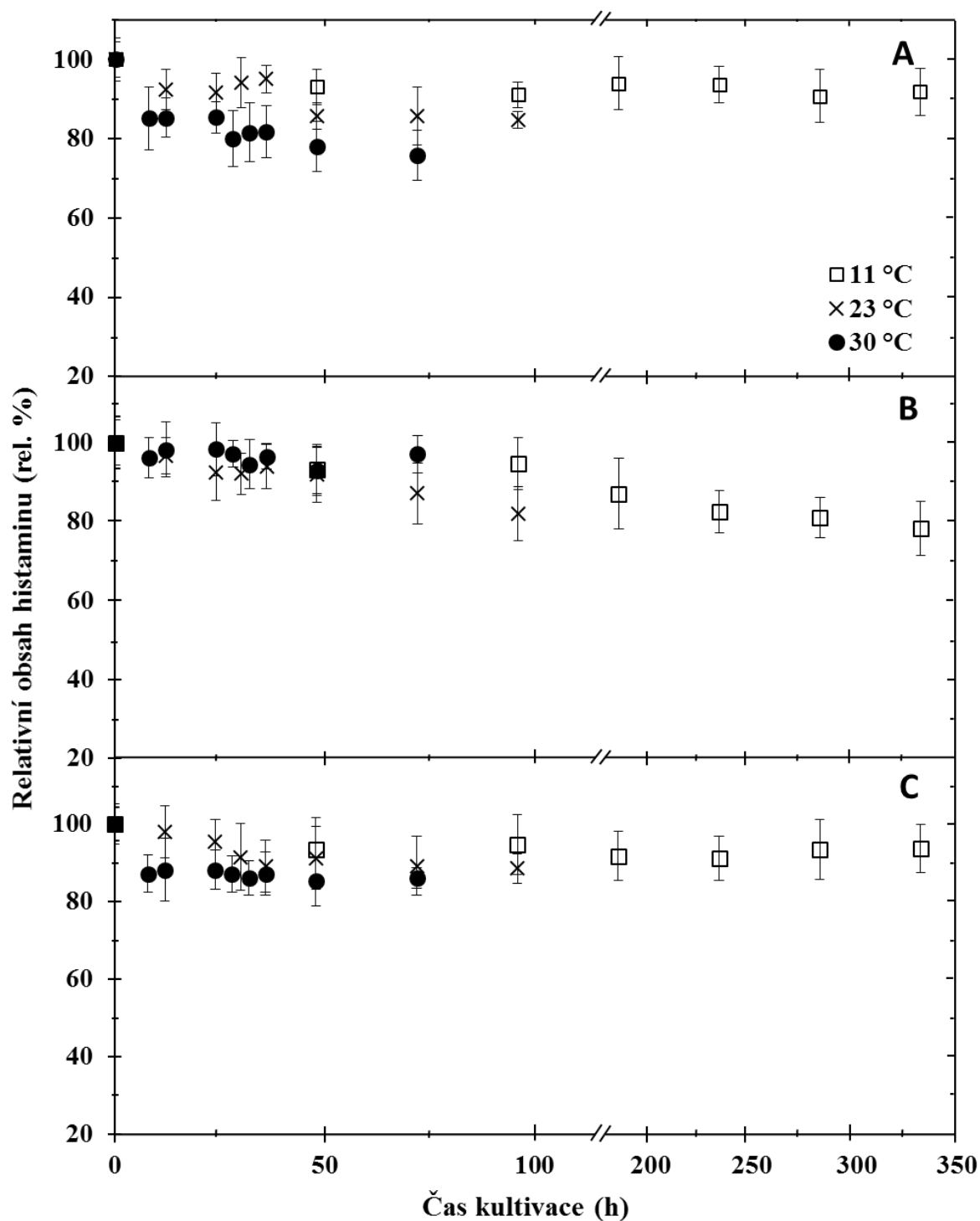
Obr. 3.1: Vývoj relativního obsahu histaminu (rel. %) při degradaci bakterií *Lactobacillus casei* CCDM 198 v úplném MRS bujónu s počáteční koncentrací histaminu  $0,2 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  v závislosti na době kultivace (h) pro inkubační teploty  $11 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $23 \text{ }^\circ\text{C}$  a  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ ; počáteční relativní obsah histaminu v čase nula byl vždy 100 %. Inkubace byla prováděna při  $\text{pH} = 5,4$  (části A),  $\text{pH} = 6,2$  (části B) a  $\text{pH} = 7,0$  (části C). Výsledky jsou prezentovány pomocí průměrů a standardních odchylek (sloupce;  $n = 6$ ).



Obr. 3.2: Vývoj relativního obsahu histaminu (rel. %) při degradaci bakterií *Lactocaseibacillus casei* CCDM 198 v úplném MRS bujónu s počáteční koncentrací histaminu  $0,4 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  v závislosti na době kultivace (h) pro inkubační teploty  $11 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $23 \text{ }^\circ\text{C}$  a  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ ; počáteční relativní obsah histaminu v čase nula byl vždy 100 %. Inkubace byla prováděna při  $\text{pH} = 5,4$  (části A),  $\text{pH} = 6,2$  (části B) a  $\text{pH} = 7,0$  (části C). Výsledky jsou prezentovány pomocí průměrů a standardních odchylek (sloupce;  $n = 6$ ).



Obr. 3.3: Vývoj relativního obsahu histaminu (rel. %) při degradaci bakterií *Lacticaseibacillus casei* CCDM 198 v neúplném MRS bujónu s počáteční koncentrací histaminu  $0,2 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  v závislosti na době kultivace (h) pro inkubační teploty  $11 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $23 \text{ }^\circ\text{C}$  a  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ ; počáteční relativní obsah histaminu v čase nula byl vždy 100 %. Inkubace byla prováděna při pH = 5,4 (části A), pH = 6,2 (části B) a pH = 7,0 (části C). Výsledky jsou prezentovány pomocí průměrů a standardních odchylek (sloupce;  $n = 6$ ).



