

Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno–Spożywczego
im. prof. Waława Dąbrowskiego –
Państwowy Instytut Badawczy

mgr inż. Olga Świder

Wpływ modyfikacji mikrobioty na obecność amin biogennych w fermentowanej żywności

Effect of microbiota modification on the presence of biogenic amines in
fermented food

Praca doktorska
PhD Thesis

Praca wykonana pod kierunkiem:

dr hab. inż. Marka Ł. Roszko, prof. IBPRS–PIB
Zakład Bezpieczeństwa i Analizy Chemicznej Żywności
Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno–Spożywczego
im. prof. Waława Dąbrowskiego – Państwowy Instytut Badawczy

Recenzenci:

dr hab. inż. Anna Bzducha–Wróbel
Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności
Instytut Nauk o Żywności
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

prof. dr hab. inż. Henryk Jeleń
Zakład Chemii Żywności i Analizy Instrumentalnej
Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

prof. dr hab. Barbara Wróblewska
Zakład Immunologii i Mikrobiologii Żywności
Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności
Polskiej Akademii Nauk w Olsztynie

Warszawa, 2023

Składam serdeczne podziękowania

Promotorowi – Panu dr hab. inż. Markowi Roszko, prof. IBPRS–PIB za bycie wzorem do naśladowania – Nauczycielem, który swoją postawą inspirował do ciągłego rozwoju i doskonalenia. Dziękuję za nieocenione wsparcie merytoryczne, cierpliwość i motywację do pracy. To prawdziwy zaszczyt móc rozwijać się pod skrzydłami tak wyjątkowej osoby.

Mgr inż. Michałowi Wójcickiemu za wsparcie zarówno w chwilach sukcesów, jak i niepowodzeń. Za pracowitość i determinację, dzięki którym ramię w ramię realizujemy nasze naukowe plany.

Współpracownikom z IBPRS–PIB, w szczególności mgr inż. Marzenie Bujak oraz Koleżankom i Kolegom z Zakładu Bezpieczeństwa i Analizy Chemicznej Żywności za pomoc i życzliwą atmosferę.

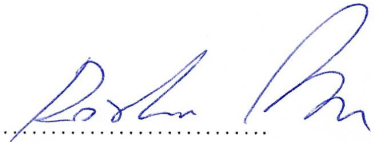
Mojej Rodzinie za motywację, wyrozumiałość i nieprzerwane wsparcie.

Oświadczenie promotora pracy

Oświadczam, że niniejsza praca została przygotowana pod moim kierunkiem i stwierdzam, że spełnia ona warunki do przedstawienia jej w postępowaniu o nadanie stopnia doktora.

Data 17.10.2023

Podpis promotora pracy



Oświadczenie autora pracy

Świadom odpowiedzialności prawnej oświadczam, że rozprawa doktorska przygotowana przeze mnie nie zawiera treści uzyskanych w sposób niezgodny z obowiązującymi przepisami.

Oświadczam również, że przedstawiona rozprawa nie była wcześniej przedmiotem procedur związanych z uzyskaniem stopnia naukowego w wyższej uczelni lub innej uprawnionej instytucji naukowej.

Oświadczam ponadto, że niniejsza wersja rozprawy jest identyczna z załączoną wersją elektroniczną.

Data 17.10.2023r.

Podpis autora pracy



Streszczenie

Wpływ modyfikacji mikrobioty na obecność amin biogennych w fermentowanej żywności

Fermentowana żywność cechuje się unikatowymi właściwościami i stanowi cenne uzupełnienie diety człowieka. Pomimo szeregu korzyści zdrowotnych wynikających z jej spożycia, fermentowane produkty mogą stanowić zagrożenie zdrowotne. Jednym z istotnych czynników jest ryzyko dostarczenia wraz z żywnością fermentowaną do organizmu wysokich dawek amin biogennych (BAs). BAs są obecne w żywności głównie w wyniku działalności mikroorganizmów, stąd zastosowanie czynników oddziałujących na skład i aktywność drobnoustrojów może przyczynić się do ograniczenia zawartości tych związków w produktach fermentowanych. W ramach pracy określono zawartość BAs i ich prekursorów – wolnych aminokwasów (FAAs) w fermentowanych produktach warzywnych dostępnych na polskim rynku. Na potrzeby oceny ryzyka zdrowotnego związanego z obecnością BAs w żywności fermentowanej opracowano Indeks Amin Biogennych (BAI). W celu określenia możliwości ograniczenia ilości BAs powstających w trakcie procesów fermentacyjnych przeprowadzono doświadczenia w warunkach modelowych produkcji żywności fermentowanej. Zbadano wpływ temperatury prowadzenia procesu (11 lub 23°C) oraz dodatku chlorku sodu (0,5; 1,5 lub 5,0%) w modelowym procesie fermentacji spontanicznej ogórków siewnych (*Cucumis sativus* L.). Następnie w osobnym eksperymencie użyto kultur starterowych niewykazujących zdolności do produkcji BAs w stężeniach 10^4 , 10^6 lub 10^7 jtk·mL⁻¹. Na potrzeby realizacji pracy zastosowano techniki chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrią mas oraz metody biologii molekularnej, w tym sekwencjonowanie następnej generacji. Uzyskane wyniki badań pozwoliły na stwierdzenie, że oszacowane na podstawie BAI wysokie ryzyko wystąpienia niepożądanych objawów dotyczy fermentowanych warzyw należących do rodziny kapustowatych (*Brassicaceae* Burnett) oraz ogórków (*Cucumis sativus* L.). Modyfikacja warunków fermentacji spontanicznej w badanym zakresie jest niewystarczająca do uzyskania produktu o stabilnym, pożądanym składzie mikroorganizmów oraz niskiej zawartości BAs. Zastosowanie 10^7 lub 10^6 jtk·mL⁻¹ kultur starterowych – *Lactocaseibacillus casei* KKP 3272 lub *Pediococcus pentosaceus* KKP 3273 – umożliwił użytym bakteriom zdominowanie środowiska oraz gwarantuje uzyskanie produktu o niskim ryzyku wystąpienia niepożądanych objawów po spożyciu zgodnie z wartością BAI. Wyniki opisanych w literaturze eksperymentów wskazują, że dodatek substancji roślinnych może skutecznie ograniczać produkcję BAs przez mikroorganizmy w procesie fermentacji, co wynika głównie z właściwości antimikrobiologicznych związków chemicznych obecnych w roślinach. Kluczowymi czynnikami determinującymi efektywność tej metody są rodzaj, skład chemiczny i forma aplikacji dodatku, rodzaj matrycy żywnościowej, charakterystyka mikroorganizmów autochtonicznych i celowo dodanych oraz warunki prowadzenia procesu.

Słowa kluczowe

aminy biogenne; fermentacja żywności; bezpieczeństwo żywności; Indeks Amin Biogennych; kultury starterowe; roślinne dodatki do żywności

Abstract

Effect of microbiota modification on the presence of biogenic amines in fermented food

Fermented food has unique properties and is a valuable complement to the human diet. Despite numerous health benefits resulting from its consumption, fermented products may pose a health hazard. One of the important factors is the risk of ingestion of high doses of biogenic amines (BAs). BAs are present in food mainly because of the activity of microorganisms, hence the use of factors that affect the composition and activity of microorganisms may contribute to the reduction of these compounds content in fermented products. As part of the study, the content of BAs and their precursors - free amino acids (FAAs) in fermented vegetable products available on the Polish market was determined. To assess the health risks associated with the presence of BAs in fermented vegetables, the Biogenic Amines Index (BAI) was developed. In order to determine the possibility of reducing the amount of BAs produced during fermentation process, experiments were carried out in model conditions of fermented food production. The influence of the temperature (11 or 23°C) and the addition of sodium chloride (0.5, 1.5 or 5.0%) in the model process of spontaneous fermentation of cucumbers (*Cucumis sativus* L.) was examined. Subsequently, in a separate experiment, starter cultures that did not show the ability to produce BAs at concentrations of 10^4 , 10^6 or 10^7 cfu·mL⁻¹ were used. For the purposes of this work, liquid chromatography techniques coupled with mass spectrometry and molecular biology methods, including next-generation sequencing, were used. The obtained results allowed the conclusion that the high risk of undesirable symptoms estimated based on BAI concerns fermented vegetables belonging to the Brassicaceae family (*Brassicaceae* Burnett) and cucumbers (*Cucumis sativus* L.). Modification of spontaneous fermentation conditions in the tested range is insufficient to obtain a product with a stable, desired composition of microorganisms and a low BA content. The use of 10^7 or 10^6 cfu·mL⁻¹ of starter cultures – *Lactocaseibacillus casei* KKP 3272 or *Pediococcus pentosaceus* KKP 3273 – allows the bacteria used to dominate the environment and guarantees obtaining a product with a low risk of undesirable symptoms after consumption in accordance with the BAI value. The results of experiments described in the literature indicate that the addition of plant substances can effectively limit the production of BAs by microorganisms in the fermentation process, which is mainly due to the antimicrobial properties of chemical compounds present in plants. The key factors determining the effectiveness of this method are the type, chemical composition, and form of application of the additive, the type of food matrix, the characteristics of indigenous and intentionally added microorganisms, and the manufacturing conditions.

Keywords

biogenic amines; food fermentation; food safety; Biogenic Amine Index; starter cultures; plant-origin food additives

SPIS TREŚCI

WSTĘP.....	13
WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW	15
1. WYKAZ PUBLIKACJI STANOWIĄCYCH MONOTEMATYCZNY CYKL BĘDĄCY PODSTAWĄ DO UBIEGANIA SIĘ O NADANIE STOPNIA NAUKOWEGO DOKTORA ORAZ WKŁAD DOKTORANTKI W REALIZACJĘ PRAC WCHODZĄCYCH W SKŁAD ROZPRAWY.....	17
2. PRZEGLĄD PIŚMIENNICTWA	19
2.1. Fermentowana żywność.....	19
2.2. Występowanie BAs w żywności.....	21
2.3. Wpływ BAs na organizm człowieka.....	24
2.4. Prawo żywnościowe i bezpieczeństwo żywności w zakresie występowania BAs	27
2.5. Metody redukcji zawartości BAs w żywności fermentowanej.....	29
2.5.1. Modyfikacja temperatury oraz stężenia NaCl.....	30
2.5.2. Zastosowanie kultur starterowych.....	31
2.5.3. Zastosowanie roślinnych dodatków	32
3. HIPOTEZY, CEL I ZAKRES PRACY	35
4. MATERIAŁ I METODY BADAŃ.....	37
4.1. Materiał badany	37
4.2. Metody badań.....	37
4.2.1. Część technologiczna.....	37
4.2.2. Analiza chromatograficzna i spektrometria mas.....	38
4.2.3. Analiza mikrobiologiczna	39
4.2.4. Analiza statystyczna.....	40
5. OMÓWIENIE I DYSKUSJA WYNIKÓW	41
5.1. Opracowanie i walidacja metody analitycznej oznaczania BAs i FAAs w żywności.....	41
5.2. Występowanie BAs w fermentowanych produktach warzywnych	41
5.3. Oszacowanie ryzyka wynikającego ze spożycia fermentowanych produktów warzywnych dostępnych na polskim rynku.....	42
5.4. Zastosowanie modyfikacji wybranych parametrów produkcji i przechowywania w modelowym produkcie w warunkach fermentacji spontanicznej	45
5.4.1. Wpływ zastosowanych warunków na mikrobiotę modelowego produktu	46
5.4.2. Wpływ zastosowanych warunków na BAs	47
5.4.3. pH i kwasy organiczne.....	48
5.4.4. Metabolomika	49
5.5. Zastosowanie wybranych kultur starterowych w celu otrzymania produktu o zredukowanej zawartości BAs.....	50
5.5.1. Oszacowanie zdolności wybranych szczepów do produkcji BAs	50
5.5.2. Wpływ zastosowanych kultur na mikrobiotę modelowego produktu.....	51
5.5.3. Wpływ zastosowanych kultur na BAs i BAI w modelowym produkcie	51
5.5.4. pH i kwasy organiczne.....	52
6. PODSUMOWANIE I WNIOSKI	54
7. SPIS LITERATURY.....	58
CYKL PUBLIKACJI	69
OŚWIADCZENIA WSPÓŁAUTORÓW PUBLIKACJI.....	181
WYKAZ OSIĄGNIĘĆ NAUKOWYCH	201

WSTĘP

Problem występowania amin biogennych (BAs) w żywności jest istotny z punktu widzenia bezpieczeństwa żywności i zdrowia publicznego. Dane dotyczące wielkości narażenia populacji na tego rodzaju substancje oraz skali wywoływanych narażeniem negatywnych efektów zdrowotnych są niewystarczająco kompleksowe. W 2011 roku Europejski Urząd ds. Bezpieczeństwa Żywności (EFSA) wydał raport, w którym wskazano, że fermentacja żywności sprzyja produkcji BAs. Warunki fermentacji i przechowywania są istotnymi czynnikami w kontekście wytwarzania BAs przez mikroorganizmy a zastosowanie kultur starterowych niewykazujących zdolności do produkcji tych związków oraz zdolnych do zdominowania mikrobioty autochtonicznej może stanowić skuteczną strategię ograniczania BAs w produktach fermentowanych. Inne strategie ograniczania zawartości tych substancji opisywane w literaturze obejmują wykorzystanie substancji biologicznie aktywnych obecnych w ekstraktach roślinnych oraz modyfikację parametrów procesów technologicznych wytwarzania żywności fermentowanej.

Pozostawione w pracy hipotezy badawcze odnoszą się do elementów poznawczych dotyczących oceny ryzyka zdrowotnego oraz możliwości ograniczania występowania BAs w żywności. Zapewnienie dostępu do produktów fermentowanych o zredukowanej zawartości BAs wydaje się być niezwykle ważne. Żywność fermentowana posiada z jednej strony udokumentowane liczne właściwości prozdrowotne a jednocześnie rośnie liczba osób wrażliwych na BAs, m.in. wykazujących nietolerancję histaminy czy przyjmujących leki będące inhibitorami enzymów odpowiedzialnych za metabolizm BAs dostarczonych z dietą. Szereg opracowań naukowych porusza problem występowania BAs w fermentowanych produktach mlecznych czy mięsnych, natomiast zagadnienie to nie jest obszernie udokumentowane w odniesieniu do produktów pochodzenia roślinnego, w tym fermentowanych warzyw.

Powyższe stanowiło przesłanki do podjęcia badań nad ryzykiem zdrowotnym związanym z obecnością BAs w fermentowanych warzywach oraz możliwymi sposobami modyfikacji mikrobioty żywności w celu ograniczenia obecności tych związków w produktach spożywczych. W ramach badań określono kierunki zmian zachodzących zarówno w składzie chemicznym żywności jak i jej mikrobiocie.

Na potrzeby realizacji pracy wykorzystano nowoczesne instrumentalne metody badawcze jak spektrometria mas. Do badań genetycznych i analizy z zakresu biologii molekularnej zastosowane zostały klasyczne metody jak reakcja łańcuchowa polimerazy (PCR) a także sekwencjonowanie nowej generacji (NGS). W ramach pracy dokonano również systematycznego przeglądu dostępnych danych dotyczących możliwości zastosowania roślinnych dodatków do żywności fermentowanej w celu ograniczenia produkcji BAs, co stanowi uzupełnienie przeprowadzonych doświadczeń i preludium do dalszych badań.

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

- BAI – Indeks Amin Biogennych (z ang. *Biogenic Amine Index*)
- BAs – aminy biogenne (z ang. *biogenic amines*)
- BMI (z ang. *Body Mass Index*)
- CLA – sprzężony kwas linolowy (z ang. *conjugated linoleic acid*)
- DAO – diaminooksydaza (z ang. *diamine oxidase*)
- EFSA – Europejski Urząd ds. Bezpieczeństwa Żywności (z ang. *European Food Safety Authority*)
- EOs – olejki eteryczne (z ang. *essential oils*)
- FAAs – wolne aminokwasy (z ang. *free amino acids*)
- FAO/WHO – Organizacja Narodów Zjednoczonych do spraw Wyżywienia i Rolnictwa / Światowa Organizacja Zdrowia (z ang. *Food and Agricultural Organization / World Health Organization*)
- GABA – kwas γ -aminomasłowy (z ang. *γ -aminobutyric acid*)
- HHP – wysokie ciśnienie hydrostatyczne (z ang. *High Hydrostatic Pressure*)
- HNMT – N-metylotransferaza histaminy (z ang. *histamine N-methyltransferase*)
- HRMS – wysokorozdzielczy spektrometr mas (z ang. *high-resolution mass spectrometer*)
- IBS – zespół jelita drażliwego (z ang. *Irritable Bowel Syndrome*)
- KEGG (z ang. *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*)
- LAB – bakterie fermentacji mlekowej (z ang. *lactic acid bacteria*)
- LOAEL – najniższy poziom, który wywołuje dające się zaobserwować się działania niepożądane (z ang. *the lowest observed adverse effect level*)
- LOQ – granica oznaczalności (z ang. *limit of quantification*)
- MAO – monoaminooksydaza (z ang. *monoamine oxidase*)
- MAOI – inhibitory monoaminooksydaz (z ang. *monoamine oxidase inhibitors*)
- MAP – pakowanie w atmosferze modyfikowanej (z ang. *Modified Atmosphere Packaging*)
- MCO – wielomiedziowa oksydaza (z ang. *multicopper oxidase*)
- NGS – sekwencjonowanie następnej generacji (z ang. *next-generation sequencing*)
- NMT – N-metylotransferaza (z ang. *N-methyltransferase*)
- NOAEL – poziom niewywołujący dających się zaobserwować szkodliwych skutków (z ang. *no observed adverse effect level*)
- PCA – analiza głównych składowych (z ang. *principal component analysis*)
- PCR – reakcja łańcuchowa polimerazy (z ang. *polymerase chain reaction*)
- U.S. FDA – Agencja Żywności i Leków Stanów Zjednoczonych Ameryki Północnej (z ang. *U.S. FDA – United States Food and Drug Administration*)
- UHPLC – ultrawysokosprawna chromatografia cieczowa (z ang. *ultra-high-performance liquid chromatography*)

1. WYKAZ PUBLIKACJI STANOWIĄCYCH MONOTEMATYCZNY CYKL BĘDĄCY PODSTAWĄ DO UBIEGANIA SIĘ O NADANIE STOPNIA NAUKOWEGO DOKTORA ORAZ WKŁAD DOKTORANTKI W REALIZACJĘ PRAC WCHODZĄCYCH W SKŁAD ROZPRAWY

[P1] Świder, O., Roszko, M. Ł., Wójcicki, M., Szymczyk, K. (2020) Biogenic amines and free amino acids in traditional fermented vegetables—dietary risk evaluation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68(3), 856–868.

IF₂₀₁₉=4.192, MNiSW / MEiN₂₀₁₉ = 140 pkt

[P2] Świder, O., Wójcicki, M., Bujak, M., Juszczyk-Kubiak, E., Szczepańska, M., Roszko, M. Ł. (2021) Time evolution of microbial composition and metabolic profile for biogenic amines and free amino acids in a model cucumber fermentation system brined with 0.5% to 5.0% sodium chloride. *Molecules*, 26(19), 5796.

IF₂₀₂₁=4.927, MNiSW / MEiN₂₀₂₁ = 140 pkt

[P3] Świder, O., Roszko, M. Ł., Wójcicki, M., Bujak, M., Szczepańska, M., Juszczyk-Kubiak, E., Średnicka, P., Cieślak, H. (2023) Non-aminobiogenic starter cultures in a model system of cucumber fermentation. *LWT – Food Science and Technology*, 177, 114574.

IF₂₀₂₁=6.056, MNiSW / MEiN₂₀₂₁ = 100 pkt

[P4] Świder, O., Roszko, M., Wójcicki, M. (2023) The inhibitory effects of plant additives on biogenic amine formation in fermented foods – a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1–26.

IF₂₀₂₂=10.2, MNiSW / MEiN₂₀₂₁ = 200 pkt

Sumaryczny Impact Factor (IF) publikacji wchodzących w skład cyklu wynosi: **25.375**

Sumaryczna liczba punktów wg wykazu czasopism MNiSW / MEiN za publikacje wchodzące w skład cyklu wynosi: **580**

IF oraz liczbę punktów MNiSW / MEiN obliczono na podstawie danych z roku, w którym ukazała się publikacja lub ostatniego roku, dla którego dane te zostały opublikowane.

Badania stanowiące przedmiot niniejszej rozprawy zrealizowano w ramach projektu statutowego IBPRS-PIB nr 127-01-ZA, którego doktorantka była głównym wykonawcą.

Wkład doktorantki w powstanie publikacji 1 [P1]: opracowanie koncepcji badań, opracowanie i walidacja metody analitycznej oznaczania amin biogennych i wolnych aminokwasów techniką LC–MS; wykonanie analiz chromatograficznych badanych próbek; analiza i dyskusja wyników; wizualizacja danych; opracowanie Indeksu Amin Biogennych; przygotowanie manuskryptu; odpowiedzi na uwagi recenzentów i korespondencja z redaktorem czasopisma; edycja rękopisu do ostatecznej formy

Wkład doktorantki w powstanie publikacji 2 **[P2]**: opracowanie koncepcji badań, wykonanie pilotażowych fermentacji; wykonanie analiz chromatograficznych oraz mikrobiologicznych, w tym przygotowanie próbek do sekwencjonowania następnej generacji; analiza i dyskusja wyników; przygotowanie manuskryptu; odpowiedzi na uwagi recenzentów i korespondencja z redaktorem czasopisma; edycja rękopisu do ostatecznej formy

Wkład doktorantki w powstanie publikacji 3 **[P3]**: opracowanie koncepcji badań, wybór i przygotowanie badanych szczepów do identyfikacji genetycznej; izolacja i amplifikacja materiału genetycznego do oceny obecności wybranych genów; wykonanie pilotażowych fermentacji; wykonanie analiz chromatograficznych; przygotowanie próbek do sekwencjonowania następnej generacji; analiza i dyskusja wyników; przygotowanie manuskryptu; odpowiedzi na uwagi recenzentów i korespondencja z redaktorem czasopisma; edycja rękopisu do ostatecznej formy

Wkład doktorantki w powstanie publikacji 4 **[P4]**: przeprowadzenie badań literaturowych, przygotowanie tekstu manuskryptu; przygotowanie tabel, wykonanie abstraktu graficznego oraz rysunków 1 i 2; odpowiedzi na uwagi recenzentów i korespondencja z redaktorem naczelnym czasopisma; edycja rękopisu do ostatecznej formy

2. PRZEGLĄD PIŚMIENICTWA

2.1. Fermentowana żywność

Fermentacja stanowi jedną z najstarszych metod utrwalania żywności [Ross i wsp. 2002, Ibrahim i wsp. 2023]. Według Międzynarodowego Stowarzyszenia Naukowego ds. Probiotyków i Prebiotyków (*International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics – ISAPP*) terminem „żywność fermentowana”, określa się żywność, która powstała w wyniku pożądanego wzrostu mikroorganizmów i enzymatycznych przemian jej składników. Zaproponowana klasyfikacja żywności fermentowanej obejmuje dwie grupy: i) produkty zawierające żywe komórki drobnoustrojów w momencie konsumpcji, np. jogurt, kefir, niepasteryzowane fermentowane warzywa oraz ii) produkty, które zostały wytworzone w procesie fermentacji, ale nie zawierają żywych komórek mikroorganizmów w momencie konsumpcji – ponieważ zostały ich pozbawione w wyniku procesów technologicznych, np. chleb, piwo, wino, lub komórki obumarły w wyniku długotrwałego przechowywania, np. niektóre sery [Marco i wsp. 2021].

Potencjalnie prozdrowotne działanie produktów fermentowanych stanowi temat rozważań szeregu doniesień naukowych. Prozdrowotny potencjał jest również czynnikiem determinującym szerokie zainteresowanie wśród konsumentów tą grupą żywności i warunkuje wzrost popularności tego typu produktów [Lavefve i wsp. 2019, Staudacher i Nevin 2019, Marco i wsp. 2021]. Potencjalne korzyści zdrowotne wynikające ze spożywania fermentowanej żywności mogą być efektem m.in. obecności aktywnych biologicznie składników, takich jak witaminy (B2, B9, B12, K), kwas γ -aminomasłowy (GABA, z ang. *γ -aminobutyric acid*), sprzężony kwas linolowy (CLA, z ang. *conjugated linoleic acid*), egzopolisacharydy, sfingolipidy, bakteriocyny czy bioaktywne peptydy, które powstają w procesie fermentacji [Şanlier i wsp. 2017, Chaudhary i wsp. 2021]. Liczne badania wskazują na potencjalne działanie przeciwzapalne [Kim i Park 2018, SaeidiFard i wsp. 2020, Kocot i Wróblewska 2021, Wastyk i wsp. 2021], przeciwnowotworowe [Tasdemir i Sanlier 2020] i przeciwstarzeniowe [Das i wsp. 2020] fermentowanej żywności. Dodatkowo, spożywanie fermentowanych produktów mlecznych może zapobiegać rozwojowi i wspomagać leczenie cukrzycy typu 2 [Awwad i wsp. 2022, Teo i wsp. 2022]. Najnowsze doniesienia naukowe wskazują na wielokierunkowy wpływ mikrobioty przewodu pokarmowego na stan psychofizyczny człowieka. W ostatnich latach pojawiły się wyniki badań wskazujące na istnienie zależności pomiędzy konsumpcją fermentowanej żywności a mikroorganizmami

zasiedlającymi układ pokarmowy człowieka i pośrednio zdrowiem człowieka. Wykazano, że spożywanie fermentowanych produktów warzywnych może wpływać korzystnie na skład mikrobioty jelitowej [Kim i Park 2018], zwiększać jej różnorodność [Wastyk i wsp. 2021] oraz łagodzić objawy zespołu jelita drażliwego (IBS, z ang. *Irritable Bowel Syndrome*) [Nielsen i wsp. 2018]. Niektórzy autorzy sugerują, że włączenie fermentowanej żywności do codziennej diety odgrywa ważną rolę w zachowaniu dobrej kondycji psychicznej [Selhub i wsp. 2014, Aslam i wsp. 2020]. Istnieje potrzeba uzupełnienia danych odnośnie wpływu spożycia produktów fermentowanych na zdrowie konsumentów. Przeprowadzono niewiele badań dotyczących potencjalnych korzyści wynikających z konsumpcji żywności fermentowanej innej niż fermentowane produkty mleczne [Marco i wsp. 2021]. Biorąc pod uwagę pełniący funkcje prebiotyczne błonnik pokarmowy, spożywanie fermentowanych produktów roślinnych wydaje się być nawet bardziej istotne w kontekście relacji mikrobiota jelitowa vs. zdrowie gospodarza. Szczegółowe zbadanie interakcji między fermentowaną żywnością pochodzenia roślinnego, znajdującymi się w niej mikroorganizmami oraz mikrobiomem jelitowym i zdrowiem człowieka stanowi jeden z głównych celów europejskiego projektu HealthFerm, który rozpoczął swoją działalność we wrześniu 2022 r. W ramach 4-letniego programu zaplanowano m.in. przeprowadzenie 5 badań interwencyjnych z udziałem ludzi [HealthFerm 2023].

Pomimo licznych korzyści, takich jak wydłużenie przydatności do spożycia, nadanie specyficznych cech sensorycznych [Devaki i Premavalli 2019] oraz potencjalnych właściwości prozdrowotnych żywności, proces fermentacji może wiązać się z powstawaniem zagrożeń bezpieczeństwa żywności. Jednym z nich jest ryzyko formowania amin biogennych (BAs, z ang. *biogenic amines*). Czynnikiem promującym produkcję tych związków są głównie obecność i aktywność mikroorganizmów – nie tylko celowo dodanych kultur starterowych, ale również mikrobioty autochtonicznej, warunki środowiska żywności (takie jak pH, temperatura, stężenie chlorku sodu) oraz dostępność prekursorów tych substancji [EFSA 2011]. W badaniach Kanki i wsp. (2007), na przykładzie dekarboksylazy histydyny, udowodniono, że obecność żywych komórek mikroorganizmów nie jest niezbędną do wytworzenia BAs. Kluczowa jest aktywność enzymów, które mogą zostać uwolnione z komórek bakterii, które uległy autolizie [Kanki i wsp. 2007]. Proces fermentacji jest wykorzystywany zarówno w skali przemysłowej produkcji żywności jak i w skali produkcji żywności w ramach gospodarstw domowych. Wielkoskalowa produkcja opiera się zazwyczaj na ścisłym kontrolowaniu procesu,

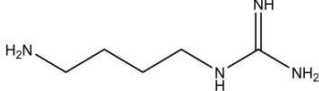
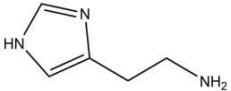


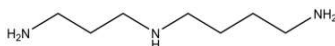
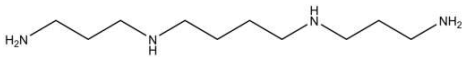
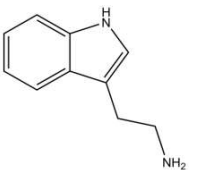
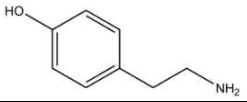
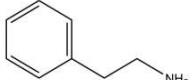
reżimie higienicznym oraz stosowaniu wyselekcjonowanych kultur starterowych w celu standaryzacji produktu. Niemniej, biorąc pod uwagę brak regulacji prawnych w kontekście limitów zawartości BAs w żywności innej niż ryby i produkty rybne, szczepy do fermentacji stosowane w przemyśle spożywczym prawdopodobnie nie są charakteryzowane przez producentów pod względem zdolności do zdominowania środowiska żywności oraz wytwarzania BAs. Przetwórstwo realizowane w warunkach gospodarstw domowych jest w jeszcze mniejszym stopniu przewidywalne w odniesieniu do produktu końcowego i bazuje najczęściej na fermentacji spontanicznej.

2.2. Występowanie BAs w żywności

BAs to organiczne związki chemiczne o małej masie cząsteczkowej (do około 200 Da). Określane są również jako aminy egzogenne, w celu odróżnienia od amin endogennych, syntetyzowanych *de novo* w organizmach zwierząt i roślin. BAs ze względu na budowę chemiczną klasyfikuje się na aminy heterocykliczne, alifatyczne oraz aromatyczne. Biorąc pod uwagę liczbę grup aminowych wyróżnia się mono-, di- i poli-aminy. Najczęściej występującymi w żywności BAs są putrescyna, histamina, kadaweryna, tyramina, tryptamina, agmatyna, spermina, spermidyna i 2-fenyletyloamina [Naila i wsp. 2010]. W Tabeli 1 przedstawiono strukturę chemiczną i klasyfikację wymienionych związków.

BAs mogą być formowane w żywności wskutek reakcji aminacji lub transaminacji aldehydów i ketonów oraz w wyniku dekarboksylacji wolnych aminokwasów (FAAs, z ang. *free amino acids*) przy udziale odpowiednich dekarboksylaz [Gao i wsp. 2023]. Wskazuje się, że za obecność BAs w żywności w zdecydowanym stopniu odpowiadają mikroorganizmy, które produkują te związki głównie w procesie dekarboksylacji FAAs [Benkerroum 2016]. Prekursorami histaminy, kadaweryny, putrescyny, tyraminy i 2-fenyletyloaminy są odpowiednio histydyna, lizyna, ornityna, tyrozyna i fenylealanina. Ponadto, putrescyna może być syntetyzowana z agmatyny w procesie deiminacji [EFSA 2011]. Proces tworzenia BAs w żywności przedstawiono na Rysunku 1 w Publikacji 4 [Rys 1, P4].

Tabela 1. Budowa chemiczna i klasyfikacja BAs.

	Struktura chemiczna	Kryterium klasyfikacji	
		budowa chemiczna	liczba grup aminowych
agmatyna		alifatyczna	poliamina
histamina		heterocykliczna	diamina
kadaweryna		alifatyczna	diamina
putrescyna		alifatyczna	diamina
spermidyna		alifatyczna	poliamina
spermina		alifatyczna	poliamina
tryptamina		heterocykliczna	diamina
tyramina		aromatyczna	monoamina
2-feniloetyloamina		aromatyczna	monoamina

BAs mogą być obecne w różnych produktach spożywczych, przy czym szczególne ryzyko formowania tych związków dotyczy żywności fermentowanej – wskutek obecności i aktywności mikroorganizmów – oraz produktów bogatych w białko – ze względu na potencjalnie wysoką zawartość prekursorów. Biorąc pod uwagę powyższe, wśród produktów, które mogą cechować się wysokimi stężeniami BAs należy wymienić ryby i produkty rybne, mięso i produkty mięsne, sery, fermentowane warzywa, produkty sojowe, piwo i wino [Shukla i wsp. 2010, Benkerroum 2016, Lavefve i wsp. 2019]. Złożoność procesu fermentacji determinuje duże zróżnicowanie zawartości BAs

w fermentowanych produktach spożywczych. Przykładowo, fermentowana pasta sojowa *Doenjang* charakteryzowała się stężeniami histaminy i tyraminy w zakresie od poniżej granicy wykrywalności do odpowiednio 2795 i 6616 mg·kg⁻¹ [Shukla i wsp. 2010]. *Douchi* – fermentowana czarna fasola lub soja zawierały maksymalnie odpowiednio 814 i 644 mg·kg⁻¹ tych BAs [Fong i wsp. 2020], podczas gdy sery charakteryzowały się stężeniami od wartości poniżej granicy wykrywalności do odpowiednio 1051 i 2000 mg·kg⁻¹ [Durlu-Özkaya 2002, Loizzo i wsp. 2013, Benkerroum 2016, Dabadé i wsp. 2021]. W fermentowanych produktach mięsnych stężenia histaminy, tyraminy, putrescyny i kadaweryny sięgały odpowiednio do 515, 510, 819 oraz 1014 mg·kg⁻¹ [Papavergou 2011, Papavergou i wsp. 2012, Roselino i wsp. 2020]. Dane literaturowe odnośnie występowania BAs w fermentowanych warzywach są ograniczone a nieliczne dostępne doniesienia dotyczą przede wszystkim kiszzonej kapusty [Halász i wsp. 1999, Kalač i wsp. 1999, Moret i wsp. 2005, Mayr i Schieberle 2012, Majcherczyk i Surówka 2019]. Aminami występującymi w tym produkcie w najwyższych stężeniach są tyramina, putrescyna, kadaweryna, histamina, spermidyna i 2-fenyloetyloamina, których maksymalne zawartości wynosiły odpowiednio 951, 529, 293, 229, 276 i 322 mg·kg⁻¹ [Kalač i wsp. 2000, Peñas i wsp. 2010, Dabadé i wsp. 2021]. *Kimchi* charakteryzowała się wysokimi zawartościami histaminy (136 – 947 mg·kg⁻¹), spermidyny (359 – 551 mg·kg⁻¹), tyraminy (167 – 368 mg·kg⁻¹) i putrescyny (51 – 164 mg·kg⁻¹), przy czym stężenia wymienionych BAs były zależne od proporcji użytych składników [Kim i wsp. 2022]. Świeże warzywa cechuje niska zawartość BAs, wśród których dominują putrescyna (do 65 mg·kg⁻¹), spermidyna (do 45 mg·kg⁻¹), 2-fenyloetyloamina (do 13 mg·kg⁻¹), tyramina (do 12 mg·kg⁻¹) i spermina (do 11 mg·kg⁻¹) [Moret i wsp. 2005, Dabadé i wsp. 2021]. Obecność niewielkiego stężenia histaminy dotyczy w szczególności szpinaku (20 mg·kg⁻¹) i pomidorów (7 mg·kg⁻¹) [Moret i wsp. 2005] oraz świeżych rozdrobnionych warzyw, takich jak tarta marchew czy mieszanki sałat (do 39 mg·kg⁻¹) [Dabadé i wsp. 2021].

W komórkach mikroorganizmów BAs biorą udział w regulacji stresu osmotycznego i oksydacyjnego, dostarczaniu energii metabolicznej a także są odpowiedzią ustroju na niskie pH środowiska [Benkerroum 2016]. Czynnikiem promującym produkcję BAs w środowisku żywności są dostępność prekursorów, obecność mikroorganizmów wykazujących zdolność do dekarboksylacji aminokwasów oraz warunki sprzyjające aktywności enzymów zaangażowanych w proces produkcji BAs. Rodzaj i ilość

produkowanych BAs zależy natomiast od parametrów takich jak pH, aktywność wody, skład chemiczny i charakterystyka mikrobioty produktu, jak również czas i temperatura przechowywania [EFSA 2011]. Należy podkreślić, że zdolność do wytwarzania BAs jest cechą charakterystyczną dla szczepu a nie całego rodzaju czy gatunku [Latorre-Moratalla i wsp. 2010, Spano i wsp. 2010, Bargossi i wsp. 2015, Li i wsp. 2021] i dotyczy nie tylko mikroorganizmów zanieczyszczających, ale również wielu bakterii fermentacji mlekowej (LAB, z ang. *lactic acid bacteria*) zaangażowanych w proces fermentacji żywności [Linares i wsp. 2012, Tittarelli i wsp. 2019].

2.3. Wpływ BAs na organizm człowieka

Aminy endogenne, określane również jako „naturalne aminy biogenne”, syntetyzowane są w organizmie człowieka. Pełnią szereg ważnych funkcji fizjologicznych, takich jak regulacja temperatury ciała, odpowiedzi immunologicznej czy ekspresji genów. Wpływają również na wydzielania kwasu żołądkowego. Biorą udział w procesie wzrostu i różnicowania komórek, modulują aktywność mózgu w zakresie funkcji kognitywnych oraz pełnią rolę neurotransmiterów. Aminy są odpowiedzialne za występowanie reakcji alergicznych [Ladero i wsp. 2010]. Dostarczone z dietą BAs są metabolizowane głównie przez specyficzne enzymy – mono- i di- aminooksydazy (odpowiednio MAO, z ang. *monoamine oxidase* i DAO, z ang. *diamine oxidase*). Produkty oksydacji BAs stanowią aldehyd, amoniak i nadtlenek wodoru. Metabolizm BAs w przewodzie pokarmowym człowieka przedstawiono na Rysunku 1 w Publikacji 4 [Rys 1, P4]. Dodatkowo, w metabolizm histaminy, tyraminy i fenyloetyloaminy mogą być zaangażowane również N-metylotransferazy (NMT, z ang. *N-methyltransferase*) [EFSA 2011].