Obr. 3.4: Vývoj relativního obsahu histaminu (rel. %) při degradaci bakterií *Lacticaseibacillus casei* CCDM 198 v neúplném MRS bujónu s počáteční koncentrací histaminu  $0,4 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  v závislosti na době kultivace (h) pro inkubační teploty 11 °C, 23 °C a 30 °C; počáteční relativní obsah histaminu v čase nula byl vždy 100 %. Inkubace byla prováděna při pH = 5,4 (části A), pH = 6,2 (části B) a pH = 7,0 (části C). Výsledky jsou prezentovány pomocí průměrů a standardních odchylek (sloupce; n = 6).

### 3.1.2 Vliv faktorů na redukci ostatních biogenních aminů *in vitro*

#### Tyramin

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

#### a) Kultivace v úplném MRS bujónu:

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

#### b) Kultivace v neúplném MRS bujónu:

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

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

#### Putrescin

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

o více než 31 % v kultivačním médiu s počáteční koncentrací putrescinu  $0,4 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  při všech testovaných hodnotách pH kultivačního média.

Naopak nižší počáteční koncentrace putrescinu ( $0,2 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ ) byla vhodnější pro *L. casei* CCDM 198 při podmínkách v kultivačním médiu se sníženým množstvím živin (v neúplném MRS bujónu). Nejsignifikantnější úbytek putrescinu za těchto podmínek byl zaznamenán při teplotě  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  v médiu o pH 6,2 s počáteční koncentrací aminu  $0,2 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ . Teplota  $11 \text{ }^\circ\text{C}$  také podporovala redukční schopnost zkoumané bakterie, kdy snížení koncentrace na konci kultivace bylo v rozmezí od 27 % až po 44 %. Nejméně vhodné podmínky pro redukci putrescinu bakterií *L. casei* CCDM 198 byly detekovány při teplotě  $23 \text{ }^\circ\text{C}$ . Kombinace všech zkoumaných faktorů při této teplotě dosahovaly maximální redukce pouze o 21 %. V neúplném MRS bujónu při vyšší zkoumané počáteční koncentraci putrescinu ( $0,4 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ ) redukce při testovaných podmínkách nepřesáhla 27 %.

### **Kadaverin**

Dalším zkoumaným biogenním aminem, který může negativně ovlivňovat kvalitu potravin, byl kadaverin. Největší redukce v úplném MRS bujónu byla dosažena při kultivační teplotě  $11 \text{ }^\circ\text{C}$  o pH 5,4 s vyšší zkoumanou počáteční koncentrací kadaverinu. Za těchto podmínek byl detekován úbytek o více než 44 % na konci kultivace. Signifikantní redukce byla také zjištěna i při zbylých dvou hodnotách pH v médiu s vyšší počáteční koncentrací, a to úbytek v rozmezí od 28 % až do téměř 33 %. Naopak při nižší počáteční koncentraci za těchto podmínek při teplotě  $11 \text{ }^\circ\text{C}$  úbytek kadaverinu nepřesáhl 17 %. Teplota  $23 \text{ }^\circ\text{C}$  také podporovala degradační schopnost studované bakterie. Při této teplotě byl zjištěn signifikantní úbytek kadaverinu rozmezí 17 % až téměř 33 % v závislosti na kombinaci jednotlivých faktorů. Při teplotě  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  bakterie *L. casei* CCDM 198 významně katalyzovala koncentraci putrescinu v MRS bujónu o pH 5,4 s počáteční koncentrací  $0,4 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  (redukce o 34 %) a v MRS bujónu o pH 7,0 s nižší počáteční koncentrací (redukce o 30 %) na konci kultivace. V ostatních případech při této teplotě byl zaznamenán maximální úbytek o 20 %.

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



## Fenylethylamin

Posledním zkoumaným biogenním aminem byl fenylethylamin. Redukce fenylethylaminu za většiny testovaných podmínek redukce fenylethylaminu bakterií *L. casei* CCDM 198 nepřesáhla 20 % s výjimkou níže uvedených podmínek:

### a) Kultivace v úplném MRS bujónu:

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

### b) Kultivace v neúplném MRS bujónu:

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

### 3.1.3 Vliv cysteinu na redukci biogenních aminů

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

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

## **3.2 Výsledky experimentu II – Vliv technologických parametrů na degradační schopnost *Lacticaseibacillus casei* v mléce**

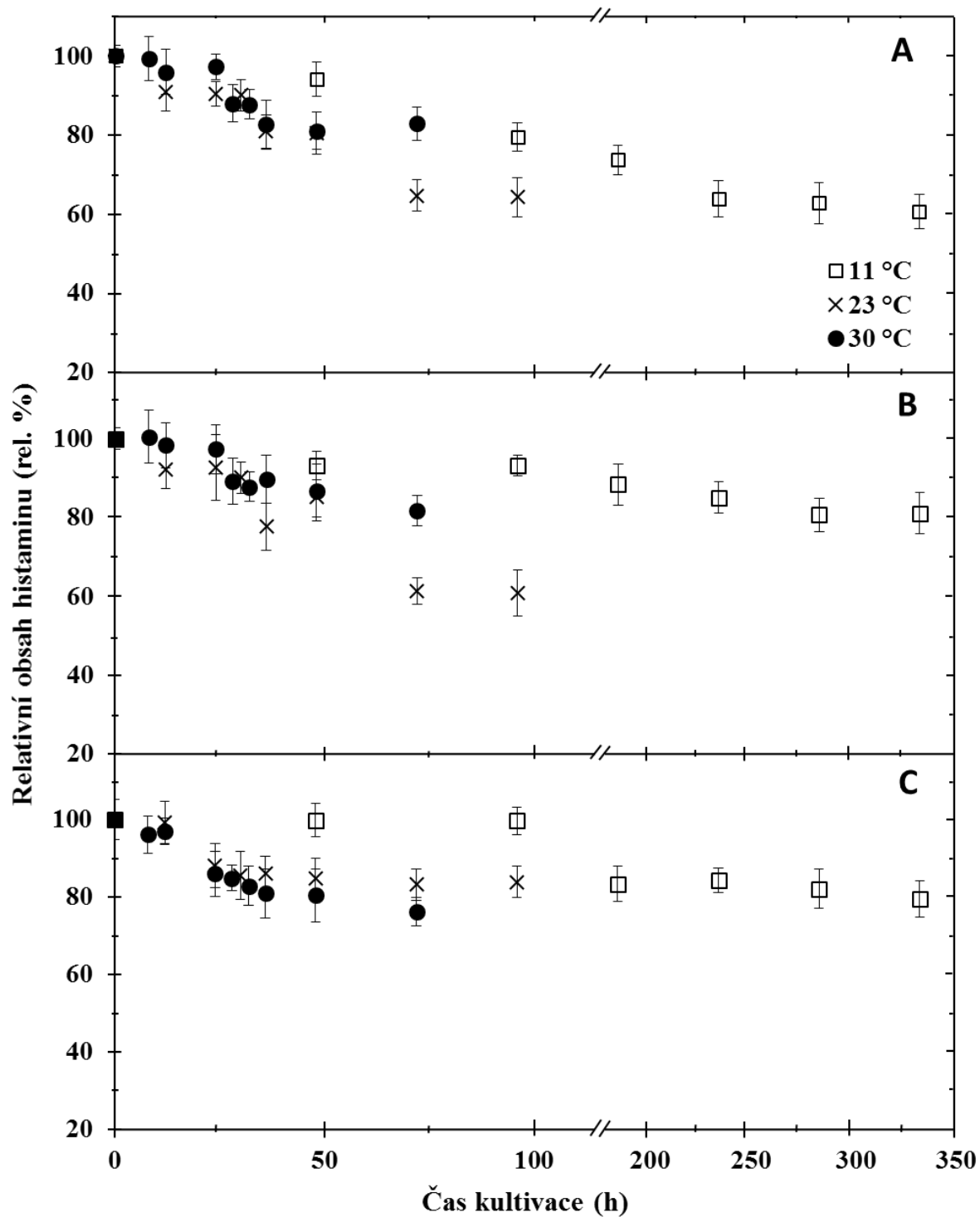
Předchozí výsledky z experimentu I bylo potřeba ověřit i v reálné potravíně. Proto součástí experimentální části disertační práce byla také zjišťována schopnost *Lacticaseibacillus casei* CCDM 198 degradovat biogenní aminy v mléce za různých podmínek.