Nadmierna podaż BAs może prowadzić do wystąpienia niepożądanych reakcji, których stopień nasilenia zależy od indywidualnej wrażliwości, w tym poziomu aktywności aminooksydaz, oraz ilości i rodzaju dostarczonych BAs. Głównym czynnikiem zwiększającym wrażliwość na toksyczne działanie dostarczonych z dietą BAs jest obniżona aktywność aminooksydaz, wynikająca zarówno z przyczyn genetycznych jak i przyjmowania leków będących inhibitorami tych enzymów. Wśród inhibitorów monoaminooksydaz (MAOI, z ang. *monoamine oxidase inhibitors*) należy wymienić farmaceutyki stosowane w leczeniu depresji i choroby Parkinsona [Vianello i wsp. 2012], podczas gdy niektóre antybiotyki czy substancje hipotensyjne hamują aktywność DAO [Comas-Basté i wsp. 2020]. Wysoka wrażliwość na dostarczone z pożywieniem BAs dotyczy również osób wykazujących objawy nietolerancji histaminy, w rezultacie czego

muszą one eliminować z diety nie tylko produkty bogate w histaminę, ale również zawierające inne BAs, które podlegają metabolizmowi z udziałem DAO (np. putrescyna) [Comas-Basté i wsp. 2020]. Innym czynnikiem zwiększającym wrażliwość na BAs jest spożywanie alkoholu wraz z produktami o wysokiej zawartości tych związków. Spożycie produktów zawierających wysokie stężenie histaminy może wywołać objawy ze strony układów nerwowego, pokarmowego, krążenia oraz oddechowego, a także reakcje skórne, tj. zaczerwienienie, wysypkę czy pokrzywkę [Ladero i wsp. 2010, Del Rio i wsp. 2017]. Zatrucie histaminą nazywane jest z ang. „*histamine fish poisoning*” lub „*scombroid syndrome*”, ponieważ najczęściej wynika ze spożycia ryb, w szczególności należących do rodziny makrełowatych (Scombridae), lub produktów rybnych [Del Rio i wsp. 2017]. Wśród objawów świadczących o dostarczeniu nadmiernej ilości tyraminy należy wymienić ból głowy, migreny, wymioty, zaburzenia neurologiczne, ciśnienia krwi oraz oddechowe, które określane są terminem z ang. „*cheese reaction*” [Ladero i wsp. 2010, Del Rio i wsp. 2017]. Literatura tematu wskazuje na możliwość wystąpienia ostrego zatrucia tyraminą, które charakteryzuje się nagłym wzrostem ciśnienia tętniczego powyżej 180/120 mm Hg, wywołując tzw. przełom nadciśnieniowy, co w konsekwencji może prowadzić do uszkodzenia narządów w układzie sercowo – naczyniowym lub nerwowym [Ladero i wsp. 2010]. Ponadto, tyramina może zwiększać podatność na infekcje bakteryjne w wyniku ułatwiania adherencji patogenów do komórek nabłonka jelita [Lyte 2004, Benkerroum 2016]. W literaturze wielokrotnie podkreślano wpływ putrescyny i kadaweryny na zwiększenie toksyczności histaminy głównie ze względu na interakcje tych BAs z DAO – enzymami uczestniczącymi w metabolizmie diamin [Ruiz Capillas i Herrero 2019]. W badaniu cytotoksyczności na komórkach raka gruczołowego jelita HT29 wykazano, że putrescyna i kadaweryna w stężeniach występujących w żywności mogą indukować nekrozę komórek, przy czym zaobserwowano dwukrotnie niższe wartości NOAEL (poziom niewywołujący dających się zaobserwować szkodliwych skutków, z ang. *no observed adverse effect level*) i LOAEL (najniższy poziom, który wywołuje dające się zaobserwować się działania niepożądane, z ang. *the lowest observed adverse effect level*) dla kadaweryny (odpowiednio 5mM i 10mM dla putrescyny; 2,5mM i 5mM dla kadaweryny), a cytotoksyczność wymienionych diamin była niższa w porównaniu do tyraminy i histaminy [Del Rio i wsp. 2019]. Efekt cytotoksyczny wykazują również tryptamina i 2-fenyloetyloamina indukujące odpowiednio apoptozę i nekrozę komórek. Zwężenie naczyń wywołane obecnością tych

związków skutkuje wzrostem ciśnienia krwi, co w konsekwencji może wywołać ból głowy, potliwość oraz wymioty. Oddziaływanie tryptaminy na enzym DAO oraz 2-fenyletyloaminy na enzymy DAO i HNMT (z ang. *histamine N-methyltransferase*) potęguje toksyczne działanie histaminy [Del Rio i wsp. 2020]. Ponadto, BAs mogą reagować ze związkami azotu tworząc nitrozoaminy – związki wykazujące właściwości kancerogenne i mutagenne [Linares i wsp. 2011, Fong i wsp. 2021, Moniente i wsp. 2022]. Dostarczenie do organizmu nadmiernej dawki agmatyny może powodować wystąpienie objawów żołądkowo-jelitowych – nudności i biegunek [Khémesse i wsp. 2023], co również wynika głównie ze wzmacniania toksyczności pozostałych BAs (tj. histaminy i tyraminy) poprzez blokowanie enzymów odpowiedzialnych za ich metabolizm [Akasaka i Fujiwara 2020]. Sama agmatyna wydaje się być substancją bezpieczną nawet w dużych dawkach (2,67 g / dobę dla osoby o przeciętnej masie ciała BMI, z ang. *Body Mass Index* 20,1 – 21,2) i przy długoterminowym (5 lat) doustnym przyjmowaniu [Gilad i Gilad 2014]. Należy podkreślić, że agmatyna wywołuje liczne korzystne efekty, a jej potencjał terapeutyczny w zakresie chorób i zaburzeń związanych z centralnym układem nerwowym stanowi przedmiot badań przedklinicznych i klinicznych prowadzonych od kilku dziesięcioleci [Akasaka i Fujiwara 2020]. Substancja ta poprawia funkcje kognitywne, działa przeciwdepresyjnie i przeciwłękowo oraz wpływa na złagodzenie bólu neuropatycznego [Akasaka i Fujiwara 2020, Gümrü i wsp. 2013]. Pozytywne efekty zdrowotne wykazano również w odniesieniu do spermidyny. Według badań prowadzonych z wykorzystaniem kwestionariusza częstości spożycia, stosowanie diety bogatej w spermidynę jest skorelowane z obniżonym ciśnieniem krwi i niższą częstością występowania chorób sercowo-naczyniowych. W doświadczeniach na myszach potwierdzono kardioprotekcyjny efekt suplementacji spermidyną oraz wykazano, że wpływa ona na zwiększenie długości życia [Eisenberg i wsp. 2015]. W badaniach *in vitro* wykazano, że spermidyna i spermina wykazują działanie cytotoksyczne, jednak efekt ten obserwowano przy stężeniach większych niż spotykane w żywności i odpowiadających typowemu pobraniu z dietą [Del Rio i wsp. 2018].

Czas wystąpienia reakcji organizmu oraz stopień nasilenia objawów intoksykacji aminami biogennymi zależą od wielu czynników, a poza indywidualną kondycją organizmu istotna jest dostarczona dawka. Według danych amerykańskiej Agencji ds. Żywności i Leków (U.S. FDA, z ang. *United States Food and Drug Administration*) symptomy *scombrotxin poisoning* – reakcji alergicznej wynikającej ze spożycia ryb

o wysokiej zawartości histaminy pojawiają się w ciągu od kilku minut do kilku godzin po spożyciu i utrzymują się od 12 godzin do kilku dni [FDA 2022]. Wöhrl i wsp. (2004) wykazali, że dawka 75 mg histaminy podana doustnie wywołała objawy niepożądane u połowy (5) z 10 osób badanych osób. Efekty spożycia histaminy wystąpiły w większości przypadków (4) po 3 – 24 godzinach od spożycia, a jedynie u jednej badanej osoby pojawiły się w pierwszej godzinie [Wöhrl i wsp. 2004]. Odmienny efekt zaobserwowano w trakcie ostrego zatrucia histaminą w wyniku spożycia tuńczyka (zawartość histaminy w produkcie wynosiła 3 720 mg·kg⁻¹). Czterdzieści dwie osoby spośród 94 uwzględnionych w raporcie epidemiologicznym spożyło tuńczyka podczas lunchu, przy czym objawy zatrucia pojawiły się u 31 badanych (30, których spożyło tuńczyka i 1 z grupy kontrolnej) w przeciągu 3 godzin od spożycia (u największej liczby osób objawy wystąpiły między 1 a 1,5 godziny po spożyciu) [Velut i wsp. 2019]. Opisane w literaturze przypadki intoksykacji tyraminą obejmują pojedyncze przypadki, które wymagały interwencji medycznej ze względu na stan poszkodowanych osób. Dostępne raporty i opracowania naukowe wskazują, że niepożądana reakcja po spożyciu serów u osób przyjmujących MAOI, wystąpiła w ciągu 1 – 2 godzin. W trzech z czterech opisanych przypadków zdiagnozowano zawał mięśnia sercowego [Ngo i wsp. 2010, Alkhouli i wsp. 2014, Salter i Kenney 2018].

2.4. Prawo żywnościowe i bezpieczeństwo żywności w zakresie występowania

BAs

Ustalenie bezpiecznych limitów zawartości BAs w żywności jest trudne. Wynika to z dużej zmienności zawartości BAs pomiędzy produktami spożywczymi tego samego rodzaju [Martin i wsp. 2016] a nawet pomiędzy poszczególnymi częściami tego samego produktu, np. ryby [FDA 2022]. Ponadto różne są progi tolerancji dla dostarczonych z dietą BAs u poszczególnych osób. Dodatkowo, brak jest kompleksowych danych dotyczących skali narażenia populacji na te substancje, co jest konsekwencją m.in. ograniczonych danych o konsumpcji i występowaniu w żywności. Brak jest kompleksowych danych epidemiologicznych w odniesieniu do BAs z uwagi na powszechne nieprawidłowości w rozpoznaniu wywołanej nimi intoksykacji na podstawie występujących objawów, co skutkuje niedoszacowaniem częstości występowania zatruc [FAO/WHO 2013]. Według danych Europejskiego Urzędu ds. Bezpieczeństwa Żywności (EFSA, z ang. *European Food Safety Authority*) (2017), w Unii Europejskiej, w okresie 2010–2015 odnotowano 191 ognisk zatruc wywołanych histaminą. Obejmowały one

łącznie 1 060 przypadków, spośród których 107 zostało poddanych hospitalizacji. W raporcie uwzględniono jedynie przypadki, dla których istniały silne dowody wskazujące na rodzaj żywności, która stanowiła przyczynę intoksykacji. Ponad 90% z nich związana była ze spożyciem ryb i produktów rybnych [EFSA 2017].

Histamina jest jedyną aminą biogenną, dla której istnieją prawne limity zawartości w żywności. Dopuszczalne poziomy dla ryb i produktów rybnych obowiązujące w różnych państwach mieszczą się w granicach od 50 do 400 mg·kg⁻¹ [Debeer i wsp. 2021]. W obowiązującym w Unii Europejskiej Rozporządzeniu Komisji (WE) nr 2073/2005 w sprawie kryteriów mikrobiologicznych dotyczących środków spożywczych uwzględniono dopuszczalne poziomy zawartości histaminy dla dwóch kategorii produktów – (i) produktów rybołówstwa z gatunków ryb o podwyższonym poziomie histydyny oraz (ii) produktów rybołówstwa, które poddano zabiegowi enzymatycznego dojrzewania w solance, wyprodukowanych z gatunków ryb o podwyższonym poziomie histydyny [Rozporządzenie Komisji 2073/2005]. W odniesieniu do zapisów powyższej regulacji zadowalająca jakość produktu jest stwierdzana, jeśli spełnione zostaną łącznie następujące warunki: średnia zawartość histaminy w 9 próbkach (ujętych w planie pobierania próbek) nie przekracza 100 lub 200 mg·kg⁻¹, maksymalnie 2 próbki charakteryzują się stężeniem histaminy w zakresie 100 – 200 lub 200 – 400 mg·kg⁻¹ oraz żadna próbka nie zawiera więcej niż 200 lub 400 mg·kg⁻¹ odpowiednio dla pierwszej lub drugiej kategorii produktów uwzględnionych w Rozporządzeniu. Aktualnie prowadzone są prace nad obniżeniem ustanowionych przez U.S. FDA, obowiązujących w Stanach Zjednoczonych limitów zawartości histaminy w rybach z 50 lub 500 mg·kg⁻¹, których przekroczenie klasyfikuje produkt odpowiednio jako ulegający zepsuciu / produkowany w niehigienicznych warunkach lub szkodliwy dla zdrowia konsumentów, do odpowiednio 35 i 200 mg·kg⁻¹ [FDA 2022].

W raporcie EFSA (2011) zaproponowano wartości NOAEL dla wybranych BAs. Ograniczone dane wskazują, że dawki 25 – 50 mg histaminy na osobę na posiłek nie wywoływały niepożądanych efektów po spożyciu przez osoby zdrowe. W przypadku osób wykazujących objawy nietolerancji histaminy, ze względu na różne progi wrażliwości, uznano, że poziom tej substancji w spożywanych przez nie produktach powinien znajdować się w stężeniach poniżej granicy wykrywalności. Zaproponowane dawki tyraminy, które nie wywoływały niepożądanych objawów to 600 mg, 50 mg oraz 6 mg na osobę na posiłek odpowiednio dla osób zdrowych, które nie przyjmują MAOI,

osób przyjmujących MAOI trzeciej generacji oraz osób przyjmujących klasyczne MAOI. Pomimo relatywnie wyższej tolerowanej przez osoby zdrowe ilości tyraminy, wyniki badań *in vitro* wskazują, że może być ona bardziej toksyczna od histaminy [Linares i wsp. 2016]. Ponadto w badaniach przeprowadzonych na kulturach linii komórkowej HT29 pochodzącej z gruczolaka jelita grubego wykazano synergistyczne działanie cytotoksyczne histaminy i tyraminy w stężeniach odpowiadających typowym dla żywności [Del Rio i wsp. 2017]. W raporcie EFSA podkreślono potrzebę uzupełnienia danych odnośnie synergistycznej toksyczności histaminy i tyraminy oraz putrescyny i kadaweryny, które mogą wzajemnie wzmacniać swoją szkodliwość. Wskazano również na potrzebę zebrania danych dotyczących konsumpcji fermentowanej żywności [EFSA 2011], na potrzeby oceny ryzyka zdrowotnego.

2.5. Metody redukcji zawartości BAs w żywności fermentowanej

Możliwości redukcji zawartości BAs w gotowym produkcie żywnościowym są ograniczone. Związki te charakteryzuje termostabilność, w rezultacie czego procesy termiczne wykorzystywane powszechnie w przetwórstwie spożywczym nie znajdują zastosowania do eliminacji BAs w żywności [Ruiz Capillas i Herrero 2019].

Wysokie ciśnienie hydrostatyczne (HHP, z ang. *High Hydrostatic Pressure*), pakowanie w modyfikowanej atmosferze (MAP, z ang. *Modified Atmosphere Packaging*) oraz promieniowanie jonizujące okazały się skuteczne w zapobieganiu powstawania BAs w fermentowanych produktach mięsnych, co było konsekwencją ograniczania wzrostu mikroorganizmów [Kim i wsp. 2005, Simon–Sarkadi i wsp. 2012, Sun i wsp. 2019, Jaguey–Hernández i wsp. 2021]. Proces fermentacji sam w sobie stanowi metodę konserwacji żywności, w związku z czym najczęściej nie stosuje się dodatkowego procesu utrwalania tej grupy produktów. Ze względu na tradycyjny charakter produktów fermentowanych, wymienione techniki utrwalania nie znajdują szerokiego zastosowania w odniesieniu do tego typu żywności. Wynika to z możliwego negatywnego wpływu ich stosowania na cechy produktu. Przetwórstwo w skali gospodarstw domowych również ogranicza wykorzystanie zaawansowanych metod produkcji.

W żywności fermentowanej, zasadniczą możliwość ograniczenia produkcji BAs zapewnia modyfikacja składu mikrobioty ukierunkowana na zahamowanie wzrostu i aktywności drobnoustrojów wykazujących zdolność do produkcji tych związków oraz promowanie wzrostu i aktywności mikroorganizmów nie wytwarzających lub degradujących BAs. W celu osiągnięcia powyższych efektów podejmowane są próby

stosowania modyfikacji parametrów technologicznych procesu fermentacji i przechowywania (takich jak temperatura, stężenie chlorku sodu) [Halász i wsp. 1999]. Literatura wskazuje, że efektywną strategią może być wykorzystanie kultur starterowych o pożądanej charakterystyce i / lub stosowanie substancji bioaktywnych oddziałujących na mikrobiotę żywności [Alvarez i Moreno-Arribas 2014, Lu i wsp. 2015]. Opisane metody ograniczania produkcji BAs w żywności fermentowanej przedstawiono na Rysunku 2 w Publikacji 4 [Rys 2, P4].

2.5.1. Modyfikacja temperatury oraz stężenia NaCl

Warunki panujące w środowisku żywności, takie jak temperatura, stężenie chlorku sodu, pH czy ciśnienie osmotyczne, determinują wzrost i aktywność obecnych w niej mikroorganizmów. Powyższe czynniki mogą promować lub ograniczać produkcję poszczególnych metabolitów drobnoustrojów. W raporcie EFSA (2011) podkreślono istotność warunków fermentacji i przechowywania żywności w kontekście akumulacji BAs. Optymalna temperatura dla formowania tych substancji przez bakterie mezofilne mieści się w granicach 20 – 37 °C, podczas gdy przy wartościach poniżej 5°C i powyżej 40°C produkcja BAs zmniejsza się. Brak jest jednoznacznej odpowiedzi co do wpływu chlorku sodu na produkcję BAs. Wydaje się, że udział tego czynnika jest zależny od charakterystyki mikroorganizmów odpowiedzialnych za produkcję tych związków [EFSA 2011]. Wendakoon i Sakaguchi (1995) w badaniu *in vitro* wykazali, że chlorek sodu w stężeniach 1 – 3% ogranicza aktywność dekarboksylazy histydyny produkowanej przez *Enterobacter aerogenes* i wzmacnia hamujące działanie ekstraktów roślinnych wobec tego enzymu. Niewiele jest dostępnych danych dotyczących wpływu określonych parametrów środowiska na stężenia BAs w poszczególnych matrycach żywności fermentowanej. W badaniach Halász, Baráth i Holzapfel (1999), wyższe stężenie NaCl (5 vs. 2% NaCl) i wyższa temperatura (30 vs. 11 °C) promowały produkcję BAs w fermentowanej spontanicznie kapuście. W produkcie fermentowanym z kulturami starterowymi charakterystyka dodanych mikroorganizmów była czynnikiem nadrzędnym, determinującym zawartości BAs [Halász i wsp. 1999]. Podobną zależność odnotowali Peñas i wsp. (2010), którzy do fermentacji kapusty zastosowali różne stężenia NaCl – na poziomie 0,5 lub 1,5 % oraz szczepy należące do gatunków *L. plantarum* lub *L. mesenteroides*.

2.5.2. Zastosowanie kultur starterowych

Mikroorganizmy obecne w żywności, zarówno autochtoniczne jak również celowo dodane, odgrywają kluczową rolę w procesie fermentacji i determinują jakość produktu końcowego, w tym zawartość BAs [Marco i wsp. 2021]. Zastosowanie wyselekcjonowanych kultur starterowych niewykazujących zdolności do produkcji BAs i/lub zdolnych do degradacji tych substancji stanowi skuteczną metodę ograniczania zawartości BAs w fermentowanej żywności, co wykazywano w doświadczeniach modelowych. Li i wsp. (2018) wykazali, że inokulacja szczepem *L. curvatus* G-1 spowodowała redukcję sumy analizowanych BAs w fermentowanym produkcie mięsnym o ponad 69 %. W rezultacie zastosowania szczepu *L. plantarum* KL102 jako kultury starterowej do fermentacji tradycyjnych tajskich kiełbas z wieprzowiny, zawartości tyraminy, putrescyny, histaminy i sperminy zostały zredukowane o odpowiednio 57, 40, 18 i 68 % w porównaniu do produktu przygotowanego na bazie fermentacji spontanicznej [Tangwatcharin i wsp. 2019]. Biorąc pod uwagę fermentowane produkty warzywne, pozytywne efekty uzyskano w wyniku zastosowania kultur starterowych do fermentacji kapusty. Rabie i wsp. (2011) wykazali, że inokulacja kapusty szczepami *L. plantarum* 2142, *L. casei* subsp. *casei* 2763 lub *L. curvatus* 2771 spowodowała redukcję sumy BAs o odpowiednio 86, 89 lub 90 % w porównaniu do kapusty fermentowanej spontanicznie. W badaniu Špička i wsp. (2002) w wyniku inokulacji szczepem *L. plantarum* CCM 3769 uzyskano redukcję sumy tyraminy, putrescyny i kadaweryny w zakresie 14 – 80 % w zależności od użytej odmiany kapusty. Zastosowanie szczepów probiotycznych o pożądanej charakterystyce może dodatkowo wzbogacić wartość żywnościową produktu [Fong i wsp. 2020]. Poza charakterystyką danego szczepu istotnym czynnikiem jest jego wpływ na skład mikroorganizmów obecnych w produkcie, w szczególności możliwość hamowania wzrostu i aktywności drobnoustrojów wytwarzających BAs. EFSA (2011) podkreśla konieczność stosowania kultur starterowych, które nie wytwarzają BAs oraz są zdolne do zdominowania mikrobioty natywnej w środowisku żywności [EFSA 2011].

Wśród enzymów odpowiedzialnych za degradację BAs w żywności należy wymienić MAO i DAO oraz wielomiedziowe oksydazy (MCO, z ang. *multicopper oxidase*). Podobnie jak zdolność do produkcji BAs, potencjał do ich degradowania jest cechą charakterystyczną dla poszczególnych szczepów drobnoustrojów [Li i Lu 2020]. Ponadto, niektóre mikroorganizmy są zdolne zarówno do produkcji jak i degradacji BAs [Li i wsp. 2018, Tittarelli i wsp. 2019]. Obecność genów kodujących enzymy odpowiedzialne za

degradację BAs potwierdzono natomiast w genomach wielu szczepów LAB wyizolowanych z fermentowanych produktów spożywczych [Li i wsp. 2018, Li i wsp. 2021].