### **3.2.1 Vliv faktorů na redukci histaminu v mléce**

Vliv *L. casei* CCDM 198 na relativní koncentraci histaminu v mléce je graficky znázorněn na Obr. 3.5. V mléce došlo k signifikantnímu snížení ( $P < 0,05$ ) histaminu během kombinací všech studovaných faktorů, a to v rozmezí od 16 % do 39 % ve srovnání s počáteční koncentrací v čase 0. Nejvhodnější podmínky pro redukci bakterií *L. casei* CCDM 198 byly zaznamenány v mléce o pH 5,4 při kultivační teplotě 11 °C, stejně tak i při kultivaci o teplotě 23 °C; a v mléce s pH hodnotou 6,2 při teplotě 23 °C na konci doby kultivace (po 336 hodinách resp. po 86 hodinách).

### **3.2.2 Vliv faktorů na redukci tyraminu v mléce**

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



Obr. 3.5: Vývoj relativního obsahu histaminu (rel. %) při degradaci bakterií *Lactocaseibacillus casei* CCDM 198 v mléce. Kultivace probíhaly za teploty 11 °C, 23 °C a 30 °C v mléce o pH 5,4 (část A); 6,2 (část B) a 7,0 (část C). Počáteční relativní obsah histaminu v čase nula byl vždy 100 %. Výsledky jsou prezentovány pomocí průměrů a standardních odchylek (sloupce; n = 6).

### 3.2.3 Redukce putrescinu v mléce

*L. casei* CCDM 198 významně ( $P < 0,05$ ) degradoval putrescin za všech testovaných kultivačních podmínek (snížení putrescinu se na konci inkubace pohybovala od 25 % do téměř 49 %). Nejvhodnější podmínky pro redukci putrescinu byly zjištěny v mléce o pH 5,4 a 6,2. Při těchto hodnotách pH mléka došlo ke snížení o více než 34 % při teplotě 30 °C a téměř o 49 % při teplotě 23 °C a 11 °C. Nejméně vhodné podmínky byly zaznamenány u mléka při pH 7, kdy pokles putrescinu nepřesáhl 27 % při všech testovaných teplotách.

### 3.2.4 Redukce kadaverin v mléce

Relativní úbytek v časovém intervalu za výše uvedených kultivačních podmínek byl také zmapován u kadaverinu. *L. casei* CCDM 198 má významnou redukční schopnost vůči kadaverinu při všech studovaných kombinacích, kdy redukce kadaverinu se pohybovala v rozmezí od 30 % po 40 % na konci kultivace ve srovnání s počáteční koncentrací v čase 0.

### 3.2.5 Redukce fenylethylaminu v mléce

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

### 3.3 Experiment III – detekce aktivity multicopperoxidázy

Schopnost redukovat biogenní aminy souvisí s aktivitou enzymu multicopperoxidázy (MCO), subtypu lakázy. Pro podporu výsledků získaných z HPLC z předchozích experimentů se předložená disertační práce v rámci experimentu III zaměřila na detekci tohoto enzymu a jeho enzymatické aktivity u studovaného bakteriálního kmene *Lactocaseibacillus casei* CCDM 198. Detekce enzymu byla provedena z bezbuněčného extraktu získaného z bakteriální kultury po 0, 24, 48 a 72hodinové kultivaci při teplotě  $30 \pm 1$  °C. Pro studium byly použity dvě metody, které bylo potřeba nejprve zoptimalizovat a nově zavést podle metodiky Callejón et al., (2014, 2017).