2.5.3. Zastosowanie roślinnych dodatków

Wykazano, że dodatek ziół, przypraw, ekstraktów roślinnych, olejków eterycznych (EOs, z ang. *essential oils*) lub pojedynczych substancji, takich jak enzymy czy antyoksydanty pochodzenia roślinnego stanowi jedną z obiecujących metod redukcji zawartości BAs w żywności. Skuteczność wymienionych dodatków wynika głównie z ich właściwości antymikrobiologicznych, a podstawowym mechanizmem działania jest uszkodzenie błony cytoplazmatycznej mikroorganizmów [Álvarez-Martínez i wsp. 2021]. Pozostałe mechanizmy obejmują uszkodzenie DNA, hamowanie syntezy kwasów nukleinowych i protein, uszkodzenie ściany komórkowej w wyniku oddziaływań z białkami znajdującymi się na jej powierzchni, interakcje z białkami wewnątrzkomórkowymi, uszczuplanie komórkowych zasobów ATP oraz zaburzenie aktywności *quorum sensing* [Rys 3, P4]. W doświadczeniach modelowych udowodniono, że zastosowanie EOs z m.in. rozmarynu, bazylii, tymianku, czosnku, goździków, szalwii, imbiru i pomarańczy ogranicza wzrost mikroorganizmów i przyczynia się do wydłużenia przydatności do spożycia szybko psujących się ryb i owoców morza [Hassoun i Çoban 2017]. Składniki bioaktywne obecne w dodatkach pochodzenia roślinnego mogą również wpływać hamująco na aktywność produkowanych przez mikroorganizmy dekarboksylaz. Wykazano, że kwasy fenolowe stosowane w stężeniach, które nie wpływają na wzrost bakterii, mogą hamować produkcję histaminy, tyraminy, putrescyny i kadaweryny przez *Enterobacter aerogenes*. Spośród pięciu badanych związków (kwasy: chlorogenowy, galusowy, szikimowy, protokatechowy oraz katechina) katechina była najskuteczniejsza w ograniczaniu produkcji BAs [Zhang i wsp. 2018]. Rodríguez-Caso i wsp. (2003) opisali hamujący wpływ (-)-3-galusanu epigallokatechiny z zielonej herbaty na dekarboksylazę histydyny. Zaproponowany mechanizm przypuszczalnie polegał na modyfikacji struktury i aktywności holoenzymu [Rodríguez-Caso i wsp. 2003]. Pomimo że eksperyment przeprowadzono na enzymach ssaków, można przypuszczać, że podobne efekty mogą wystąpić w komórkach bakteryjnych.

Poza zapewnieniem bezpieczeństwa żywności zastosowanie dodatków pochodzenia roślinnego może skutkować szeregiem dodatkowych korzyści, takich jak wzbogacenie produktu o prozdrowotne składniki oraz nadanie atrakcyjnych cech sensorycznych.

Dodatkowo, roślinne substancje bioaktywne przeznaczone do stosowania w żywności mogą być pozyskiwane z odpadów pochodzących z różnych gałęzi przemysłu. Szacuje się, że produkty roślinne stanowią ok. 87% strat i odpadów w całym łańcuchu dostaw żywności [World Resources Institute 2019], a związane z tym koszty sięgają ok. 940 miliardów USD rocznie. Oprócz strat finansowych, niewykorzystanie wyprodukowanych dóbr przyczynia się do daremnego zużycia nawozów, wody, a także emisji gazów cieplarnianych, co nie pozostaje obojętne dla środowiska naturalnego [FLW 2016, Ueda i wsp. 2022]. Aktualnie, racjonalne zarządzanie produktami ubocznymi i odpadami przemysłowymi stanowi jedno z najważniejszych wyzwań sektora rolno – żywnościowego [Esparza i wsp. 2020]. Różne części roślin, również te uznawane za odpady, są źródłem cennych substancji. Związki polifenolowe, kwasy organiczne, błonnik, karotenoidy, witaminy czy enzymy w nich obecne, mogą być zastosowane do wzbogacenia żywności [Baiano 2014, Chamorro 2022], w tym modyfikacji mikrobioty produktów fermentowanych. Powyższe może mieć pozytywny wymiar ekonomiczny i środowiskowy wynikający z lepszego wykorzystania istniejących zasobów oraz ograniczenia marnotrawienia żywności. Skuteczność w ograniczaniu stężenia BAs zależy głównie od rodzaju, dawki i składu chemicznego dodatku, rodzaju matrycy żywnościowej, charakterystyki i profilu obecnych w niej mikroorganizmów oraz zastosowanych warunków fermentacji i przechowywania [Es'hangi Gorji i wsp. 2014, Majcherczyk i Surówka 2019, Świder i wsp. 2023]. Istotne jest również, na którym etapie produkcji następuje fortyfikacja [Lee i wsp. 2018, Shukla i wsp. 2019]. Zastosowanie EOs w formie mikrokapsułek efektywniej ograniczyło produkcję BAs w wędzonych kiełbasach z koniny w porównaniu do bezpośredniego dodatku EOs do farszu. Wskazuje to, że forma aplikacji może być kolejnym kluczowym czynnikiem determinującym skuteczność tych metod [Yu i wsp. 2021, Li i wsp. 2023]. Zaobserwowano również synergistyczny efekt działania ekstraktów roślinnych w połączeniu z kulturami starterowymi [Lu i wsp. 2015]. Aplikację roślinnych dodatków w celu redukcji zawartości BAs z sukcesem przeprowadzono zarówno w fermentowanych produktach pochodzenia roślinnego, jak i zwierzęcego, przy czym największa liczba dostępnych wyników badań dotyczy fermentowanych produktów mięsnych [Świder i wsp. 2023]. Powstały nieliczne prace opisujące wpływ roślinnych dodatków na zawartość BAs w fermentowanych produktach rybnych [Mah i wsp. 2009, Zhou i wsp. 2016, Kuley i wsp. 2018, Xu i wsp. 2022] oraz mlecznych [Es'hangi Gorji i wsp. 2014, Mozurienne i wsp. 2016, Raoofi i wsp. 2023]. Badania przeprowadzone w roślinnych matrycach

żywnościowych uwzględniały przede wszystkim produkty na bazie soi [Oh i wsp. 2012, Lee i wsp. 2018, Shukla i wsp. 2018, Bahuguna i wsp. 2019, Shukla i wsp. 2019, Mannaa i wsp. 2020, Zhou i wsp. 2023]. Dotychczas opisano również wyniki modelowych doświadczeń przeprowadzonych na produktach zbożowych [Erol i Özdestan Ocak 2020, Hernández–Macias i wsp. 2022]. Przykładowo, zastosowanie ekstraktu z pestek winogron spowodowało redukcję zawartości putrescyny (o 90%), kadaweryny (do wartości poniżej granicy wykrywalności) oraz sumy BAs (o 83%) w fermentowanym produkcie zbożowym *Tarhana* [Akan i Ocak 2019]. Aplikację roślinnych dodatków w celu ograniczenia produkcji BAs w fermentowanych warzywach opisano m.in. dla *kimchi* i kiszanej kapusty. Spośród testowanych dodatków (biała rzodkiew, sproszkowana czerwona papryka, czosnek, imbir, czosnek dęty, kleik ryżowy) największą redukcję BAs w *kimchi* spowodowała fortyfikacja sproszkowaną czerwoną papryką (25–44 %) [Kim i wsp. 2022], podczas gdy wpływ dodatku cebuli lub kminku był zależny od temperatury oraz czasu fermentacji i przechowywania kiszanej kapusty [Majcherczyk i Surówka 2019].

3. HIPOTEZY, CEL I ZAKRES PRACY

Dane literaturowe wskazują, że z uwagi na powszechną obecność amin biogennych (BAs) w żywności mogą one stanowić istotne zagrożenie dla bezpieczeństwa żywności. Dostępne dane dotyczące występowania BAs w żywności fermentowanej pochodzenia roślinnego są niewystarczające do oszacowania ryzyka zdrowotnego dla konsumentów. Niemniej, biorąc pod uwagę, że stężenia BAs mogą różnić się znacznie między fermentowanymi produktami spożywczymi tego samego typu, konieczne jest opracowanie skutecznych metod produkcji, dystrybucji i przechowywania poszczególnych produktów zapewniających kontrolę obecności tych substancji w żywności i diecie. Dane literaturowe wskazują, że skład i charakterystyka mikroorganizmów obecnych w produkcji mogą być kluczowymi elementami, które determinują ilość i rodzaj produkowanych BAs. Zastosowanie czynników wpływających na mikrobiotę produktu może zatem pośrednio przyczynić się do redukcji zawartości BAs w żywności fermentowanej.

Uwzględniając powyższe założenia postawiono następujące **hipotezy badawcze**:

H1. Fermentowane produkty warzywne cechują się wysoką zawartością amin biogennych a ich spożycie stanowi ryzyko wystąpienia niepożądanych efektów zdrowotnych.

H2. Modyfikacja warunków fermentacji (temperatury oraz dodatku NaCl) wpływa na mikrobiotę żywności i zawartość amin biogennych w fermentowanych produktach warzywnych.

H3. Zastosowanie bakterii kwasu mlekowego nieposiadających zdolności do produkcji amin biogennych jako kultury starterowej do fermentacji warzyw obniża zawartości tych związków oraz zmienia mikrobiotę produktu.

Celem pracy były:

- i) ocena ryzyka zdrowotnego związanego z występowaniem amin biogennych w fermentowanej żywności,
- ii) analiza możliwości ograniczenia formowania amin biogennych w fermentowanych warzywach przez modyfikację warunków fermentacji,
- iii) określenie możliwości wykorzystania odpowiednich kultur starterowych do ograniczania obecności amin biogennych w żywności fermentowanej.

Zakres pracy obejmował:

1. Opracowanie metody analitycznej oznaczania amin biogennych i wolnych aminokwasów w żywności. [P1]
2. Przeprowadzenie badań nad występowaniem amin biogennych w fermentowanych warzywach dostępnych na krajowym rynku, na potrzeby oceny ryzyka zdrowotnego. [P1]
3. Opracowanie indeksu amin biogennych dla fermentowanych warzyw, pozwalającego oszacować ryzyko wystąpienia niepożądanych objawów po spożyciu. [P1]
4. Zbadanie wpływu wybranych parametrów technologicznych na zawartość wolnych aminokwasów i amin biogennych w układach modelowych w warunkach fermentacji spontanicznej. [P2]
5. Zbadanie zdolności wybranych bakterii kwasu mlekowego w oparciu o dostępne zasoby mikrobiologiczne do dekarboksylacji aminokwasów. [P3]
6. Przeprowadzenie pilotażowych fermentacji z zastosowaniem wytypowanych bakterii kwasu mlekowego w celu oceny ich wpływu na zawartość wolnych aminokwasów i amin biogennych w modelowym produkcie. [P3]
7. Określenie wpływu wybranych wariantów parametrów technologicznych oraz kultur starterowych na profil bakterii w fermentowanych produktach warzywnych. [P2, P3]
8. Przegląd dostępnych danych literaturowych odnośnie zastosowania roślinnych dodatków do żywności fermentowanej w celu zredukowania zawartości amin biogennych. [P4]

4. MATERIAŁ I METODY BADAŃ

4.1. Materiał badany

Na potrzeby realizacji badań opisanych w [P1] przeanalizowano 85 próbek fermentowanych produktów warzywnych zakupionych na polskim rynku detalicznym. Wśród badanych produktów znalazły się fermentowane: ogórki, kapusta biała, kapusta czerwona, brukselki, brokuł, kalafior, papryka, oliwki, burak, rzodkiewka, biała rzepa, topinambur, marchew, pomidor, dynia, czosnek, seler, pieczarki oraz *kimchi*.

Materiał wykorzystany do przeprowadzenia doświadczeń modelowych opisanych w [P2 i P3] stanowiły ogórki siewne (*Cucumis sativus* L.) odmiany Mirabelle, które zostały zakupione na Warszawskim Rolno–Spożywczym Rynku Hurtowym Bronisze S.A.

Szczepy bakterii – *Lactocaseibacillus casei* KKP 3272 i *Pediococcus pentosaceus* KKP 3273 – pochodziły z zasobów Kolekcji Kultur Drobnoustrojów Przemysłowych IBPRS–PIB i zostały wyizolowane odpowiednio z buraka i pomidora [P3].

4.2. Metody badań

4.2.1. Część technologiczna

Fermentacja spontaniczna

Ogórki umyto, rozdrobniono i przeniesiono do sterylnych szklanych słoików. Następnie dodano przygotowaną wcześniej zalewę zawierającą chlorek sodu. Fermentację spontaniczną przeprowadzono w sześciu różnych wariantach. Zastosowano trzy stężenia NaCl – 0,5; 1,5 lub 5,0% – oraz dwie temperatury fermentacji i przechowywania – 11 ± 1 lub $23\pm 1^\circ\text{C}$. Próbki pobierano co 48 h w pierwszych 240 h fermentacji oraz po 4 i 6 miesiącach przechowywania w celu wykonania pomiaru pH, przeprowadzenia analiz mikrobiologicznych oraz zawartości BAs i FAAs. Dodatkowo w produkcie końcowym wykonano oznaczenie zawartości kwasów organicznych oraz podjęto próbę scharakteryzowania metabolomu otrzymanych produktów. Analizy prowadzono w trzech niezależnych powtórzeniach.

Fermentacja z kulturami starterowymi

Po umyciu i rozdrobnieniu ogórki przeniesiono do sterylnych szklanych słoików i dodano zalewę zawierającą NaCl (końcowe stężenie NaCl w produkcie wynosiło 2,5%) oraz kultury starterowe. Przygotowano siedem różnych wariantów produktu. Zastosowano trzy wielkości inokulum – 10^4 , 10^6 oraz 10^7 jtk·mL⁻¹ – dla każdego z dwóch szczepów bakterii

LAB. Próbę odniesienia (kontrola) stanowiły próbki fermentowane spontanicznie. Produkty przechowywano wstępnie w temperaturze $23\pm 1^{\circ}\text{C}$ przez 1 tydzień. Następnie przechowywano do 6 miesięcy w temperaturze $11\pm 1^{\circ}\text{C}$. Próbki do analizy pH oraz zawartości BAs i FAAs pobierano po 1, 2, 4 i 6 miesiącach. Dodatkowo w produkcie końcowym wykonano oznaczenie zawartości kwasów organicznych oraz scharakteryzowano profil bakterii (NGS). Doświadczenia prowadzono w 3 powtórzeniach biologicznych próbek fermentowanych z kulturami starterowymi oraz w 5 powtórzeniach biologicznych próbek kontrolnych (fermentowanych spontanicznie) w każdym punkcie czasowym.

4.2.2. Analiza chromatograficzna i spektrometria mas

Zawartość amin biogennych i wolnych aminokwasów

Analizę zawartości BAs (histaminy, tyraminy, putrescyny, kadaweryny, sperminy, spermidyny, agmatyny, 2–fenyloetyloaminy i tryptaminy) i FAAs (histydyny, tyrozyny, ornityny, glutaminy, argininy, lizyny, fenyloalaniny i tryptofanu) wykonano techniką chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrią mas (LC–MS) przy użyciu ultra-wysokosprawnego chromatografu cieczowego sprzężonego z wysokorozdzielczym spektrometrem mas z analizą czasu przelotu (Acquity H-class UHPLC – LCQ Premiere XE ToF-HRMS, Waters, Milford, MA, USA) [P1, P2] lub analizatorem typu Orbitrap (UHPLC – HRMS Q Exactive Orbitrap Focus MS, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) [P3]. Rozdział prowadzono na kolumnie Cortecs C18 100 mm \times 2,1 mm \times 1,6 μm (Waters, Milford, MA, USA). Opracowano metodę analityczną a następnie poddano ją walidacji. Szczegółowe parametry metody przedstawiono w publikacji 1 [P1]. Przygotowanie próbek do analizy chromatograficznej obejmowało m.in. etapy homogenizacji, ekstrakcji oraz derywatywacji. Wyniki analizowano przy użyciu oprogramowania MassLynx 4.1 (Waters, Milford, MA, USA) [P1, P2] lub Xcalibur 4.2.47 (Thermo Fisher Scientific, Austin, TX, USA) [P3].

Oznaczenie zawartości kwasów organicznych

Oznaczenie zawartości kwasów mlekowego i octowego wykonano techniką wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detektorem UV (HPLC-UV, Shimadzu, Kyoto, Japonia). Rozdział prowadzono na kolumnie Hi-Plex H 300 mm \times 7,7 mm z przedkolumną Hi-Plex H 50 mm \times 7,7 mm (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, USA).

Analiza bakteryjnych metabolitów

Do oceny metabolomu wykorzystano chromatogramy oraz wysokorozdzielcze widma masowe zarejestrowane za pomocą chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrią mas (UHPLC – HRMS Q Exactive Orbitrap Focus MS, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Dane chromatograficzne i spektroskopowe analizowano za pomocą oprogramowanie Compound Discoverer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Identyfikację potencjalnych metabolitów prowadzono w oparciu o zasoby dostępnych baz danych – ChemSpider, mzCloud oraz KEGG.

4.2.3. Analiza mikrobiologiczna

Liczba bakterii i grzybów

W celu oszacowania liczby LAB, *Enterobacteriaceae*, *Enterococcus* spp., *E. coli*, *Pseudomonas* spp. oraz grzybów wykonano posiewy wykorzystując odpowiednio następujące podłoża agarowe: MRS, VRBD, Enterococcosel, CHROMagar ECC, ChromAgar *Pseudomonas* oraz YPG. Płytki z mikroorganizmami inkubowano w 37°C przez 48 h (LAB i *Enterococcus* spp.) lub 24 h (*Enterobacteriaceae* i *E. coli*), lub w 28°C przez 48 h (*Pseudomonas* spp.) lub 72 h (drożdże i pleśnie).

Profil bakterii

W celu scharakteryzowania profilu bakterii obecnych w produkcie wyizolowano materiał genetyczny przy użyciu zestawu do izolacji Genomic Mini AX Food Kit (A&A Biotechnology, Gdańsk, Polska) [P2] lub DNeasy Power–Food Microbial Kit (Qiagen, GmbH, Hilden, Niemcy) [P3]. Jakość uzyskanego materiału została oceniona z wykorzystaniem spektrofotometru Nanodrop ND–1000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Pomiar ilościowy wykonano przy pomocy fluorometru Qubit 4.0 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Amplifikację regionu V3–V4 bakteryjnego genu 16S rDNA, sekwencjonowanie ampliconów przy użyciu platformy Illumina MiSeq (Illumina, San Diego, CA, USA) oraz analizę bioinformatyczną otrzymanych wyników przeprowadzono w Genomed S.A. [P2] lub Pracowni Biotechnologii i Inżynierii Molekularnej ZM IBPRS–PIB [P3].

Identyfikacja kultur starterowych

Przynależność gatunkowa bakterii wykorzystanych jako kultury starterowe [P3] została zweryfikowana metodami biologii molekularnej – sekwencjonowanie fragmentu 16S

rDNA. W tym celu wyizolowano materiał genetyczny z hodowli bakteryjnych przy użyciu zestawu do izolacji DNeasy Power–Food Microbial Kit (Qiagen, GmbH, Hilden, Niemcy) oraz amplifikowano w reakcji PCR ze specyficznymi starterami. Wykonanie sekwencjonowania zostało wykonane przez Genomed S.A. a otrzymane sekwencje zdeponowano w bazie GenBank pod numerami akcesyjnymi MT994696 (*L. casei* KKP 3272) oraz MT994747 (*P. pentosaceus* KKP 3273).

Obecność genów odpowiedzialnych za produkcję BAs

Materiał genetyczny wyizolowany z badanych szczepów (DNeasy Power–Food Microbial Kit, Qiagen) poddano amplifikacji ze starterami specyficznymi dla wybranych genów kodujących dekarboksylazy (*hdcA*, *cadA*, *tyrdc*, *odc*) oraz deiminazy agmatyny (*agdA*) dostarczonymi przez Genomed S.A. Produkty reakcji PCR rozdzielono na żelu agarozowym w procesie elektroforezy i zwizualizowano pod wpływem promieniowania UV (Gel Doc 1000, Bio–Rad). Jako barwnika użyto SimplySafe™ (EURx Ltd., Gdańsk, Polska).

4.2.4. Analiza statystyczna

Analizę statystyczną wykonano przy użyciu oprogramowania RStudio [P1], R 3.5.0 (R–Tools Technology, Richmond Hill, Kanada) [P3] lub Statistica 13.0 (StatSoft, Kraków, Polska) [P2, P3]. Do oceny istotności różnic pomiędzy wynikami wykorzystano jednoczynnikową analizę wariancji (ANOVA) i test Tukey’a na poziomie ufności 95% oraz analizę głównych składowych (PCA, z ang. *principal component analysis*).

5. OMÓWIENIE I Dyskusja Wyników

5.1. Opracowanie i walidacja metody analitycznej oznaczania BAs i FAAs w żywności.

Na potrzeby realizacji badań i wykonanie oznaczeń zawartości BAs i FAAs w badanych próbkach zdecydowano się na wykorzystanie techniki chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrią mas. Z uwagi na niskie masy cząsteczkowe oraz polarność badanych substancji, ograniczone możliwości wykorzystania modyfikatorów w fazie ruchomej z uwagi na zastosowanie spektrometru mas jako detektora, zdecydowano się na przeprowadzenia badanych związków w odpowiednie pochodne. Dobór sposobu upochadniania uwzględniał przede wszystkim poprawę retencji badanych związków w klasycznych układach chromatograficznych z fazą odwróconą. Po zoptymalizowaniu parametrów procesu izolacji badanych substancji, przeprowadzania ich w pochodne oraz rozdziału chromatograficznego dokonano optymalizacji parametrów pracy spektrometru mas. Prace ukierunkowane były na uzyskanie najwyższej czułości, odpowiedniej powtarzalność pomiarów i ograniczenie szybkości zanieczyszczania źródła jonów. Po określeniu warunków pracy, przeprowadzono proces walidacji metody. Jako matrycę na potrzeby walidacji zastosowano mieszankę fermentowanych warzyw. Do oceny parametrów statystycznych metody posłużono się wartościami odzysku z próbek fortyfikowanych laboratoryjnie oraz powtarzalnością wartości odzysku.

Dla większości analizowanych substancji poziom odzysku mieścił się w granicach 80–110 %. Szczegółowe wyniki walidacji zgromadzone są w Tabelach 1 i 2, w Publikacji 1 [Tabela 1, Tabela 2, P1]. Rozszerzona niepewność pomiarów ($K=2$, $\alpha=0,05$) wynosiła < 10% dla wszystkich badanych związków. Opracowana metoda analityczna charakteryzowała się wysoką precyzją i dokładnością.

5.2. Występowanie BAs w fermentowanych produktach warzywnych

W celu weryfikacji hipotezy 1 [H1] przeprowadzono analizę zawartości BAs i ich prekursorów – FAAs w fermentowanych produktach warzywnych dostępnych na polskim rynku detalicznym oraz oszacowano ryzyko wystąpienia niepożądanych objawów po spożyciu tych produktów. Najniższą średnią zawartością sumy analizowanych BAs charakteryzowały się fermentowane oliwki ($30 \pm 16 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), podczas gdy najwyższe stężenie oznaczono w fermentowanych brukselkach ($612 \pm 359 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) [Tabela 3, P1]. Aminami występującymi w fermentowanych warzywach w najwyższych stężeniach były putrescyna, tyramina, kadaweryna i histamina. Zawartość wymienionych związków

stanowiła średnio 88% sumy 9 analizowanych BAs [Rys 2, P1]. Podobne rezultaty uzyskali Jastrzębska i wsp. (2023). Sumaryczny udział putrescyny, tyraminy, kadaweryny i histaminy w całkowitej zawartości 8 analizowanych BAs w sokach z fermentowanych warzyw stanowił średnio 88%. Zawartości BAs były niższe od uzyskanych w badaniach opisanych w Publikacji 1 [P1]. Najwyższą sumą 8 analizowanych BAs charakteryzował się sok z fermentowanych ogórków ($117 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$). Najniższą sumę badanych związków oznaczono w soku z fermentowanych pomidorów ($6,4 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) [Jastrzębska i wsp. 2023]. Jak wskazano w przeglądzie piśmiennictwa, dostępność danych literaturowych w zakresie występowania BAs w fermentowanych warzywach jest ograniczona a zawartości BAs różnią się znacznie między produktami tego samego typu.

Z przeprowadzonej analizy produktów pochodzących z krajowego rynku wynika, że najwyższą zawartością sumy 8 analizowanych FAAs charakteryzował się fermentowany czosnek, jednakże równocześnie cechowała go stosunkowo niewielka zawartość sumy BAs oraz BAI. Zjawisko to można tłumaczyć obecnością w czosnku allicyny, substancji wykazującej aktywność przeciwdrobnoustrojową, która działając hamująco na rozwój mikroorganizmów w konsekwencji ogranicza produkcję BAs. Ze względu na swoje właściwości czosnek stanowi przedmiot zainteresowania wielu badaczy, a dostępne dane potwierdzają, że dodatek czosnku lub ekstraktu z czosnku może redukować formowanie BAs [Mah i wsp. 2009, Zhou i wsp. 2016, Bahuguna i wsp. 2019, Shukla i wsp. 2019, Kim i wsp. 2022].

5.3. Oszacowanie ryzyka wynikającego ze spożycia fermentowanych produktów warzywnych dostępnych na polskim rynku

Jak wskazano w informacjach wstępnych, zarówno krajowe jak i wspólnotowe prawo żywnościowe nie precyzuje limitów zawartości BAs w fermentowanych warzywach. Ryzyko wystąpienia objawów intoksykacji jest specyficzne dla jednostki, co skutkuje trudnościami w ustaleniu NOAEL. Stąd też na potrzeby oceny ryzyka zdrowotnego związanego z występowaniem amin biogennych w fermentowanej żywności opracowano Indeks Amin Biogennych (BAI, z ang. *Biogenic Amine Index*) dla fermentowanych warzyw. Zaproponowany po raz pierwszy w 1977 roku BAI [Mietz i Karmas 1977] był dotychczas stosowany do oceny jakości (w tym mikrobiologicznej) i/lub świeżości produktów mięsnych [Hernández-Jover i wsp. 1996, Fraqueza i wsp. 2012, Cheng i wsp. 2016] oraz ryb i owoców morza [Yamanaka i wsp. 1989, Veciana–Nogués i wsp. 1997, Baixas–Nogueras i wsp. 2005]. W żywności fermentowanej aktywność

mikroorganizmów stanowi istotę procesu produkcji, a przeznaczeniem produktu jest długotrwałe przechowywanie, stąd zastosowanie BAI w jego klasycznym rozumieniu byłoby częściowo bezzasadne. Zaproponowany w Publikacji 1 [P1] BAI umożliwił klasyfikację produktów do jednej z czterech grup ryzyka wystąpienia niepożądanych objawów po spożyciu żywności zawierającej BAs. Kategorie produktów określono jako niskie, średnie, wysokie i bardzo wysokie ryzyko [Tabela 4, P1]. Na potrzeby modelu przyjęto następujące założenia i) histamina i tyramina są najbardziej toksycznymi BAs występującymi w żywności, ii) putrescyna i kadaweryna mogą wzmacniać ich działanie oraz iii) wymienione 4 BAs występują w żywności w największych ilościach [P1]. W konsekwencji do opisu ryzyka zdrowotnego zaproponowano sumę zawartości histaminy, tyraminy, putrescyny i kadaweryny wyrażonych w $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, co opisano równaniem indeksu BAI. Czynniki takie jak i) dawki histaminy i tyraminy zaproponowane przez EFSA jako NOAEL dla osób zdrowych oraz szczególnie wrażliwych, ii) niewystarczające dane odnośnie bezpiecznych dawek putrescyny i kadaweryny oraz zatruc wywołanych spożyciem fermentowanych warzyw, a także iii) wyniki przeprowadzonej analizy zawartości BAs w fermentowanych produktach warzywnych zostały uwzględnione podczas opracowywania sposobu interpretacji wyników [P1]. Opisane w literaturze modele BAI zaproponowane przez różnych badaczy wraz ze wskazaniem ich zastosowania zaprezentowano w Tabeli 2.

Produkty fermentowane przygotowane na bazie sześciu spośród 19 badanych gatunków/odmian warzyw charakteryzowały się wartością BAI >300 i zostały zaklasyfikowane do grupy o wysokim ryzyku wystąpienia niepożądanych efektów po spożyciu nawet u osób zdrowych. Większość przedstawicieli tej grupy stanowiły produkty przygotowane z warzyw należących do rodziny kapustowatych (*Brassicaceae* Burnett), takie jak fermentowana brukselka, brokuł, kapusta czy *kimchi*. Występowanie dużych ilości BAs w produktach wytworzonych z tych roślin można tłumaczyć stosunkowo wysoką w nich zawartością FAAs – prekursorów BAs. Powyższe potwierdzają doniesienia innych autorów [Lisiewska i wsp. 2009, Park i wsp. 2014]. W sokach z fermentowanych warzyw należących do rodziny kapustowatych całkowita zawartość BAs mieściła się w granicach od $27 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (brokuł) do $88 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (kalafior) [Jastrzębska i wsp. 2023].

Tabela 2. Zastosowanie Indeksu Amin Biogennych do oceny wybranych produktów spożywczych. Opracowano na podstawie Świder i wsp. (2021).

Matryca żywnościowa	Równanie	Zastosowanie	Źródło
Puszkowany tuńczyk	$(\text{HIS} + \text{KAD} + \text{PUT}) / (1 + \text{SPD} + \text{SPM})$	Oszacowanie jakości	Mietz i Karmas 1977
Mięso drobiowe	$\text{HIS} + \text{TYR} + \text{PUT} + \text{KAD}$	Oszacowanie świeżości i jakości	Wortberg i Woller 1982
Kalamarnica zwyczajna	AGM lub $\text{AGM} + \text{KAD}$	Oszacowanie jakości	Yamanaka, Shiomi i Kikuchi 1987
Mięso ryb z rodziny lososiowatych	KAD	Oszacowanie jakości	Yamanaka, Shiomi i Kikuchi 1989
Gotowana peklowana łopatka wieprzowa	$\text{HIS} + \text{TYR} + \text{PUT} + \text{KAD}$	Oszacowanie świeżości	Hernández-Jover i wsp., 1996
Tuńczyk	$\text{HIS} + \text{TYR} + \text{PUT} + \text{KAD}$	Oszacowanie jakości	Veciana-Nogués, Mariné-Font i Vidal-Carou 1997
Mięso drobiowe i przetwory z mięsa drobiowego	SPD / SPM	Oszacowanie jakości	Silva i Glória 2002
Morszczuk śródziemnomorski	$\text{HIS} + \text{TYR} + \text{PUT} + \text{KAD}$	Oszacowanie świeżości i/lub zanieczyszczenia mikrobiologicznego	Baixas-Nogueras i wsp., 2005
Mięso indycze pakowane w atmosferze ochronnej	$\text{PUT} + \text{KAD} + \text{TYR}$	Oszacowanie świeżości	Fraqueza, Alfaia i Barreto 2012
Wieprzowina	$\text{HIS} + \text{TYR} + \text{PUT} + \text{KAD}$	Oszacowanie świeżości i jakości	Cheng, Sun i Cheng 2016
Fermentowane warzywa	$\text{HIS} + \text{TYR} + \text{PUT} + \text{KAD}$	Oszacowanie ryzyka wystąpienia niepożądanych objawów po spożyciu	Świder i wsp., 2020
<i>Sufu</i> – fermentowany produkt sojowy	$(\text{PUT} + \text{KAD} + \text{HIS}) / (\text{PUT} + \text{KAD} + \text{HIS} + \text{TYR} + \text{TRP} + \text{PHE})$	Oszacowanie jakości	Shi i wsp., 2021

Objaśnienia:

HIS – histamina; KAD – kadaweryna; PUT – putrescyna; SPD – spermidyna; SPM – spermina; TYR – tyramina; TRP – tryptamina; PHE – fenyletyloamina; AGM – agmatyna.

Według danych prezentowanych przez innych autorów stężenia poszczególnych BAs w próbkach fermentowanej kapusty sięgały nawet do ponad $950 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ [Kalač i wsp. 2000, Peñas i wsp. 2010, Dabadé i wsp. 2021], a maksymalne zawartości histaminy i kadaweryny w *kimchi* wynosiły odpowiednio 5350 i $1550 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ [Park i wsp. 2019]. Powyższe przykłady dowodzą, że fermentacja jest złożonym procesem a skład chemiczny wytwarzanych z udziałem tego procesu produktów jest zależny od wielu czynników. Stąd też konieczne jest opracowanie efektywnych procedur zapewniających wytworzenie produktów bezpiecznych dla konsumentów i o możliwie najwyższej jakości żywieniowej. Relatywnie niewielkie stężenie FAAs oraz stosunkowo wysoka zawartość BAs w fermentowanych ogórkach, klasyfikująca ten produkt w grupie o wysokim ryzyku wystąpienia niepożądanych objawów po spożyciu, świadczą o efektywnej konwersji prekursorów przez obecną w ogórkach mikrobiotę. Dane zgromadzone w ramach badań opisanych w Publikacjach 2 i 3 [P2 i P3] oraz prezentowane przez innych autorów [Moore i wsp. 2022] potwierdzają wysoką zawartość prekursorów BAs w surowych ogórkach, wśród których w zmiennych proporcjach dominują glutamina i arginina (maksymalnie odpowiednio $2\,267$ i $579 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$). Ponadto, w badaniu Jastrzębskiej i wsp.

(2023) sok z fermentowanych ogórków charakteryzował się najwyższym stężeniem sumy analizowanych BAs ($117 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) spośród badanych soków z fermentowanych warzyw (białej lub czerwonej kapusty, ogórków, pomidorów, kalafiora, selera naciowego, liści selera naciowego, brokułów i buraków). Putrescyna i tryptamina występowały w tym produkcie w największych stężeniach (odpowiednio 56 i $36 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, co stanowi odpowiednio 48 i 31% sumy BAs).

W oparciu o zaproponowany BAI na podstawie wyników badań przedstawionych w Publikacji 1 [P1] sklasyfikowano pozostałe grupy produktów. Średnie ryzyko wystąpienia niepożądanych objawów dotyczyło spożycia fermentowanych kalafiora, dyni lub selera, natomiast niskie ryzyko wskazano dla pozostałych 10 produktów (fermentowane marchew, rzodkiewka, czosnek, pomidory, buraki, pieczarki, biała rzepa, topinambur, papryka i oliwki).

5.4. Zastosowanie modyfikacji wybranych parametrów produkcji i przechowywania w modelowym produkcie w warunkach fermentacji spontanicznej

Jednym z kluczowych czynników determinujących wzrost i aktywność mikroorganizmów są warunki środowiska żywności. Wśród najważniejszych czynników należy wskazać temperaturę oraz stężenie NaCl [Hamad 2012]. Analiza wpływu warunków fermentacji i przechowywania żywności na profil bakterii oraz zawartość BAs i FAAs stanowiła przedmiot badań mających na celu weryfikację hipotezy 2 [H2], opisanych w Publikacji 2 [P2]. Na potrzeby badań wykorzystano układ modelowy spontanicznie fermentowanych ogórków siewnych (*Cucumis sativus* L.).

Jako materiał modelowy został użyty ogórek siewny (*Cucumis sativus* L.), ponieważ w badaniach wstępnych wykazano, że fermentowane ogórki charakteryzowały się jedną z najwyższych zawartości BAs spośród badanych warzyw. Brak jest kompleksowych danych o wielkości spożycia tego rodzaju produktów przez polskich konsumentów. Niemniej jest to produkt tradycyjnie spożywany w Polsce a powszechna dostępność fermentowanych ogórków na krajowym rynku świadczy o szerokim zainteresowaniu konsumentów tym produktem. Produkcja ogórka warzywnego w Polsce obejmuje corocznie powierzchnię $5 - 6$ tys. ha co przy plonowaniu w zakresie $25 - 40$ t przekłada się na produkcję szacowaną pomiędzy 125.000 a 240.000 ton. Jest to bardzo duża ilość surowca o dużym znaczeniu gospodarczym [Internet 1, Internet 2].

5.4.1. Wpływ zastosowanych warunków na mikrobiotę modelowego produktu

Wyniki uzyskane w oparciu o metody mikrobiologii klasycznej pokazały, że liczba komórek LAB zwiększyła się w pierwszych 240 h fermentacji z początkowej wartości $\log(\text{jtk}\cdot\text{mL}^{-1})$ wynoszącej ok. 2 do $\log(\text{jtk}\cdot\text{mL}^{-1})$ wynoszącej około 7. Wykazano, że po 144 h badane warianty parametrów fermentacji nie różniły się między sobą w sposób istotny statystycznie w zakresie stężenia komórek bakteryjnych [Tabela S2, P2]. Podobny wynik uzyskali Stoll i wsp. (2020) po 2 tygodniach fermentacji spontanicznej ogórków w solance zawierającej dodatek chlorku sodu w zakresie 2,5 – 10 %. Liczba bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae* zmieniała się dynamicznie w początkowych etapach fermentacji. Po 240 h istotnie niższą liczbą bakterii należących do tej rodziny charakteryzowały się próbki fermentowane w temperaturze 23°C oraz w warunkach 11°C / 0,5% NaCl [Tabela S3, P2] w porównaniu do pozostałych wariantów. Wzrost grzybów został całkowicie zahamowany po 96 lub 144 h procesu [Tabela S4, P2], co prawdopodobnie wynikało z wyczerpania dostępnego tlenu. Liczba bakterii z rodzaju *Enterococcus* spp. uległa zwiększeniu z wartości $\log(\text{jtk}\cdot\text{mL}^{-1}) \sim 3$ do $\log(\text{jtk}\cdot\text{mL}^{-1}) \sim 6-7$ w początkowych 240 h fermentacji. Nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic pomiędzy analizowanymi wariantami [Tabela S5, P2]. Po 6 miesiącach przechowywania ponownie scharakteryzowano skład bakterii obecnych w próbkach wykorzystując do tego celu metody genetyczne [Rys 3, P2]. Wraz ze wzrostem stężenia NaCl zmniejszał się udział bakterii należących do rodzaju *Lactobacillus* (wg starej nomenklatury). Najbardziej odmienny i zróżnicowany skład bakterii reprezentowały próbki zawierające dodatek 5% NaCl. W ostatnim przypadku, w badanym materiale przeważały bakterie Gram-ujemne należące do rzędu Enterobacterales, takie jak *Enterobacter*, *Erwinia* czy *Pantoea*, które są mikroorganizmami uznawanymi za niepożądane w procesie fermentacji żywności. Bakterie *Enterobacter cloacae* stanowią prawdopodobnie najczęstszą przyczynę zepsucia fermentowanych ogórków [Pérez-Díaz i wsp. 2019]. Stoll i wsp. (2020) po 8 tygodniach fermentacji spontanicznej ogórków, stwierdzili, że bakterie z rodziny *Enterobacteriaceae* były obecne jedynie w nielicznych próbkach fermentowanych z solanką zawierającą 5% NaCl a ich liczba była nie większa niż $\log(\text{jtk}\cdot\text{mL}^{-1})$ wynoszący 3. Dominujące rodzaje bakterii w wariantach z dodatkiem solanki o stężeniu 2,5 lub 5,0 % NaCl stanowiły *Lactobacillus* spp., *Pediococcus* spp. i *Lactococcus* spp. podczas gdy w próbkach zawierających solankę o stężeniu 10% NaCl największy procentowy udział reprezentował rodzaj *Pediococcus* spp. Stosunkowo duży

udział bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae* w próbkach otrzymanych w wyniku eksperymentu opisanego w Publikacji 2 [P2] (20 – 45 %) mógł być wynikiem początkowej kontaminacji użytego surowca tą grupą bakterii. Przeprowadzone badania wykazały $\log(\text{jtk}\cdot\text{mL}^{-1}) = 6,6$, co jest wartością zdecydowanie wyższą od podawanej w pracach innych badaczy. Ponadto, na podstawie przeprowadzonych badań obserwowano w materiale wyjściowym relatywnie niższą początkową liczbę LAB [Pérez–Díaz i wsp. 2019, Stoll i wsp. 2020].

5.4.2. Wpływ zastosowanych warunków na BAs

Świeże ogórki charakteryzowały się niską zawartością BAs, wśród których dominowały putrescyna ($6,9\pm 3 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) i spermidyna ($14\pm 1,4 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) [P2]. W badaniu Moret i wsp. (2005) również wykazano, że powyższe związki występują w największych stężeniach (odpowiednio 29 i 10 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$). Zawartość sperminy w zastosowanym do badań surowcu wynosiła ($2,6\pm 0,22 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) a stężenia pozostałych BAs były niższe od 1 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ (histamina, tyramina, kadaweryna) lub granicy wykrywalności (agmatyna, 2-fenyletyloamina, tryptamina) [P2].