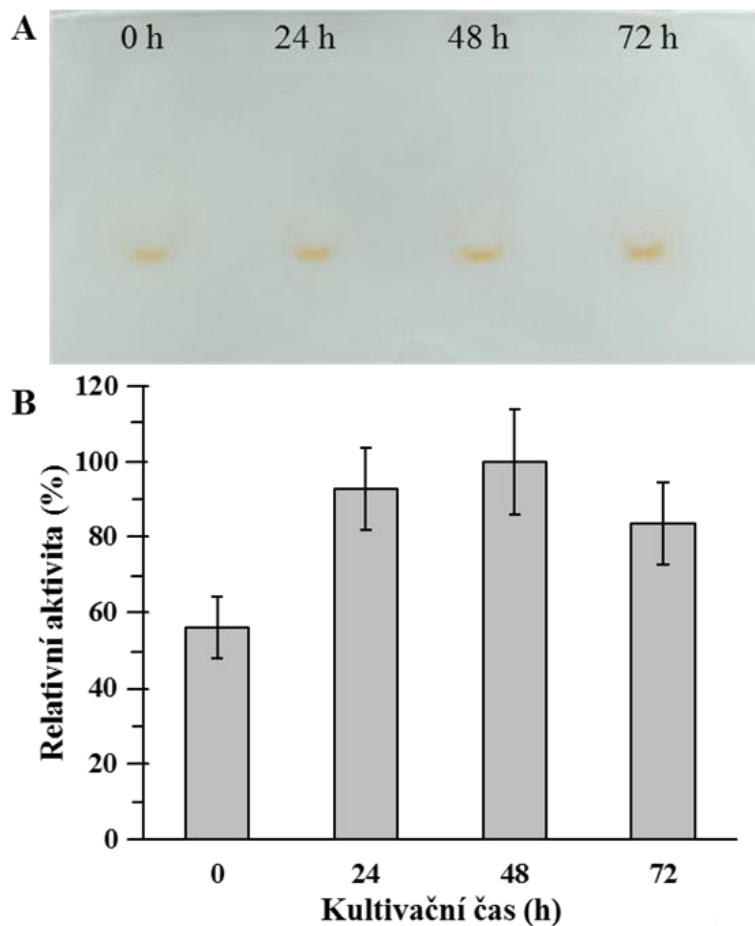
#### 3.3.1 Stanovení přítomnosti enzymu multicopperoxidázy v gelu

První zvolenou metodou bylo stanovení přítomnosti enzymu MCO v polyakrylamidovém gelu po elektroforéze za nativních podmínek. Díky nedenedaturujícímu prostředí, které je zajištěno během separace, si protein zachovává svou přirozenou strukturu a své vlastnosti včetně jeho katalytické aktivity. Po elektroforetické separaci byla přítomnost MCO dokázána enzymatickou reakcí s 2,6-dimethoxyfenolem (DMP), který je typickým substrátem pro lakázu. Výsledky jsou znázorněny na Obr. 3.6A. Jak lze vidět, pozitivní reakce byla odhalena hnědo-oranžovým zabarvením způsobeným oxidací substrátu DMP enzymem lakázou. Přítomnost a aktivita tohoto enzymu byla ve studovaném kmeni prokázána ve všech testovaných časech kultivace (0, 24, 48 a 72 h). Přestože byla detekována aktivita enzymu, na základě získaných výsledků se nám nepodařilo jednoznačně nalézt statisticky významné rozdíly v aktivitě enzymu v průběhu kultivace. Z tohoto důvodu, a také pro potvrzení výsledků z nativního gelu dokazující přítomnost enzymu MCO u kmene *L. casei* CCDM 198 byla použita i další metoda.

#### 3.3.2 Spektrofotometrické stanovení:

Druhou zvolenou metodou pro detekci aktivity MCO bylo spektrometrické stanovení (Obr. 3.6B). Změny aktivity enzymu v časovém průběhu po 0, 24, 48 a 72 hodinách inkubace jsou graficky znázorněny na Obr. 3.6B. Naměřená hodnota aktivity enzymu v průběhu času je vynesena jako procentuální relativní aktivita vztažena k maximální naměřené aktivitě vyjádřena jako 100 % (% relativní aktivity). Stejně jako v prvním případě při stanovení přítomnosti enzymu v gelu byla u studovaného kmene detekována přítomnost a aktivita enzymu MCO. Navíc, což se nepodařilo v gelu (Obr. 3.6A) jednoznačně prokázat, pomocí spektrofotometrického stanovení byly detekovány změny v aktivitě enzymu v závislosti na čase. Jak lze vyčíst z grafu, došlo ke statisticky významnému ( $P < 0,05$ ) nárůstu enzymové aktivity ve všech časech (po 24,

48 a 72 hodinách kultivace) ve srovnání s kontrolou (čas 0 h). Už po 24hodinové inkubaci došlo k významnému zvýšení aktivity enzymu a zároveň nejvyšší aktivita byla zjištěna po 48 hodinách kultivace, kdy došlo k více než 45% zvýšení aktivity ve srovnání s počátečním časem 0.



Obr. 3.6: Detekce přítomnosti enzymu multicopperoxidázy (MCO) a jeho enzymatické aktivity u bakteriálního kmene *Lacticaseibacillus casei* CCDM 198 v čase kultivace 0, 24, 48 a 72 hodin. Část A popisuje přítomnost enzymu MCO v polyakrylamidovém gelu po elektroforéze za nativních podmínek vůči substrátu DMP. Pozitivní reakce je prokázána oranžově žlutým bandem. Část B graficky znázorňuje spektrofotometrickou detekci změny % relativní aktivity enzymu MCO v čase při oxidaci substrátu ABTS. Absorbance byla měřena při vlnové délce 420 nm. Aktivita enzymu v průběhu času je vyjádřena jako procentuální relativní aktivita vztahena k maximální naměřené aktivitě 100 % (% relativní aktivity). Výsledky byly vyjádřeny pomocí průměrů a standardních odchylek.

## 4. DISKUSE

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

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

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

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

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



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

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

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

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

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

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

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

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

## 5. ZÁVĚR

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

Z výsledků a diskuse práce vyplývají následující závěry:

- U kmenu *L. casei* CCDM 198 byla potvrzena degradační aktivita *in vitro* vůči všem studovaným biogenním aminům, kdy největší redukční schopnost byla zjištěna vůči kadaverinu (redukce až o 73 %), následně histaminu (redukce o 70 %), tyraminu (úbytek o 69 %), putrescinu (o 67 %) a fenylethylaminu (snížení o 55 %).
- Schopnost odbourávat všechny studované biogenní aminy kmenem *L. casei* CCDM 198 byla potvrzena a zmapována také v reálné potravíně. Zde byla pozorována nižší degradační schopnost ve srovnání s redukční schopností bakterie rostoucí v kultivačním médiu. V mléce docházelo k maximálnímu úbytku putrescinu až o 48 %, kadaverinu až o 40 %, histaminu o 39 %, fenylethylaminu o 32 %. Nejméně byl redukován tyramin, u kterého došlo k redukci nanejvýš o 19 %.
- Bylo prokázáno, že degradace všech jednotlivých biogenních aminů závisí na technologických faktorech, kdy nevhodně zvolená kombinace faktorů nepodporuje degradační schopnost bakterie *L. casei* CCDM 198.
- Byla zjištěna rozdílná schopnost bakterie *L. casei* CCDM 198 degradovat jednotlivé aminy při stejných technologických podmínkách jak *in vitro*, tak i v reálné potravíně.
- Přídavek cysteinu do MRS bujónu měl signifikantní ( $P < 0,05$ ) vliv na redukcii všech studovaných BA, avšak kombinace jednotlivých faktorů s cysteinem redukcii významně nezvyšovaly.
- Byla prokázána přítomnost a aktivita enzymu multicopperoxidázy (MCO), subtypu lakázy u studovaného kmene *L. casei* CCDM 198 pomocí spektrofotometrického stanovení a detekce v nativním polyakrylamidovém gelu.
- Na základě spektrofotometrického měření byly zjištěny také rozdíly v aktivitě enzymu MCO v závislosti na čase kultivace.
- Nejvyšší aktivita enzymu MCO byla detekována po 48 hodinách kultivace, kdy došlo k více než 45% zvýšení aktivity ve srovnání s počátečním časem 0.

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

## 6. PŘÍNOS PRO VĚDU A PRAXI

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

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

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

## SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- ADÁMEK, R., PACHLOVÁ, V., SALEK, R.N., NĚMEČKOVÁ, I., BUŇKA, F., BUŇKOVÁ, L. (2021). Reduction of biogenic amine content in Dutch-type cheese as affected by the applied adjunct culture. *LWT - Food Science and Technology*. 152, 112397. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112397>
- ALVAREZ, M.A., MORENO-ARRIBAS, M.V. (2014). The problem of biogenic amines in fermented foods and the use of potential biogenic amine-degrading microorganisms as a solution. *Trends in Food Science*. 39(2), 146-155. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2014.07.007>
- BENEŠ, Š. Skrining vybraných bakterií využívaných v mlékárenství na schopnost degradace biogenních aminů. Zlín, 2018. Bakalářská práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta technologická, Ústav technologie potravin.
- BUŇKOVÁ, L., BUŇKA, F., MANTLOVÁ, G., ČÁBLOVÁ, A., SEDLÁČEK, I., ŠVEC, P., PACHLOVÁ, V., KRÁČMAR, S. (2010). The effect of ripening and storage conditions on the distribution of tyramine, putrescine and cadaverine in Edam-cheese. *Food Microbiology*. 27, 880-888. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.04.014>
- BRADFORD, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72, 248-254. <https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>
- CALLEJÓN, S., SENDRA, R., FERRER, S., PARDO, I. (2014). Identification of a novel enzymatic activity from lactic acid bacteria able to degrade biogenic amines in wine. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 98, 185-198. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-4829-6>
- CALLEJÓN, S., SENDRA, R., FERRER, S., PARDO, I. (2015). Ability of *Kocuria varians* LTH 1540 To Degrade Putrescine: Identification and Characterization of a Novel Amine Oxidase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 63(16), 4170-4178. <https://doi.org/10.1021/jf5026967>
- CALLEJÓN, S., SENDRA, R., FERRER, S., PARDO, I. (2016). Cloning and characterization of a new laccase from *Lactobacillus plantarum* J16 CECT 8944 catalyzing biogenic amines degradation. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 100, 3113-3124. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-7158-0>
- CALLEJÓN, S., SENDRA, R., FERRER, S., PARDO, I. (2017). Recombinant laccase from *Pediococcus acidilactici* CECT 5930 with ability to degrade tyramine. *PLOS One*. 12(10), 186019. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0186019>
- CAPOZZI, V., RUSSO, P., LADERO, V., FERNÁNDEZ, M., FIOCCO, D., ALVAREZ, M.A., GRIECO, F., SPANO, G. (2012). Biogenic amines degradation by *Lactobacillus plantarum*: Toward a potential application in wine. *Frontiers in Microbiology*. 3, 1-6. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00122>
- COMAS-BASTÉ, O., SÁNCHEZ-PÉREZ, S., VECIANA-NOGUÉS, M.T., LATORRE-MORATALLA, M., VIDAL-CAROU, M.C. (2020). Histamine Intolerance: The Current State of the Art. *Biolomecules*. 10, 1181. <https://doi.org/10.3390/biom10081181>

- DADÁKOVÁ, E., KRÍŽEK, M., PELIKÁNOVÁ, T. (2009). Determination of biogenic amines in foods using ultra performance liquid chromatography (UPLC). *Food Chemistry*. 116(1), 365-370. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.02.018>
- DAPKEVICIUS, M.L.N.E., NOUT, M.J.R., ROMBOUTS, F.M., HOUBEN, J.H., WMENGA, W. (2000). Biogenic amine formation and degradation by potential fish silage starter microorganisms. *International Journal of Food Microbiology*. 57, 107-114. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(00\)00238-5](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00238-5)
- 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 Microbiolog and Biotechnology*. 25(9), 1519-1527. <https://doi.org/10.4014/jmb.1506.06006>
- EFSA (2020). The 2019 updated list of QPS status recommended biological agents in support of EFSA risk assessments. *EFSA Journal*. 17, 1-5. <https://doi.org/10.5281/zenodo.3648682>
- FERNÁNDEZ, M., FLÓREZ, A.B., LINARES, D.M., MAYO, B., ALVAREZ, M.A. (2006). Early PCR detection of tyramine-producing bacteria during cheese production. *Journal of Dairy Research*. 73, <https://doi.org/318-321>. 10.1017/S0022029906001750
- FERNÁNDEZ, M., LINARES, D.M., RODRÍGUEZ, A., ALVAREZ, M.A. (2007). Factors affecting tyramine production in *Enterococcus durans* IPLA 655. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 73, 1400-1406. <https://doi.org/10.1007/s00253-006-0596-y>
- GARCÍA-RUIZ, A., GONZÁLEZ-ROMPINELLI, E.M., BARTOLOMÉ, B., MORENO-ARRIBAS, V. (2011). Potential of wine-associated lactic acid bacteria to degrade biogenic amines. *International Journal of Food Microbiology*. 148 115-120. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.05.009>
- GARDINI, F., MARTUSCELLI, M., CARUSO, M.C., GALGANO, F., CRUDELE, M.A., FAVATI, F., GUERZONI, M.E., SUZZI, G. (2001). Effect of pH, temperature and NaCl concentration on the growth kinetic, proteolytic activity and biogenic amines production of *Enterococcus faecalis*. *International Journal of Food Microbiology*. 64, 105-117. [https://doi.org/10.1016/s0168-1605\(00\)00445-1](https://doi.org/10.1016/s0168-1605(00)00445-1)
- GARDINI, F., MARTUSCELLI, M., CRUDELE, M.A., PAPERELLA, A., SUZZI, G. (2002). Use of *Staphylococcus xylosus* as a starter culture in dried sausages: effect on the biogenic amine content. *Meat Science*. 61(3), 275-283. [https://doi.org/10.1016/s0309-1740\(01\)00193-0](https://doi.org/10.1016/s0309-1740(01)00193-0)
- GUARCELLO, R., DE ANGELIS, M., SETTANNI, L., FORMIGLIO, S., GAGLIO, R., MINERVINI, F., MOSCHETTI, G., GOBBETTI, M. (2016). Selection of amine-oxidizing dairy lactic acid bacteria and identification of the enzyme and gene involved in the decrease of biogenic amines. *Applied and Environmental Microbiology*. 82, 6870-6880. <https://doi.org/10.1128/AEM.01051-16>
- HERRERO-FRESNO, A., MARTÍNEZ, N., SÁNCHEZ-LLANA, E., DÍAZ, M., FERNÁNDEZ, M., MARTIN, M.C., LADERO, V., ALVAREZ, M.A. (2012). *Lactobacillus casei* strains isolated from cheese reduce biogenic amine accumulation in an experimental model. *International Journal of Food Microbiology*. 157(2), 297-304. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.06.002>