Istnieje niewiele doniesień literaturowych opisujących wpływ warunków fermentacji spontanicznej na zawartość BAs w modelowych produktach spożywczych, w szczególności w fermentowanych warzywach. W eksperymencie opisanym w Publikacji 2 [P2], na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono, że stężenia BAs i FAAs w modelowych produktach zmieniały się w czasie w sposób losowy, bez istotnych korelacji i statystycznie istotnych różnic obserwowanych pomiędzy wariantami. Jedynie próbki w których dodatek NaCl wynosił 0,5%, fermentowane i przechowywane w 11°C, charakteryzowały się istotnie niższą zawartością histaminy i wyższą histydyny niż w pozostałych wariantach. Zaobserwowana redukcja histaminy w jednym z wariantów nie znalazła odzwierciedlenia w odmiennym profilu bakterii lub zawartości kwasów organicznych w produkcie końcowym. W składzie dominował rodzaj *Lactobacillus* (54%) (wg starej nomenklatury), podobnie jak w wariantach 0,5 lub 1,5% NaCl / 23°C (odpowiednio 62 i 63 %), a zawartość kwasu mlekowego nie różniła się statystycznie istotnie od wartości zmierzonej w próbkach fermentowanych w warunkach 0,5% NaCl / 23°C. Zawartości BAs i FAAs różniły się między powtórzeniami biologicznymi – próbkami fermentowanymi w tych samych warunkach, pobranymi w jednym punkcie czasowym. Istotna zmienność składu chemicznego badanych produktów wskazuje na istotne różnice w szybkości rozwoju (i składzie)

mikroorganizmów pomimo zastosowania jednolitego i homogennego wyjściowego materiału. Na potrzeby wyjaśnienia obserwowanych różnic konieczna jest szczegółowa analiza mikrobioty tak fermentowanej żywności w czasie, uwzględniająca izolację, identyfikację i charakterystykę pojedynczych mikroorganizmów. Niemniej, na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że modyfikacja temperatury i stężenia NaCl w badanym zakresie, w procesie fermentacji spontanicznej jest niewystarczająca do uzyskania produktu wystandaryzowanego pod względem zawartości BAs.

5.4.3. pH i kwasy organiczne

Wartości pH w produktach końcowych uzyskanych w warunkach modelowych mieściły się w zakresie 3,4 – 3,7 [Tabela S1, P2], a więc były podobne do tych opisanych w literaturze (3,2 – 3,6) dla tego typu produktów [Pérez-Díaz i wsp. 2014, Stoll i wsp. 2020]. Próbkę fermentowanych ogórków uznane za zepsute charakteryzują się wartością pH w granicach 3,7 – 4,4 [Franco i wsp. 2012], choć niektórzy autorzy wskazują, że cechy charakterystyczne dla zepsucia mogą rozwinąć się w produkcie o pH wynoszącym 3,3 [Medina i wsp. 2016]. Stężenie kwasu mlekowego w próbkach po 240 h fermentacji było istotnie wyższe dla wariantów fermentowanych w temperaturze 23°C niezależnie od stężenia NaCl, podczas gdy po 6 miesiącach przechowywania było tym wyższe im mniejszy dodatek NaCl, niezależnie od zastosowanej temperatury [Tabela S26, P2]. Biorąc pod uwagę powyższe, w początkowych etapach fermentacji temperatura odgrywa bardziej istotną rolę w aspekcie aktywności LAB w porównaniu do stężenia NaCl, które jest kluczowe podczas długotrwałego przechowywania. Zawartość kwasu mlekowego zwiększyła się w trakcie przechowywania we wszystkich wariantach. Najmniejszą różnicę w stężeniach kwasu mlekowego między próbkami pobranymi po 240 h lub 6 miesiącach odnotowano dla wariantów zawierających 5% NaCl. Według danych literaturowych, prawidłowo przygotowane fermentowane ogórki charakteryzowały się stężeniem kwasu mlekowego równym $10,4 \pm 2,2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. Uzyskane wyniki badań opisane w Publikacji 2 [P2] wskazywały na końcowe zawartości kwasu mlekowego w zakresie 3,2 – 6,4 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ i były zbliżone do wartości charakterystycznych dla zepsutych produktów (3,1 – 6,3 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) [Franco i wsp. 2012]. W początkowych etapach fermentacji stężenie NaCl było kluczowym czynnikiem determinującym zawartość kwasu octowego. Zawartość tego metabolitu była tym wyższa im niższe stężenie NaCl. Po 6-miesięcznym przechowywaniu nie odnotowano istotnych różnic w stężeniu kwasu octowego między

analizowanymi wariantami [Tabela S26, P2]. Uzyskane stężenia mieściły się w zakresie 0,29 – 0,50 g·L⁻¹. Podobną zawartość (0,23 g·L⁻¹) w próbkach, do których nie dodawano kwasu octowego na początku procesu uzyskali McMurtrie i wsp. (2019). W próbkach zawierających dodatek tego kwasu na poziomie 1,5 g·L⁻¹, jego stężenie w solance po 21 dniach fermentacji było równe 1,8 g·L⁻¹. Podobna końcowa zawartość, jako prawidłowa dla tego typu produktów, została wskazana przez innych autorów (1,5 g·L⁻¹). Stężenia dwukrotnie wyższe od wskazanych powyżej były oznaczane w produktach, w których fermentacja zakończyła się niepowodzeniem [Franco i wsp. 2012]. Generalnie, zepsucie fermentowanych ogórków charakteryzuje się wzrostem pH, który umożliwia rozwój mikroorganizmów zdolnych do konwersji kwasu mlekowego do kwasów octowego, propionowego i masłowego [Franco i wsp. 2012]. W doświadczeniu opisanym w Publikacji 2 [P2] zawartość kwasu octowego uległa zmniejszeniu w trakcie przechowywania. Wyjątkiem były próbki zawierające dodatek 5% NaCl, w których stężenie tego metabolitu nie zmieniło się (0,5 g·L⁻¹; 11°C) lub uległo zwiększeniu (z 0,39 do 0,47 g·L⁻¹; 23°C). Profil bakterii w próbkach zawierających 5% NaCl charakteryzował się stosunkowo niewielkim udziałem LAB oraz dominacją bakterii należących do rzędu Enterobacterales, tj. *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Erwinia* i *Pantoea* [Rys 3, P2]. Powyższe wskazuje, że zmieniony mikrobiom żywności wpłynął na przebieg procesu fermentacji i skład chemiczny końcowego produktu.

5.4.4. Metabolomika

Metabolomika to intensywnie rozwijający się obszar nauki, który obejmuje analizę systemów biologicznych, takich jak tkanki, komórki czy organizmy, pod względem produkowanych w procesach metabolicznych substancji chemicznych. Ma on na celu identyfikację metabolitów i porównanie ich profilu w różnych warunkach, np. standardowych vs. zmienionych w wyniku interwencji farmakologicznej czy modulacji parametrów środowiska [Klassen i wsp. 2017]. Poza badaniami klinicznymi, metabolomika znajduje zastosowanie w naukach o żywności, w tym analizie składników żywności, ocenie jakości, bezpieczeństwa i autentyczności produktów spożywczych oraz monitorowaniu spożycia i procesów fizjologicznych w badaniach interwencyjnych [Wishart 2008, Wu i wsp. 2022]. Próba scharakteryzowania metabolomu otrzymanych produktów – fermentowanych spontanicznie ogórków za pomocą analizy widm masowych rejestrowanych w wysokiej rozdzielczości – umożliwiła detekcję w badanym

materiale 1072 substancji (tzw. cech molekularnych odpowiadających substancjom chemicznym lub różnym formom jakie dana substancja uzyskała po jonizacji). Większość substancji nie została zidentyfikowana w oparciu o dostępne bazy danych i zastosowane algorytmy identyfikacji i filtrowania danych uzyskanych przy użyciu spektrometrii mas. W oparciu o porównanie badanych wariantów fermentacji wykazano, że przy zastosowaniu tej samej temperatury próbki różniły się tym bardziej im większa była między nimi różnica w stężeniu dodanego NaCl. Największymi różnicami przy zastosowaniu różnych temperatur charakteryzowały się próbki zawierające dodatek 5,0% NaCl [Rys S1A–I, P2]. Zmienność między próbkami zobrazowano na wykresie głównych składowych [Rys S2, P2]. Brak obserwowanego istotnego grupowania się powtórzeń biologicznych w klastry potwierdza, że warunki fermentacji spontanicznej nie umożliwiają standaryzacji produktu.

5.5. Zastosowanie wybranych kultur starterowych w celu otrzymania produktu o zredukowanej zawartości BAs

5.5.1. Oszacowanie zdolności wybranych szczepów do produkcji BAs

Jedną z metod ograniczania produkcji BAs w fermentowanej żywności jest użycie wyselekcjonowanych kultur starterowych, niewykazujących zdolności do produkcji tych związków. Eksperymenty opisane w Publikacji 3 [P3] miały na celu ocenę dwóch szczepów LAB – *Lactocaseibacillus casei* KKP 3272 i *Pediococcus pentosaceus* KKP 3273 – jako potencjalnych kultur starterowych do fermentacji ogórków siewnych (*Cucumis sativus* L.). Szczepy te wyselekcjonowano w badaniach wstępnych (dane nieopublikowane). Kryteria oceny zostały zaczerpnięte z raportu EFSA (2011) i uwzględniały zdolność do produkcji BAs oraz do zdominowania mikrobioty autochtonicznej w środowisku żywności, co stanowiło podstawę weryfikacji hipotezy 3 [H3]. Na podstawie amplifikacji materiału genetycznego ze specyficznymi starterami oraz wizualizacji wyników w procesie elektroforezy [Rys 1, P3] stwierdzono brak obecności genów *hdcA*, *cadA*, *tyrdc*, *odc* oraz *agdA* w genomach badanych szczepów. Geny te są odpowiedzialne za dekarboksylację odpowiednio histydyny, lizyny, tyrozyny i ornityny, oraz deiminację agmatyny, a w konsekwencji wytwarzanie histaminy, kadaweryny, tyraminy i putrescyny.

5.5.2. Wpływ zastosowanych kultur na mikrobiotę modelowego produktu

W doświadczeniu modelowym zastosowano trzy wielkości inokulum bakteryjnego – 10^4 , 10^6 oraz 10^7 jtk·mL⁻¹. Próbkę odniesienia (kontrolną) stanowiły produkty fermentowane spontanicznie. Po 6 miesiącach przechowywania przeprowadzono analizę profilu bakterii. Udział bakterii z rodziny *Lactobacillaceae* wzrastał wraz ze wzrostem wielkości inokulum. W próbkach z dodatkiem 10^7 lub 10^6 jtk·mL⁻¹ *L. casei* KKP 3272 dominował rodzaj *Lactobacillus* (wg starej nomenklatury) (odpowiednio 79 lub 68% względnej abundancji wszystkich taksonów). W próbkach, w których jako kulturę starterową zastosowano 10^7 lub 10^6 jtk·mL⁻¹ *P. pentosaceus* KKP 3273 przeważały bakterie z rodzaju *Pediococcus* (odpowiednio 93 lub 54%). Aplikacja 10^4 jtk·mL⁻¹ każdego ze szczepów umożliwiła rozwój bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae*, których relatywny udział w społeczności bakterii w produkcie końcowym wynosił od 33 do 47% odpowiednio dla szczepów *L. casei* KKP 3272 oraz *P. pentosaceus* KKP 3273. W produkcie fermentowanym spontanicznie przedstawiciele rodzin *Enterobacteriaceae* i *Lactobacillaceae* stanowili odpowiednio 47 i 43%, a udział rodzajów *Enterobacter*, *Lactobacillus* (wg starej nomenklatury) i *Pediococcus* wynosił odpowiednio 35, 22 i 20%. Wykresy ilustrujące procentowy udział bakterii na poziomach rodziny i rodzaju przedstawiono na Rysunku 3 w Publikacji 3 [Rys 3, P3].

5.5.3. Wpływ zastosowanych kultur na BAs i BAI w modelowym produkcie

Badania opisane w Publikacji 3 [P3] wykazały, że wraz ze wzrostem liczby komórek bakterii zastosowanych jako inokulum zmniejszała się zawartość histaminy, tyraminy, putrescyny i kadaweryny, a w konsekwencji BAI w końcowym produkcie. W porównaniu do próbek kontrolnych, zawartości wymienionych BAs oraz BAI po 6 miesiącach przechowywania były zredukowane o 91%, 64%, 96%, 17% oraz 78% w próbkach, w których jako kulturę starterową zastosowano 10^7 jtk·mL⁻¹ *L. casei* KKP 3272, oraz o 99%, 96%, 95%, 51% i 90% w próbkach z dodatkiem 10^7 jtk·mL⁻¹ *P. pentosaceus* KKP 3273. Aplikacja 10^6 jtk·mL⁻¹ każdej z kultur starterowych, również spowodowała istotne obniżenie zawartości wymienionych czterech BAs w produkcie końcowym, przy czym szczep *P. pentosaceus* KKP 3273 wykazał znacząco wyższą efektywność w ograniczaniu produkcji histaminy i putrescyny oraz BAI. Wartości BAI obliczone dla produktów fermentowanych z dodatkiem 10^6 jtk·mL⁻¹ *L. casei* KKP 3272 lub *P. pentosaceus* KKP 3273 były zredukowane o odpowiednio 37 lub 70% w porównaniu do produktu

kontrolnego. Biorąc pod uwagę wartości BAI, obliczone na podstawie równania zaproponowanego w Publikacji 1 [P1], próbki fermentowane z dodatkiem badanych szczepów na poziomie 10^7 lub 10^6 jtk·mL⁻¹ charakteryzowały się niskim ryzykiem wystąpienia niepożądanych objawów po spożyciu, podczas gdy pozostałe warianty cechowało średnie ryzyko. W badaniu Špička i wsp. (2002) również wykazano, że efektywna redukcja BAs nastąpiła przy zastosowaniu minimum 5×10^5 jtk·g⁻¹, a ostateczna rekomendacja autorów uwzględniała stosowanie nie mniej niż 5×10^6 jtk·g⁻¹ badanego szczepu w celu wytworzenia fermentowanej kapusty o obniżonej zawartości BAs.

Agmatyna jest jednym z bezpośrednich prekursorów putrescyny. Biorąc pod uwagę, że badane szczepy nie kodowały *agdA*, zawartość agmatyny była najwyższa w próbkach z dodatkiem 10^7 jtk·mL⁻¹ kultur starterowych i zmniejszała się wraz ze zmniejszeniem wielkości inokulum. Istotnie niższe stężenie tej aminy, w zakresie od 2,4 do 5,9 mg·kg⁻¹ w końcowym produkcie, świadczy o aktywności enzymatycznej mikroorganizmów autochtonicznych, których wzrost i rozwój umożliwiło zastosowanie wielkości inokulum równej 10^4 jtk·mL⁻¹ oraz fermentacja spontaniczna. Zawartości pozostałych analizowanych BAs były stosunkowo niskie. Stężenie sperminy pozostawało na podobnym poziomie we wszystkich wariantach podczas trwania eksperymentu. Zawartość spermidyny uległa zmniejszeniu w wyniku fermentacji (w porównaniu do surowca) i była istotnie wyższa w produktach fermentowanych spontanicznie oraz z dodatkiem szczepu *P. pentosaceus* KKP 3273. Stężenia 2-fenyletyloaminy mieściły się w granicach od wartości <LOQ (granica oznaczalności, z ang. *limit of quantification*) do 1,6 mg·kg⁻¹ i w większości przypadków były tym niższe im większą liczbę bakterii zastosowano jako inokulum.

Początkowa suma zawartości analizowanych wolnych aminokwasów w surowcu (2718 mg·kg⁻¹), w wyniku fermentacji uległa zmniejszeniu do wartości w zakresie 226 – 526 mg·kg⁻¹ w produkcie końcowym [Tabela A1, P3].

5.5.4. pH i kwasy organiczne

Jak podkreślano wcześniej, dane literaturowe wskazują, że pH fermentowanych ogórków mieści się w granicach od 3,2 do 3,6 [Pérez-Díaz i wsp. 2014, Stoll i wsp. 2020], co pozostaje w zgodzie z wynikami zgromadzonymi w ramach eksperymentu opisanego w Publikacji 3 [Tabela A2, P3]. Stężenie kwasu mlekowego po 6 miesiącach przechowywania mieściło się w zakresie od 7,3 do 8,2 g·L⁻¹, a zmierzone zawartości nie różniły się istotnie pomiędzy analizowanymi wariantami fermentacji. Podobne wyniki

uzyskali inni autorzy [Stoll i wsp. 2020, Moore i wsp. 2021]. Zawartość kwasu octowego nie przekraczała $0,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ i była znacząco niższa w próbkach zawierających dodatek 10^7 jtk $\cdot\text{ml}^{-1}$ kultur starterowych, odpowiednio $0,13 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ dla szczepu *P. pentosaceus* KKP 3273 i $0,39 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ dla szczepu *L. casei* KKP 3272 [Rys 4, P3]. Uzyskane wyniki były charakterystyczne dla prawidłowo przeprowadzonej fermentacji.

6. PODSUMOWANIE I WNIOSKI

Na podstawie przeprowadzonych w ramach pracy badań wykazano, że zawartość BAs w fermentowanych produktach warzywnych zależy od gatunku / odmiany warzyw i charakterystyki składników dodawanych do produktu. Kluczowe znaczenia dla obecności BAs wywiera mikrobiota autochtoniczna i dodana, dostępności prekursorów, a także warunki w jakich zachodzi proces fermentacji i warunki przechowywania żywności. Ze względu na mnogość czynników determinujących zawartość BAs, nawet produkty tego samego typu mogą różnić się znacznie pod względem stężenia tych substancji. Dominującymi BAs w fermentowanych warzywach są putrescyna, tyramina, kadaweryna i histamina, których średni udział w całkowitej zawartości 9 analizowanych BAs w badanych produktach wynosił odpowiednio 42, 20, 18 i 8% (sumarycznie 88%). Zgodnie z zaproponowanym Indekssem Amin Biogennych prawie połowa spośród 19 badanych gatunków / odmian warzyw została sklasyfikowana jako stwarzająca wysokie (6) lub średnie (3) ryzyko wystąpienia niepożądanych efektów zdrowotnych w wyniku spożycia, podczas gdy pozostałe analizowane gatunki / odmiany (10) charakteryzowały się niskim ryzykiem. Wysokie ryzyko dotyczyło warzyw należących do rodziny kapustowatych (*Brassicaceae*) (brukselki, brokuł, *kimchi*, biała i czerwona kapusta) oraz ogórków (*Cucumis sativus* L.). Fermentowane kalafior, dynia i seler zostały zaklasyfikowane do grupy o średnim ryzyku. Fermentowane marchew, rzodkiewka, czosnek, pomidory, buraki, pieczarki, biała rzepa, topinambur, papryka i oliwki znalazły się w grupie o niskim ryzyku wystąpienia niepożądanych efektów zdrowotnych w wyniku spożycia.

Biorąc pod uwagę, że BAs powstają w żywności głównie w wyniku działalności mikroorganizmów a aktywność metaboliczna drobnoustrojów zmienia się w zależności od warunków środowiska, założono, że zmienione parametry fermentacji i przechowywania wpłyną istotnie na zawartość BAs w fermentowanych ogórkach. Modyfikacja temperatury (11 lub 23°C) i stężenia chlorku sodu (0,5; 1,5 lub 5,0%) w modelowym produkcie w warunkach fermentacji spontanicznej nie umożliwiła uzyskania produktu o stabilnym składzie mikroorganizmów i niskiej zawartości BAs. Proces fermentacji nawet we względnie wystandaryzowanych warunkach dla jednolitego surowca zachodzi losowo rozpatrując skład chemiczny powstających metabolitów. Zastosowane parametry temperatury lub stężenia chlorku sodu nie są wystarczające do

kontrolowania procesu, stąd konieczne jest użycie dodatkowych zabiegów mających na celu ograniczenie zawartości BAs produkowanych w procesie fermentacji.