- KIM, J.H., AHN, H.J., JO, C., PARK, H.J., CHUNG, Y.J., BYUN, M.W. (2004). Radiolysis of biogenic amines in model system by gamma irradiation. *Food Control*. 15(5), 405-408. [https://doi.org/10.1016/S0956-7135\(03\)00102-6](https://doi.org/10.1016/S0956-7135(03)00102-6)
- LADERO, V., FERNÁNDEZ, M., CUESTA, I., ALVAREZ, M.A. (2010). Quantitative detection and identification of tyramine-producing enterococci and lactobacilli in cheese by multiplex qPCR. *Food Microbiology*. 27, 933-939. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.05.026>
- LEE, Y.CH., KUNG, H.F., HUANG, Y.L., WU, CH.H., HUANG, Y.R., TSAI, Y.H. (2016). Reduction of Biogenic Amines during Miso Fermentation by *Lactobacillus plantarum* as a Starter Culture. *Journal of Food Protection*. 79(9), 1556–1561. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-16-060>
- LI, X., YU, Z., ZHU, Y., CAO, Z. (2020) Selection of nitrite-degrading and biogenic amine-degrading strains and its involved genes. *Food Quality and Safety*. 4, 225-235. <https://doi.org/10.1093/fqsafe/fyaa027>
- LINARES, D.M., MARTÍN, M.C., LADERO, V., ÁLAVAREZ, M.A., FERNÁNDEZ, M.M. (2011). Biogenic Amines in Dairy Products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 51(7), 691-703. <https://doi.org/10.1080/10408398.2011.582813>
- LINARES, D.M., DEL RÍO, B., LADERO, V., MARTÍNEZ, N., FERNÁNDEZ, M.M., MARTÍN, M.C., ÁLAVAREZ, M.A. (2012). Factors influencing biogenic amines accumulation in dairy products. *Frontiers in Microbiology*. 3, 180. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00180>
- LOZO, J., BEGOVIČ, J., JOVČIČ, B., GOLIČ, N., TOPISIROVIČ, I. (2008). Effect of methionine and cysteine deprivation on growth of different natural isolates of *lactobacillus* spp. in chemically defined media. *Archives of Biological Sciences*. 60(4), 509-517. <https://doi.org/10.2298/ABS0804509L>
- MARTUSCELLI, M., CRUDELE, M.A., GARDINI, F., SUZZI, G. (2000). Biogenic amine formation and oxidation by *Staphylococcus xylosus* strains from artisanal fermented sausages. *Letters in Applied Microbiology*. 31(3), 228-232. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2000.00796.x>
- MUROOKA, Y., DOI, N., HARADA, T. (1979). Distribution of membrane-bound monoamine oxidase in bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. 38(4), 565-569. <https://doi.org/10.1128/aem.38.4.565-569.1979>
- NAŘÍZENÍ KOMISE (ES) č. 2073/2005 ze dne 15. listopadu 2005 o mikrobiologických kritériích pro potraviny. Dostupné [online] z: <https://eur-lex.europa.eu/legalcontent/CS/TXT/PDF/?uri=CELEX:02005R2073-20130701&from=ET>
- NI, X., CHEN, J., DU, G., FANG, F. (2022). Food-grade expression of multicopper oxidase with improved capability in degrading biogenic amines. *Systems Microbiology and Biomanufacturing*. 2, 285-295. <https://doi.org/10.1007/s43393-021-00061-9>
- NOVELLA-RODRÍGUEZ, S., VECIANA-NOGUÉS, M.T., IZQUIERDO-PULIDO, M., VIDAL-CAROU, M.C. (2003). Distribution of biogenic amines and polyamines in cheese.