Biorąc pod uwagę doniesienia literaturowe o skuteczności stosowania kultur starterowych do wytwarzania produktów fermentowanych o zredukowanej zawartości BAs podjęto próbę wyselekcjonowania bakterii o pożądanej charakterystyce spośród zasobów Kolekcji Kultur Drobnoustrojów Przemysłowych IBPRS–PIB i przetestowania ich skuteczności w badanym materiale. W wyniku zastosowania kultur starterowych charakteryzujących się brakiem zdolności do wytwarzania histaminy, tyraminy, putrescyny i kadaweryny, w modelowym procesie fermentacji ogórków uzyskano produkt o istotnie zredukowanej zawartości BAs w porównaniu do produktu fermentowanego spontanicznie. Liczba komórek bakterii zastosowanych jako inokulum istotnie wpłynęła na mikrobiotę produktu oraz zawartość BAs, a w konsekwencji BAI. Obliczone wartości wskaźnika BAI zostały istotnie obniżone o 70 lub 90% w wyniku użycia szczepu *P. pentosaceus* KKP 3273 w stężeniach odpowiednio 10^6 lub 10^7 jtk·mL⁻¹. Wykorzystanie kultury starterowej *L. casei* KKP 3272 w stężeniu 10^7 jtk·mL⁻¹ spowodowało redukcję BAI o 78%. Opisane rezultaty umożliwiły zaklasyfikowanie otrzymanych produktów do grupy o niskim ryzyku wystąpienia niepożądanych objawów po spożyciu, podczas gdy produkty otrzymane w wyniku inokulacji 10^4 jtk·mL⁻¹ każdym ze szczepów lub fermentacji spontanicznej charakteryzowały się średnim ryzykiem. Biorąc pod uwagę powyższe, nie mniej niż 10^6 jtk·mL⁻¹ badanych kultur starterowych powinno być stosowane w celu zapewnienia bezpieczeństwa produktu końcowego pod względem zawartości BAs. Znacząca poprawa bezpieczeństwa wynikająca z zastosowania odpowiedniej wielkości inokulum bakteryjnego wynikała ze zdominowania środowiska produktu przez kultury starterowe i zahamowania wzrostu mikroorganizmów autochtonicznych, zdolnych do produkcji BAs. Udział bakterii z rodziny *Lactobacillaceae* w próbkach fermentowanych ze szczepem *P. pentosaceus* KKP 3273 lub *L. casei* KKP 3272 w stężeniach 10^7 jtk·mL⁻¹ był równy odpowiednio 97 lub 79%, a rodzaje *Pediococcus* i *Lactobacillus* (wg starej nomenklatury) stanowiły odpowiednio 93 i 79%.

Dalsze poszukiwania skutecznych metod ograniczania zawartości BAs w żywności fermentowanej skupiły się na analizie możliwości wykorzystania do tego celu dodatków roślinnych. Ze względu na stosunkowo nieliczne doniesienia literaturowe w tym zakresie oraz brak kompleksowego opracowania dostępnych danych dokonano podsumowania aktualnej wiedzy w artykule przeglądowym. Opisane w literaturze poziomy redukcji BAs

w żywności fermentowanej wynikające z zastosowania roślinnych dodatków jako źródeł substancji aktywnych (bakteriostatycznych) różniły się znacznie, a w niektórych przypadkach nie osiągnięto zamierzonego efektu. Efektywność roślinnych dodatków do żywności zależy głównie od rodzaju, dawki i składu chemicznego dodatku; formy aplikacji i etapu, na którym następuje fortyfikacja; charakterystyki matrycy i obecnej mikrobioty oraz warunków fermentacji i przechowywania. Skuteczność substancji roślinnych w ograniczaniu zawartości BAs wynika z ich właściwości antymikrobiologicznych. Wykorzystanie tej metody ograniczania zawartości BAs w żywności umożliwia osiągnięcie dodatkowych pozytywnych efektów, takich jak wzbogacenie produktu o prozdrowotne składniki oraz nadanie atrakcyjnych cech sensorycznych. Ponadto wykorzystanie roślinnych produktów ubocznych pochodzących z różnych gałęzi przemysłu do pozyskiwania substancji przeznaczonych do stosowania w żywności stanowi perspektywiczne rozwiązanie, którego stosowanie może przyczynić się do poprawy aspektów ekonomicznych i śladu środowiskowego produkcji żywności.

Przeprowadzone badania umożliwiły weryfikację postawionych na wstępie pracy hipotez. Na podstawie uzyskanych wyników sformułowano następujące wnioski:

- 1) Fermentowane produkty warzywne charakteryzują się istotną zawartością amin biogennych. Ich spożycie może wiązać się z ryzykiem wystąpienia niepożądanych efektów zdrowotnych.
- 2) Modyfikacja temperatury i stężenia chlorku sodu w warunkach fermentacji spontanicznej wpływa na mikrobiotę i zawartość amin biogennych w fermentowanych ogórkach.
- 3) Modyfikacja temperatury i stężenia chlorku sodu w procesie fermentacji nie umożliwiają standaryzacji produktu pod względem składu mikroorganizmów i ograniczenia zawartości amin biogennych.
- 4) Zastosowanie szczepów *Lacticaseibacillus casei* KKP 3272 lub *Pediococcus pentosaceus* KKP 3273 nieposiadających zdolności do produkcji BAs jako kultur starterowych do fermentacji warzyw zmienia skład mikrobioty produktu oraz obniża zawartość amin biogennych w produkcie końcowym.
- 5) Kultura starterowa użyta w końcowym stężeniu nie mniej niż 10^6 jtk·mL⁻¹ umożliwia zdominowanie mikrobioty fermentowanych warzyw i ograniczenie zawartości amin biogennych.

- 6) *Lacticaseibacillus casei* KKP 3272 i *Pediococcus pentosaceus* KKP 3273 spełniają kryteria EFSA i mogą być rekomendowane jako kultury starterowe do fermentacji żywności.

7. SPIS LITERATUREY

1. Akan, S., & Ocak, Ö.Ö. 2019. Evaluation of storage time and grape seed extract addition on biogenic amines content of tarhana: A cereal-based fermented food. *LWT – Food Science and Technology*, 111, 861–68.
2. Akasaka, N., & Fujiwara, S. 2020. The therapeutic and nutraceutical potential of agmatine, and its enhanced production using *Aspergillus oryzae*. *Amino Acids*, 52(2), 181–97.
3. Alkhouli, M., Mathur, M., & Patil, P. 2014. Revisiting the “cheese reaction”: more than just a hypertensive crisis? *Journal of Clinical Psychopharmacology*, 34(5), 665–67.
4. 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 & Technology*, 39(2), 146–155.
5. Aslam, H., Green, J., Jacka, F.N., Collier, F., Berk, M., Pasco, J., & Dawson, S.L. 2020. Fermented foods, the gut and mental health: a mechanistic overview with implications for depression and anxiety. *Nutritional Neuroscience*, 23(9), 659–71.
6. Awwad, S.F., Abdalla, A., Howarth, F.C., Stojanovska, L., Kamal-Eldin, A., & Ayyash, M.M. 2022. Invited Review: Potential effects of short- and long-term intake of fermented dairy products on prevention and control of type 2 diabetes mellitus. *Journal of Dairy Science*.
7. Bahuguna, A., Shukla, S., Lee, J.S., Bajpai, V.K., Kim, S.Y., Huh, Y.S., Han, Y.K., & Kim, M. 2019. Garlic augments the functional and nutritional behavior of Doenjang, a traditional Korean fermented soybean paste. *Scientific Reports*, 9(1), 1–12.
8. Baiano, A. 2014. Recovery of biomolecules from food wastes—A review. *Molecules*, 19(9), 14821–42.
9. Baixas-Nogueras, S., Bover-Cid, S., Veciana-Nogués, M.T., Mariné-Font, A., & Vidal-Carou, M.C. 2005. Biogenic amine index for freshness evaluation in iced Mediterranean hake (*Merluccius merluccius*). *Journal of Food Protection*, 68(11), 2433–38.
10. Bargossi, E., Tabanelli, G., Montanari, C., Lanciotti, R., Gatto, V., Gardini, F., & Torriani, S. 2015. Tyrosine decarboxylase activity of enterococci grown in media with different nutritional potential: tyramine and 2-phenylethylamine accumulation and tyrDC gene expression. *Frontiers in Microbiology*, 259.
11. Benkerroum, N. 2016. Biogenic amines in dairy products: Origin, incidence, and control means. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 15(4), 801–26.
12. Chamorro, F., Carpena, M., Fraga-Corral, M., Echave, J., Rajoka, M.S.R., Barba, F.J., Cao, H., Xiao, J., Prieto, M.A., & Simal-Gandara, J. 2022. Valorization of kiwi agricultural waste and industry by-products by recovering bioactive compounds and applications as food additives: A circular economy model. *Food Chemistry*, 370, 131315.
13. Chaudhary, A., Bhalla, S., Patiyal, S., Raghava, G.P., & Sahni, G. 2021. FermFoodB: A database of bioactive peptides derived from fermented foods. *Heliyon*, 7(4), e06668.
14. Cheng, W., Sun, D.W., & Cheng, J.H. 2016. Pork biogenic amine index (BAI) determination based on chemometric analysis of hyperspectral imaging data. *LWT – Food Science and Technology*, 73, 13–19.

15. Comas-Basté, O., Sánchez-Pérez, S., Veciana-Nogués, M.T., Latorre-Moratalla, M., & Vidal-Carou M.D.C. 2020. Histamine intolerance: The current state of the art. *Biomolecules*, 10(8), 1181.
16. Dabadé, D.S., Jacxsens, L., Miclotte, L., Abatih, E., Devlieghere, F., & De Meulenaer, B. 2021. Survey of multiple biogenic amines and correlation to microbiological quality and free amino acids in foods. *Food Control*, 120, 107497.
17. Das, G., Paramithiotis, S., Sivamaruthi, B.S., Wijaya, C.H., Suharta, S., Sanlier, N., Shin, H.S., & Patra, J.K. 2020. Traditional fermented foods with anti-aging effect: A concentric review. *Food Research International*, 134, 109269.
18. Debeer, J., Bell, J.W., Nolte, F., Arcieri, J., & Correa, G. 2021. Histamine limits by country: A survey and review. *Journal of Food Protection*, 84(9), 1610–28.
19. Del Rio, B., Redruello, B., Fernandez, M., Martin, M.C., Ladero, V., & Alvarez, M.A. 2020. The biogenic amine tryptamine, unlike β -phenylethylamine, shows *in vitro* cytotoxicity at concentrations that have been found in foods. *Food Chemistry*, 331, 127303.
20. Del Rio, B., Redruello, B., Linares, D.M., Ladero, V., Fernandez, M., Martin, M.C., Ruas-Madiedo, P., & Alvarez, M.A. 2017. The dietary biogenic amines tyramine and histamine show synergistic toxicity towards intestinal cells in culture. *Food Chemistry*, 218, 249–55.
21. Del Rio, B., Redruello, B., Linares, D.M., Ladero, V., Ruas-Madiedo, P., Fernandez, M., Cruz Martin, M., & Alvarez, M.A. 2019. The biogenic amines putrescine and cadaverine show *in vitro* cytotoxicity at concentrations that can be found in foods. *Scientific Reports*, 9(1), 120.
22. Del Rio, B., Redruello, B., Linares, D.M., Ladero, V., Ruas-Madiedo, P., Fernandez, M., Cruz Martin, M., & Alvarez, M.A. 2018. Spermine and spermidine are cytotoxic towards intestinal cell cultures, but are they a health hazard at concentrations found in foods? *Food Chemistry*, 269, 321–26.
23. Devaki, C.S., & Premavalli, K.S. Fermented vegetable beverages. *Fermented Beverages*; Elsevier, 2019; Vol. 5, 321–67.
24. Durlu-Özkaya, F.Ü.G.E.N. 2002. Biogenic amine content of some Turkish cheeses. *Journal of Food Processing and Preservation*, 26(4), 259–65.
25. EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ). 2011. Scientific opinion on risk based control of biogenic amine formation in fermented foods. *EFSA Journal*, 9(10), 2393.
26. Eisenberg, T., Abdellatif, M., Schroeder, S., Primessnig, U., Stekovic, S., Pendl, T., Harger, A., Schipke, J., Zimmermann, A., Schmidt, A., et al. 2016. Cardioprotection and lifespan extension by the natural polyamine spermidine. *Nature Medicine*, 22(12), 1428–38.
27. Erol, T., & Özdestan Ocak, Ö. 2020. Influence of pomegranate seed extract on the formation of biogenic amines in a cereal based fermented food: Tarhana. *Journal of Food Science and Technology*, 57(12), 4492–500.
28. Es'haghi Gorji, M., Noori, N., Nabizadeh Nodehi, R., Jahed Khaniki, G., Rastkari, N. & Alimohammadi, M. 2014. The evaluation of *Zataria multiflora* Boiss. essential oil effect on biogenic amines formation and microbiological profile in Gouda cheese. *Letters in Applied Microbiology*, 59(6), 621–30.
29. Esparza, I., Jiménez-Moreno, N., Bimbela, F., Ancín-Azpilicueta, C., & Gandía, L. M. 2020. Fruit and vegetable waste management: Conventional and emerging approaches. *Journal of Environmental Management*, 265, 110510.
30. European Food Safety Authority (EFSA). 2017. Assessment of the incidents of histamine intoxication in some EU countries, Vol. 14, No. 9, 1301E.

31. FAO/WHO (Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization). 2013. Public Health Risks of Histamine and other Biogenic Amines from Fish and Fishery Products. Meeting report.
32. FLW Protocol. 2016. Food loss and waste accounting and reporting standard (version 1.0).
33. Fong, F.L.Y., El-Nezami, H., & Sze, E.T.P. 2021. Biogenic amines—Precursors of carcinogens in traditional Chinese fermented food. *NFS Journal*, 23, 52–57.
34. Fong, F.L.Y., Lam, K.Y., San Lau, C., Ho, K.H., Kan, Y.H., Poon, M.Y., El-Nezami, H., & Sze, E.T.P. 2020. Reduction in biogenic amines in douchi fermented by probiotic bacteria. *PLoS One*, 15(3), e0230916.
35. Food and Drug Administration. Fish and Fishery Products Hazards and Controls Guidance, Fourth Edition June 2022, Chapter 7 Scombrototoxin (Histamine) Formation.
36. Franco, W., Pérez-Díaz, I.M., Johanningsmeier, S.D., & McFeeters, R.F. 2012. Characteristics of spoilage-associated secondary cucumber fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(4), 1273–84.
37. Fraqueza, M.J., Alfaia, C.M., & Barreto, A.S. 2012. Biogenic amine formation in turkey meat under modified atmosphere packaging with extended shelf life: Index of freshness. *Poultry Science*, 91(6), 1465–72.
38. Gao, X., Li, C., He, R., Zhang, Y., Wang, B., Zhang, Z. H., & Ho, C. T. 2022. Research advances on biogenic amines in traditional fermented foods: Emphasis on formation mechanism, detection and control methods. *Food Chemistry*, 134911.
39. Gilad, G.M., & Gilad, V.H. 2014. Long-term (5 years), high daily dosage of dietary agmatine—evidence of safety: a case report. *Journal of Medicinal Food*, 17(11), 1256–59.
40. Gümrü, S., Şahin, C., & Arıcıoğlu, F. 2013. Role of agmatine in cognitive functions. *OA Behavioural Medicine*, 1(1), 2.
41. Halász, A., Baráth, Á., & Holzapfel, W.H. 1999. The influence of starter culture selection on sauerkraut fermentation. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und-Forschung A*, 208, 434–38.
42. Hamad, S.H. 2012. Factors affecting the growth of microorganisms in food. *Progress in Food Preservation*, 405–27.
43. Hassoun, A., & Çoban, Ö.E. 2017. Essential oils for antimicrobial and antioxidant applications in fish and other seafood products. *Trends in Food Science & Technology*, 68, 26–36.
44. Hernández-Jover, T., Izquierdo-Pulido, M., Veciana-Nogués, M.T., & Vidal-Carou, M.C. 1996. Biogenic amine sources in cooked cured shoulder pork. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(10), 3097–101.
45. Hernández-Macias, S., Martín-García, A., Ferrer-Bustins, N., Comas-Basté, O., Riu-Aumatell, M., López-Tamames, E., Jofré, A., Latorre-Moratalla, M.L., Bover-Cid, S., & Vidal-Carou, M.C. 2022. Inhibition of biogenic amines formation in fermented foods by the addition of cava lees. *Frontiers in Microbiology*, 12, 818565.
46. Ibrahim, S.A., Yeboah, P.J., Ayivi, R.D., Eddin, A.S., Wijemanna, N.D., Paidari, S., & Bakhshayesh, R.V. 2023. A Review and Comparative Perspective on Health Benefits of Probiotic and Fermented Foods. *International Journal of Food Science & Technology*.
47. Jaguey-Hernandez, Y., Aguilar-Arteaga, K., Ojeda-Ramirez, D., Anorve-Morga, J., González-Olivares, L.G., & Castaneda-Ovando, A. 2021. Biogenic amines levels in food processing: Efforts for their control in foodstuffs. *Food Research International*, 144, 110341.

48. Jastrzębska, A., Kmieciak, A., Brzuzy, K., Gralak, Z., Krzemiński, M.P., & Szlyk, E. 2023. Determination of selected biogenic amines in fermented vegetables juices. *Food Control*, 154, 109980.
49. Kalač, P., Špička, J., Křížek, M., & Pelikánová, T. 2000. Changes in biogenic amine concentrations during sauerkraut storage. *Food Chemistry*, 69(3), 309–14.
50. Kalač, P., Špička, J., Křížek, M., Steidlová, Š., & Pelikánová, T. 1999. Concentrations of seven biogenic amines in sauerkraut. *Food Chemistry*, 67(3), 275–80.
51. Kanki, M., Yoda, T., Tsukamoto, T., & Baba, E. 2007. Histidine decarboxylases and their role in accumulation of histamine in tuna and dried saury. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(5), 1467–73.
52. Khémesse, K., Moumouny, T., François, D. & Alphonse, T. 2023. Biogenic amines: physiology, toxicity, and the importance of agmatine. *Global Journal of Chemistry, Biology and Physics (GJCBP)*, 1(1), 10–28.
53. Kim, H.Y., & Park, K.Y. 2018. Clinical trials of kimchi intakes on the regulation of metabolic parameters and colon health in healthy Korean young adults. *Journal of Functional Foods*, 47, 325–33.
54. Kim, J.H., Ahn, H.J., Lee, J.W., Park, H.J., Ryu, G.H., Kang, I.J., & Byun, M.W. 2005. Effects of gamma irradiation on the biogenic amines in pepperoni with different packaging conditions. *Food Chemistry*, 89(2), 199–205.
55. Kim, S.Y., Dang, Y.M., & Ha, J.H. 2022. Effect of various seasoning ingredients on the accumulation of biogenic amines in kimchi during fermentation. *Food Chemistry*, 380, 132214.
56. Klassen, A., Faccio, A.T., Canuto, G.A.B., da Cruz, P.L.R., Ribeiro, H.C., Tavares, M.F.M., & Sussulini, A. 2017. Metabolomics: definitions and significance in systems biology. *Metabolomics: from fundamentals to clinical applications*, 3–17.
57. Kocot, A.M., & Wróblewska, B. 2021. Fermented products and bioactive food compounds as a tool to activate autophagy and promote the maintenance of the intestinal barrier function. *Trends in Food Science & Technology*, 118, 905–19.
58. Kuley, E., Durmus, M., Ucar, Y., Kosker, A.R., Tumerkan, E.T.A., Regenstein, J.M., & Ozogul, F. 2018. Combined effects of plant and cell-free extracts of lactic acid bacteria on biogenic amines and bacterial load of fermented sardine stored at 3 ± 1 °C. *Food Bioscience*, 24, 127–36.
59. Ladero, V., Calles-Enríquez, M., Fernández, M., & A Alvarez, M. 2010. Toxicological effects of dietary biogenic amines. *Current Nutrition & Food Science*, 6(2), 145–56.
60. Latorre-Moratalla, M.L., Bover-Cid, S., Talon, R., Aymerich, T., Garriga, M., Zanardi, E., Ianieri, A., Fraqueza, M.J., Elias, M., Drosinos, E.H., Lauková, A., & Vidal-Carou, M.C. 2010. Distribution of aminogenic activity among potential autochthonous starter cultures for dry fermented sausages. *Journal of Food Protection*, 73(3), 524–28.
61. Lavefve, L., Marasini, D., & Carbonero, F. 2019. Microbial ecology of fermented vegetables and non-alcoholic drinks and current knowledge on their impact on human health. *Advances in Food and Nutrition Research*, 87, 147–85.
62. Lee, J.Y., Kim, Y., Her, J.Y., Kim, M.K., & Lee, K.G. 2018. Reduction of biogenic amine contents in fermented soybean paste using food additives. *LWT – Food Science and Technology*, 98, 470–76.
63. Li, B., & Lu, S. 2020. The importance of amine-degrading enzymes on the biogenic amine degradation in fermented foods: A review. *Process Biochemistry*, 99, 331–39.