*Journal of Food Science.* 68, 750-755. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2003.tb08236.x>

- OLMEDA, I., CASINO, P., COLLINS, R.E., SENDRA, R., CALLEJÓN, S., HUESA, J., SOARES, A.S., FERRER, S., PADRO, I. (2021). Structural analysis and biochemical properties of laccase enzymes from two *Pediococcus* species. *Microbial Biotechnology.* 14(3), 1026-1043. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13751>
- PAPAGEORGIU, M., LAMBROPOULOU, D., MORRISON, C., KLODZINSKA, E., NAMIESNIK, J., PLOTKA-WASYLKA, J. (2018). Literature update of analytical methods for biogenic amines determination in food and beverages. *Trends in Analytical Chemistry.* 98, 128-142. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2017.11.001>
- PAPAVERGOU, E.J., SAVVAIDIS, I.N., AMBROSIADIS, I.A. (2012). Levels of biogenic amines in retail market fermented meat products. *Food Chemistry.* 135, 2750-2755. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.07.049>
- PIŠTĚKOVÁ, H., JANČOVÁ, P., BERČÍKOVÁ, L., BUŇKA, F., SOKOLOVÁ, I., ŠOPÍK, T., MARŠÁLKOVÁ, K., PACHECO DE AMARAL, O.M.R., BUŇKOVÁ, L. (2020). Application of qPCR for multicopper oxidase gene (MCO) in biogenic amines degradation by *Lactobacillus casei*. *Food Microbiology.* 91, 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2020.103550>
- RABIE, M.A., SILIHA, H., EL-SAIDY, S., EL-BADAWY, A.A., MALCATA, F.X. (2011). Reduced biogenic amine contents in sauerkraut via addition of selected lactic acid bacteria. *Food Chemistry.* 129, 1778-1782. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.05.106>
- ROSEIRO, C., SANTOS, C., SOL, M., SILVA, L., FERNANDES, I. (2006). Prevalence of biogenic amines during ripening of a traditional dry fermented pork sausage and its relation to the amount of sodium chloride added. *Meat Science.* 74, 557-563. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2006.03.030>
- SANTOS, M.H.S. (1996) Biogenic amines: their importance in foods. *International Journal of Food Microbiology.* 29(2-3), 213-231. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(95\)00032-1](https://doi.org/10.1016/0168-1605(95)00032-1)
- SARKADI, L.S. (2019). Amino acids and biogenic amines as food quality factors. *Pure and Applied Chemistry.* 91(2), 289-300. <https://doi.org/10.1515/pac-2018-0709>
- SEKIGUCHI, Y., MAKITA, H., YAMAMURA, A., MATSUMOTO, K. (2004). A thermostable histamine oxidase from *Arthrobacter crystallopoietes* KAIT-B-007. *Journal of Bioscience and Bioengineering.* 97(2), 104-110. [https://doi.org/10.1016/S1389-1723\(04\)70176-0](https://doi.org/10.1016/S1389-1723(04)70176-0)
- SHU, G., YANG, H., TAO, Q., HE, CH. (2013). Effect of Ascorbic Acid and Cysteine Hydrochloride on Growth of *Bifidobacterium bifidum*. *Advance Journal of Food Science and Technology.* 5(6), 678-681. <http://dx.doi.org/10.19026/ajfst.5.3148>
- SMĚLÁ, D., PECHOVÁ, P., KOMPRDA, T., KLEJDUS, B., KUBÁŇ, V. (2004). Chromatografické stanovení biogenních aminů v trvanlivých salámech během fermentace a skladování. *Chemické listy.* 98, 432-437.

- SOKOLOVÁ, I. (2018). Možnosti snížení obsahu biogenních aminů bakteriemi izolovanými z potravin. Zlín, 2019. Diplomová práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta technologická, Ústav technologie potravin.
- SPANO, G., RUSSO, P., LONVAUD-FUNEL, A., LUCAS, P., ALEXANDRE, H., GRANDVALET, C., COTON, E., COTON, M., BARNAVONS, L., BACH, B., RATTRAY, F., BUNTE, A., MAGNI, C., LADERO, V., ALVAREZ, M., FERNÁNDEZ, M., LOPEZ, P., DE PALENCIA, P.F., CORBI, A., TRIP, H., LOLKEMA, J.S., (2010). Biogenic amines in fermented foods. *European Journal of Clinical Nutrition*. 64, 95-100. <https://doi.org/10.1038/ejcn.2010.218>
- TEPKASIKUL, P., SANTIYANONT, P., BOONCHAROEN, A., ABHISINGHA, M., MHUANTONG, W., CHANTARASAKHA, K., PITAKSUTHEEPONG, CH., VISESSANGUAN, W., TEPAAMORNDECH, S. (2022). The functional starter and its genomic insight for histamine degradation in fish sauce. *Food Microbiology*. 104, 103988. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2022.103988>
- TITTARELLI, F., PERPETUINI, G., DI GIANVITO, P., TOFALO, R. (2019). Biogenic amines producing and degrading bacteria: A snapshot from raw ewes' cheese. *LWT- Food Science and Technology*. 101, 1-9. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2018.11.030>
- VALSAMAKI, K., MICHAELIDOU, A., POLYCHRONIADOU, A. (2000). Biogenic amine production in Feta cheese. *Food Chemistry*. 71, 259-266. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(00\)00168-0](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(00)00168-0)
- WANG, X., ZHAO, Y., ZHANG, S., LIN, X., LIANG, H., CHEN, Y., JI, C. (2022). Heterologous Expression of the *Lactobacillus sakei* Multiple Copper Oxidase to Degrade Histamine and Tyramine at Different Environmental Conditions. *Foods*. 11, 3306. <https://doi.org/10.3390/foods11203306>
- ZAMAN, M.Z., ABU BAKAR, F., SELAMAT, J., BAKAR, J. (2010). Occurrence of biogenic amines and amines degrading bacteria in fish sauce. *Czech Journal of Food Sciences*. 28, 440-449. <https://doi.org/10.17221/312/2009-CJFS>
- ZAMAN, M.Z., ABU BAKAR, F., JINAP, S., BAKAR, J. (2011). Novel starter cultures to inhibit biogenic amines accumulation during fish sauce fermentation. *International Journal of Food Microbiology*. 145, 84-91. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.11.031>

## SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

ABTS	2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonová kyselina)
AMK	Aminokyselina
AO	Aminooxidáza
BA	Biogenní aminy
CCDM	Culture Collection of Dairy Microorganisms
DMP	2,6-dimethoxyfenol
EC	Evropská komise
GRAS	Generally recognized as safe
HPLC/DAD	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie s detektorem diodového pole
MCO	Multicopper oxidáza
MRS	De Man, Rogosa a Sharpe agar/médium
PMSF	fenylmethylsulfonylfluorid
QPS	Qualified Presumption of Safety lists