64. Li, L., Wen, X., Wen, Z., Chen, S., Wang, L., & Wei, X. 2018. Evaluation of the biogenic amines formation and degradation abilities of *Lactobacillus curvatus* from Chinese bacon. *Frontiers in Microbiology*, 9, 1015.
65. Li, S., Du, X., Feng, L., Mu, G., & Tuo, Y. 2021. The microbial community, biogenic amines content of soybean paste, and the degradation of biogenic amines by *Lactobacillus plantarum* HM24. *Food Science & Nutrition*, 9(12), 6458–70.
66. Li, Y., Y. Geng, D. Shi, R. Li, J. Tang, and S. Lu. 2023. Impact of *Coreopsis tinctoria* Nutt. Essential oil microcapsules on the formation of biogenic amines and quality of smoked horsemeat sausage during ripening. *Meat Science* 195:109020.
67. Linares, D. M., Del Río, B., Ladero, V., Martínez, N., Fernández, M., Martín, M. C., & Álvarez, M. A. (2012). Factors influencing biogenic amines accumulation in dairy products. *Frontiers in Microbiology*, 3, 180.
68. Linares, D.M., del Rio, B., Redruello, B., Ladero, V., Martin, M.C., Fernandez, M., Ruas-Madiedo, P., & Alvarez, M.A. 2016. Comparative analysis of the *in vitro* cytotoxicity of the dietary biogenic amines tyramine and histamine. *Food Chemistry*, 197, 658–63.
69. Linares, D.M., Martín, M., Ladero, V., Alvarez, M.A., & Fernández, M. 2011. Biogenic amines in dairy products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 51(7), 691–703.
70. Loizzo, M.R., Menichini, F., Picci, N., Puoci, F., Spizzirri, U.G., & Restuccia, D. 2013. Technological aspects and analytical determination of biogenic amines in cheese. *Trends in Food Science & Technology*, 30(1), 38–55.
71. Lu, S., Ji, H., Wang, Q., Li, B., Li, K., Xu, C., & Jiang, C. 2015. The effects of starter cultures and plant extracts on the biogenic amine accumulation in traditional Chinese smoked horsemeat sausages. *Food Control*, 50, 869–75.
72. Lyte, M. 2004. The biogenic amine tyramine modulates the adherence of *Escherichia coli* O157: H7 to intestinal mucosa. *Journal of Food Protection*, 67(5), 878–83.
73. Mah, J.H., Kim, Y.J., & Hwang, H.J. 2009. Inhibitory effects of garlic and other spices on biogenic amine production in Myeolchi-jeot, Korean salted and fermented anchovy product. *Food Control*, 20(5), 449–54.
74. Majcherczyk, J., & Surówka, K. 2019. Effects of onion or caraway on the formation of biogenic amines during sauerkraut fermentation and refrigerated storage. *Food Chemistry*, 298, 125083.
75. Mannaa, M., Seo, Y.S., & Park, I. 2020. Addition of coriander during fermentation of korean soy sauce (gangjang) causes significant shift in microbial composition and reduction in biogenic amine levels. *Foods*, 9(10), 1346.
76. Marco, M.L., Sanders, M.E., Gänzle, M., Arrieta, M.C., Cotter, P.D., De Vuyst, L., Hill, C., Holzapfel, W., Lebeer, S., Merenstein, D., et al. 2021. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on fermented foods. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 18(3), 196–208.
77. Martin, I.S.M., Brachero, S., & Vilar, E.G. 2016. Histamine intolerance and dietary management: A complete review. *Allergologia et immunopathologia*, 44(5), 475–83.
78. Mayr, C.M., & Schieberle, P. 2012. Development of stable isotope dilution assays for the simultaneous quantitation of biogenic amines and polyamines in foods by LC-MS/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(12), 3026–32.
79. McMurtrie, E.K., Johanningsmeier, S.D., Breidt Jr, F., & Price, R.E. 2019. Effect of brine acidification on fermentation microbiota, chemistry, and texture quality of cucumbers fermented in calcium or sodium chloride brines. *Journal of Food Science*, 84(5), 1129–37.

80. Medina, E., Pérez-Díaz, I.M., Breidt, F., Hayes, J., Franco, W., Butz, N., & Azcarate-Peril, M.A. 2016. Bacterial ecology of fermented cucumber rising pH spoilage as determined by nonculture-based methods. *Journal of Food Science*, 81(1), M121–M129.
81. Mietz, J.L., & Karmas, E. 1977. Chemical quality index of canned tuna as determined by high-pressure liquid chromatography. *Journal of Food Science*, 42(1), 155–58.
82. Moniente, M., Botello-Morte, L., García-Gonzalo, D., Pagán, R., & Ontañón, I. 2022. Analytical strategies for the determination of biogenic amines in dairy products. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 21(4), 3612–46.
83. Moore, J.F., DuVivier, R., & Johanningsmeier, S.D. 2021. Formation of γ -aminobutyric acid (GABA) during the natural lactic acid fermentation of cucumber. *Journal of Food Composition and Analysis*, 96, 103711.
84. Moore, J.F., DuVivier, R., & Johanningsmeier, S.D. 2022. Changes in the free amino acid profile of pickling cucumber during lactic acid fermentation. *Journal of Food Science*, 87(2), 599–611.
85. Moret, S., Smela, D., Populin, T., & Conte, L.S. 2005. A survey on free biogenic amine content of fresh and preserved vegetables. *Food Chemistry*, 89(3), 355–61.
86. Mozurienne, E., Bartkiene, E., Juodeikiene, G., Zadeike, D., Basinskiene, L., Maruska, A., Stankevicius, M., Ragazinskiene, O., Damasius, J., & Cizeikiene, D. 2016. The effect of savoury plants, fermented with lactic acid bacteria, on the microbiological contamination, quality, and acceptability of unripened curd cheese. *LWT – Food Science and Technology*, 69, 161–68.
87. Naila, A., Flint, S., Fletcher, G., Bremer, P., & Meerdink, G. 2010. Control of biogenic amines in food—existing and emerging approaches. *Journal of Food Science*, 75(7), R139–R150.
88. Ngo, A.S.Y., Ho, R.Y., & Olson, K.R. 2010. Phenelzine-induced myocardial injury: a case report. *Journal of Medical Toxicology*, 6, 431–34.
89. Nielsen, E.S., Garnås, E., Jensen, K.J., Hansen, L.H., Olsen, P.S., Ritz, C., Krych, L., & Nielsen, D.S. 2018. Lacto-fermented sauerkraut improves symptoms in IBS patients independent of product pasteurisation—a pilot study. *Food & Function*, 9(10), 5323–35.
90. Oh, S.J., Mah, J.H., Kim, J.H., Kim, Y.W., & Hwang, H.J. 2012. Reduction of tyramine by addition of *Schizandra chinensis* Baillon in Cheonggukjang. *Journal of Medicinal Food*, 15(12), 1109–15.
91. Papavergou, E.J. 2011. Biogenic amine levels in dry fermented sausages produced and sold in Greece. *Procedia Food Science*, 1, 1126–31.
92. Papavergou, E.J., Savvaidis, I.N., & Ambrosiadis, I.A. 2012. Levels of biogenic amines in retail market fermented meat products. *Food Chemistry*, 135(4), 2750–55.
93. Park, S., Arasu, M.V., Lee, M.K., Chun, J.H., Seo, J.M., Lee, S.W., Al-Dhabi, N.A., & Kim, S.J. 2014. Quantification of glucosinolates, anthocyanins, free amino acids, and vitamin C in inbred lines of cabbage (*Brassica oleracea* L.). *Food Chemistry*, 145, 77–85.
94. Park, Y.K., Lee, J.H., & Mah, J.H. 2019. Occurrence and reduction of biogenic amines in kimchi and Korean fermented seafood products. *Foods*, 8(11), 547.
95. Peñas, E., Frias, J., Sidro, B., & Vidal-Valverde, C. 2010. Impact of fermentation conditions and refrigerated storage on microbial quality and biogenic amine content of sauerkraut. *Food Chemistry*, 123(1), 143–50.
96. Pérez-Díaz, I.M., Hayes, J.S., Medina, E., Webber, A.M., Butz, N., Dickey, A.N., Lu, Z., & Azcarate-Peril, M.A. 2019. Assessment of the non-lactic acid bacteria

- microbiota in fresh cucumbers and commercially fermented cucumber pickles brined with 6% NaCl. *Food Microbiology*, 77, 10–20.
97. Pérez-Díaz, I., Breidt, F., Buescher, R., Arroyo-López, F., Jiménez-Díaz, R., Garrido, A., et al. (2014). Fermented and acidified vegetables. *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods (5th ed.)*, American Public Health Association.
 98. Rabie, M.A., Siliha, H., el-Saidy, S., el-Badawy, A.A., & Xavier Malcata, F. 2011. Reduced biogenic amine contents in *sauerkraut* via addition of selected lactic acid bacteria. *Food Chemistry* 129, 1778–82.
 99. Raoofi, M., Noori, N., & Khanjari, A. 2023. Effect of *Bunium persicum* Boiss. essential oil on the production of biogenic amines (tyramine and histamine) and microbiological profile in Cheddar cheese. *Journal of Nutrition, Fasting & Health*, 11(1), 32–40.
 100. Rodríguez-Caso, C., Rodríguez-Agudo, D., Sánchez-Jiménez, F., & Medina, M.A. 2003. Green tea epigallocatechin-3-gallate is an inhibitor of mammalian histidine decarboxylase. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 60, 1760–63.
 101. Roselino, M.N., Maciel, L.F., Sirocchi, V., Caviglia, M., Sagratini, G., Vittori, S., Taranto, M.P. & Cavallini, D.C.U. 2020. Analysis of biogenic amines in probiotic and commercial salamis. *Journal of Food Composition and Analysis*, 94, 103649.
 102. Ross, R.P., Morgan, S., & Hill, C. 2002. Preservation and fermentation: past, present and future. *International journal of food microbiology*, 79(1-2), 3–16.
 103. Rozporządzenie Komisji (WE) nr 2073/2005 z dnia 15 listopada 2005 r. w sprawie kryteriów mikrobiologicznych dotyczących środków spożywczych, Dz.U. L 338, 2005, p. 1–26, z późn. zm.
 104. Ruiz-Capillas, C., & Herrero, A.M. 2019. Impact of biogenic amines on food quality and safety. *Foods*, 8(2), 62.
 105. SaeidiFard, N., Djafarian, K., & Shab-Bidar, S. 2020. Fermented foods and inflammation: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Clinical nutrition ESPEN*, 35, 30–39.
 106. Salter, M., & Kenney, A. 2018. Myocardial injury from tranlycypromine-induced hypertensive crisis secondary to excessive tyramine intake. *Cardiovascular Toxicology*, 18, 583–86.
 107. Şanlıer, N., Gökçen, B.B., & Sezgin, A.C. 2019. Health benefits of fermented foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 59(3), 506–27.
 108. Selhub, E.M., Logan, A.C., & Bested, A.C. 2014. Fermented foods, microbiota, and mental health: ancient practice meets nutritional psychiatry. *Journal of Physiological Anthropology*, 33, 1-12.
 109. Shi, C., Liu, M., Zhao, H., Liang, L., & Zhang, B. 2023. Formation and control of biogenic amines in sufu-a traditional Chinese fermented soybean product: A critical review. *Food Reviews International*, 39(3), 1694–715.
 110. Shukla, S., Lee, J.S., Bajpai, V.K., Khan, I., Huh, Y.S., Han, Y.K., & Kim, M. 2019. Toxicological evaluation of lotus, ginkgo, and garlic tailored fermented Korean soybean paste (Doenjang) for biogenic amines, aflatoxins, and microbial hazards. *Food and Chemical Toxicology*, 133, 110729.
 111. Shukla, S., Lee, J.S., Bajpai, V.K., Nile, S.H., Huh, Y.S., Han, Y.K., & Kim, M. 2018. Detection of biogenic amines and microbial safety assessment of novel *Meju* fermented with addition of *Nelumbo nucifera*, *Ginkgo biloba*, and *Allium sativum*. *Food and Chemical Toxicology*, 119, 231–36.

112. Shukla, S., Park, H. K., Kim, J. K., & Kim, M. (2010). Determination of biogenic amines in Korean traditional fermented soybean paste (Doenjang). *Food and Chemical Toxicology*, 48(5), 1191–1195.
113. Silva C.M.G., Glória M.B.A. 2002. Bioactive amines in chicken breast and thigh after slaughter and during storage at 4 ± 1 °C and in chicken-based meat products. *Food Chemistry* 78 (2), 241–48.
114. Simon-Sarkadi, L., Pásztor-Huszár, K., Dalmadi, I., & Kiskó, G. 2012. Effect of high hydrostatic pressure processing on biogenic amine content of sausage during storage. *Food Research International*, 47(2), 380–84.
115. Spano, G., Russo, P., Lonvaud-Funel, A., Lucas, P., Alexandre, H., Grandvalet, C., Coton, E., Coton, M., Barnavon, L., Bach, B., et al. 2010. Biogenic amines in fermented foods. *European Journal of Clinical Nutrition*, 64(3), S95–S100.
116. Staudacher, H.M., & Nevin, A.N. 2019. Fermented foods: fad or favourable addition to the diet? *The Lancet Gastroenterology & Hepatology*, 4(1), 19.
117. Stoll, D.A., Müller, A., Meinhardt, A.K., Dötsch, A., Greiner, R., Kulling, S.E., & Huch, M. 2020. Influence of salt concentration and iodized table salt on the microbiota of fermented cucumbers. *Food Microbiology*, 92, 103552.
118. Sun, Q., Sun, F., Zheng, D., Kong, B., & Liu, Q. 2019. Complex starter culture combined with vacuum packaging reduces biogenic amine formation and delays the quality deterioration of dry sausage during storage. *Food Control*, 100, 58–66.
119. Špička, J., Kalač, P., Bover-Cid, S., & Křížek, M. 2002. Application of lactic acid bacteria starter cultures for decreasing the biogenic amine levels in sauerkraut. *European Food Research and Technology*, 215, 509–14.
120. Świder O., Wójcicki M., Roszko M.Ł. 2021. Aminy biogenne – oszacowanie ryzyka spożycia i możliwości ograniczenia ich formowania w żywności fermentowanej. *Żywność. NAUKA. Technologia. Jakość*, 28, 2(127), 21–35.
121. Tangwacharin, P., Nithisantawakhup, J., & Sorapukdee, S. 2019. Selection of indigenous starter culture for safety and its effect on reduction of biogenic amine content in Moo som. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 32(10), 1580.
122. Tasdemir, S.S., & Sanlier, N. 2020. An insight into the anticancer effects of fermented foods: A review. *Journal of Functional Foods*, 75, 104281.
123. Teo, W.Z., See, J.Y., Ramazanu, S., Chan, J.C.Y., & Wu, X.V. 2022. Effect of lactic acid fermented foods on glycemic control in diabetic adults: a systemic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1–16.
124. 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.
125. Ueda, J.M., Pedrosa, M.C., Heleno, S.A., Carocho, M., Ferreira, I.C., & Barros, L. 2022. Food additives from fruit and vegetable by-products and bio-residues: a comprehensive review focused on sustainability. *Sustainability*, 14(9), 5212.
126. Veciana-Nogués, M.T., Mariné-Font, A., & Vidal-Carou, M.C. 1997. Biogenic amines as hygienic quality indicators of tuna. Relationships with microbial counts, ATP-related compounds, volatile amines, and organoleptic changes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(6), 2036–41.
127. Velut, G., Delon, F., Mérigaud, J.P., Tong, C., Duflos, G., Boissan, F., ... & Pommier de Santi, V. 2019. Histamine food poisoning: a sudden, large outbreak linked to fresh yellowfin tuna from Reunion Island, France, April 2017. *Eurosurveillance*, 24(22), 1800405.

128. Vianello, R., Repič, M., & Mavri, J. 2012. How are biogenic amines metabolized by monoamine oxidases? *European Journal of Organic Chemistry*, 36, 7057–65.
129. Wastyk, H.C., Fragiadakis, G.K., Perelman, D., Dahan, D., Merrill, B.D., Yu, F.B., Topf, M., Gonzalez, C.G., Van Treuren, W., Han, S., et al. 2021. Gut-microbiota-targeted diets modulate human immune status. *Cell*, 184(16), 4137–53.
130. Wendakoon, C.N., & Sakaguchi, M. 1995. Inhibition of amino acid decarboxylase activity of *Enterobacter aerogenes* by active components in spices. *Journal of Food Protection*, 58(3), 280–83.
131. Wishart, D.S. 2008. Metabolomics: applications to food science and nutrition research. *Trends in Food Science & Technology*, 19(9), 482–93.
132. World Resources Institute. 2019. World resources report. Creating a sustainable food future. A menu of solutions to feed nearly 10 billion people by 2050.
133. Wortberg B., Woller R. 1982. Zur Qualität und Frische von Fleisch und Fleischwaren im Hinblick auf ihren Gehalt an biogenen Aminen. *Fleischwirtschaft*, 62(11), 1457–63.
134. Wöhrle, S., Hemmer, W., Focke, M., Rappersberger, K., & Jarisch, R. 2004. Histamine intolerance-like symptoms in healthy volunteers after oral provocation with liquid histamine. In *Allergy & Asthma Proceedings*, Vol. 25, No. 5.
135. Wu, W., Zhang, L., Zheng, X., Huang, Q., Farag, M.A., Zhu, R., & Zhao, C. 2022. Emerging applications of metabolomics in food science and future trends. *Food Chemistry: X*, 100500.
136. Xu, W., Jiang, C., Liu, A., Bao, R., Wang, W., Zhang, Z., Ji, C., Liang, H., Zhang, S., & Lin, X. 2022. Moderate papain addition improves the physicochemical, microbiological, flavor and sensorial properties of Chouguiyu, traditional Chinese fermented fish. *Food Bioscience*, 46, 101587.
137. Yamanaka H., Shiomi K., & Kikuchi T. 1987. Agmatine as a potential index for freshness of common squid (*Todarodes pacificus*). *Journal of Food Science*, 52(4), 936–38.
138. Yamanaka, H., Shiomi, K., & Kikuchi, T. 1989. Cadaverine as a potential index for decomposition of salmonoid fishes. *Food Hygiene and Safety Science*, 30(2), 170–74.
139. Yu, H., Huang, Y., Lu, L., Liu, Y., Tang, Z., & Lu, S. 2021. Impact of thyme microcapsules on histamine production by *Proteus bacillus* in Xinjiang smoked horsemeat sausage. *Foods*, 10(10), 2491.
140. Zhang, Q.Q., Rui, X., Shi, Y.X., Wang, X.Y., & Dong, M.S. 2018. Effects of phenolic acids on the biogenic amine formation of *Enterobacter aerogenes*. *Journal of Food Processing and Preservation*, 42(3), e13554.
141. Zhou, K., Zhang, X., Huang, G.D., Hongsibsong, S., Hao, G., Li, Y.M., Yang, J.Y., & Xu, Z.L. 2023. Formation of biogenic amines in soy sauce and reduction via simple phytochemical addition. *LWT – Food Science and Technology*, 176, 114542.
142. Zhou, X., Qiu, M., Zhao, D., Lu, F., & Ding, Y. 2016. Inhibitory Effects of Spices on Biogenic Amine Accumulation during Fish Sauce Fermentation. *Journal of Food Science*, 81(4), M913–M920.

Źródła internetowe:

1. Internet 1: Powierzchnia uprawy ogórków w Polsce. Ile wynosi w 2023 roku? Warzywa.pl. <https://www.warzywa.pl/warzywa-polowe/powierzchnia-uprawy-ogorkow-w-polsce-ile-wynosi-w-2023-roku/> Dostęp w dn. 11.10.2023 r.
2. Internet 2: Ogórek gruntowy. Spójnia – nasiona warzyw. <https://nasiona-warzyw.pl/zalecenia-uprawowe/ogorek-gruntowy/> Dostęp w dn. 11.10.2023 r.

3. FDA Issues Draft Compliance Policy Guide for Decomposition and Histamine in Scombrototoxin (Histamine)-forming Fish and Fishery Products, March 14, 2022. <https://www.fda.gov/food/cfsan-constituent-updates/fda-issues-draft-compliance-policy-guide-decomposition-and-histamine-scombrototoxin-histamine-forming> Dostęp w dn. 27.08.2023 r.
4. HealthFerm. Plant-based Fermented Foods for Healthier and More Sustainable Diets. <https://healthferm.eu/> Dostęp w dn. 20.09.2023 r.