## SEZNAM OBRÁZKŮ

- Obr. 2.1: Schématické shrnutí metodického postupu při studiu vlivu vybraných faktorů na redukční schopnosti bakterie *Lactocaseibacillus casei* CCDM 198 v kultivačním MRS bujónu.....13*
- Obr. 2.2: Schématické shrnutí metodického postupu při studiu vlivu vybraných faktorů na redukční schopnosti bakterie *Lactocaseibacillus casei* CCDM 198 v mléce.....14*
- Obr. 3.1: Vývoj relativního obsahu histaminu (rel. %) při degradaci bakterií *Lactocaseibacillus casei* CCDM 198 v úplném MRS bujónu s počáteční koncentrací histaminu 0,2 g·l<sup>-1</sup> v závislosti na době kultivace (h) pro inkubační teploty 11 °C, 23 °C a 30 °C; počáteční relativní obsah histaminu v čase nula byl vždy 100 %. Inkubace byla prováděna při pH = 5,4 (části A), pH = 6,2 (části B) a pH = 7,0 (části C). Výsledky jsou prezentovány pomocí průměrů a standardních odchylek (sloupce; n = 6).....18*
- Obr. 3.2: Vývoj relativního obsahu histaminu (rel. %) při degradaci bakterií *Lactocaseibacillus casei* CCDM 198 v úplném MRS bujónu s počáteční*

koncentrací histaminu  $0,4 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  v závislosti na době kultivace (h) pro inkubační teploty  $11 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $23 \text{ }^\circ\text{C}$  a  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ ; počáteční relativní obsah histaminu v čase nula byl vždy 100 %. Inkubace byla prováděna při  $\text{pH} = 5,4$  (části A),  $\text{pH} = 6,2$  (části B) a  $\text{pH} = 7,0$  (části C). Výsledky jsou prezentovány pomocí průměrů a standardních odchylek (sloupce;  $n = 6$ ).....19

Obr. 3.3: Vývoj relativního obsahu histaminu (rel. %) při degradaci bakterií *Lacticaseibacillus casei* CCDM 198 v neúplném MRS bujónu s počáteční koncentrací histaminu  $0,2 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  v závislosti na době kultivace (h) pro inkubační teploty  $11 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $23 \text{ }^\circ\text{C}$  a  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ ; počáteční relativní obsah histaminu v čase nula byl vždy 100 %. Inkubace byla prováděna při  $\text{pH} = 5,4$  (části A),  $\text{pH} = 6,2$  (části B) a  $\text{pH} = 7,0$  (části C). Výsledky jsou prezentovány pomocí průměrů a standardních odchylek (sloupce;  $n = 6$ ).....20

Obr. 3.4: Vývoj relativního obsahu histaminu (rel. %) při degradaci bakterií *Lacticaseibacillus casei* CCDM 198 v neúplném MRS bujónu s počáteční koncentrací histaminu  $0,4 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  v závislosti na době kultivace (h) pro inkubační teploty  $11 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $23 \text{ }^\circ\text{C}$  a  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ ; počáteční relativní obsah histaminu v čase nula byl vždy 100 %. Inkubace byla prováděna při  $\text{pH} = 5,4$  (části A),  $\text{pH} = 6,2$  (části B) a  $\text{pH} = 7,0$  (části C). Výsledky jsou prezentovány pomocí průměrů a standardních odchylek (sloupce;  $n = 6$ ).....21

Obr. 3.5: Vývoj relativního obsahu histaminu (rel. %) při degradaci bakterií *Lacticaseibacillus casei* CCDM 198 v mléce. Kultivace probíhaly za teploty  $11 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $23 \text{ }^\circ\text{C}$  a  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  v mléce o  $\text{pH} 5,4$  (část A);  $6,2$  (část B) a  $7,0$  (část C). Počáteční relativní obsah histaminu v čase nula byl vždy 100 %. Výsledky jsou prezentovány pomocí průměrů a standardních odchylek (sloupce;  $n = 6$ ).....26

Obr. 3.6: Detekce přítomnosti enzymu multicopperoxidázy (MCO) a jeho enzymatické aktivity u bakteriálního kmene *Lacticaseibacillus casei* CCDM 198 v čase kultivace 0, 24,48 a 72 hodin. Část A popisuje přítomnost enzymu MCO v polyakrylamidovém gelu po elektroforéze za nativních podmínek vůči substrátu DMP. Pozitivní reakce je prokázána oranžově žlutým bandem. Část B graficky znázorňuje spektrofotometrickou detekci změny % relativní aktivity enzymu MCO v čase při oxidaci substrátu ABTS. Absorbance byla měřena při vlnové délce 420 nm. Aktivita enzymu v průběhu času je vyjádřena jako procentuální relativní aktivita vztažena k maximální naměřené aktivitě 100 % (% relativní aktivity). Výsledky byly vyjádřeny pomocí průměrů a standardních odchylek.....29

# CURRICULUM VITAE

## OSOBNÍ ÚDAJE

---

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

## PŘEHLED PUBLIKAČNÍ ČINNOSTI

---

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

BUTOR I., JANČOVÁ, P., PUREVDORJ, K., **KLEMENTOVÁ, L.**, KLUZ, M., HUŇOVÁ, I., PIŠTĚKOVÁ, H., BUŇKA, F., BUŇKOVÁ, L.

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

PIŠTĚKOVÁ, H., JANČOVÁ, P., **BERČÍKOVÁ, L.**, BUŇKA, F., SOKOLOVÁ, I., ŠOPÍK, T., MARŠÁLKOVÁ, K., AMARAL, O., BUŇKOVÁ, L. Application of qPCR for multicopper oxidase gene (*MCO*) in biogenic amines degradation by *Lactobacillus casei*. *Food Microbiology*, 2020, 91, 103550

PLEVA, P., **BERČÍKOVÁ, L.**, ČECHOVÁ, E., BARTOŠEK, P., BUŇKOVÁ, L. The monitoring of biogenic amines in the raw food. *Potravinárstvo Slovak Journal of Food Sciences*, 2019, 13(1), 482-489

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

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

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

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

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





Mgr. Lucie Klementová, Ph.D.

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

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

Teze disertační práce

Vydala Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně,  
nám. T. G. Masaryka 5555, 760 01 Zlín.

Náklad: vyšlo elektronicky

Sazba: Mgr. Lucie Klementová, Ph.D.

Publikace neprošla jazykovou ani redakční úpravou.

Rok vydání 2024

Pořadí vydání: první

ISBN 978-80-7678-224-2

