



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

Disertační práce

**Možnosti redukce biogenních aminů produkovaných  
mikroorganismy**

**Strategies to reduce biogenic amines produced by microorganisms**

Autor: **Ing. Khatantuul Purevdorj**

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

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

Zlín, 2021

© Khatantuul Purevdorj

Klíčová slova: *biogenní aminy, tyramin, bakterie mléčného kvašení, supernatant, bakteriociny, nisin*

Key words: *biogenic amines, tyramine, lactic acid bacteria, supernatant, bacteriocins, nisin*

Disertační práce je dostupná v Knihovně UTB ve Zlíně.

„Wisdom is not a product of schooling but of the lifelong attempt to acquire it.“

[Albert Einstein]

### **Poděkování:**

Na tomto místě bych ráda poděkovala své školitelce, prof. RNDr. Leoně Buňkové Ph.D., za odborné vedení, cenné rady, připomínky, ochotu a čas, který mi věnovala během celého doktorského studia. Rovněž velice děkuji prof. Ing. Františku Buňkovi, Ph.D. za podnětné rady, vstřícnost a pomoc při sepisování této práce. Dále děkuji Ing. Veronice Kučabové, Lence Machálkové, Ing. Olze Vlčkové, Ing. Zuzce Svobodové, Ing. et Ing. Ludmile Zálešákové a Ing. Tomáši Šopíkovi za pomoc v chemické a mikrobiologické laboratoři. Poděkování patří také mým kolegům z Ústavu inženýrství ochrany životního prostředí FT UTB ve Zlíně za vytvoření pozitivního pracovního prostředí a motivaci. Nakonec bych ráda poděkovala svým rodičům za jejich neustálou podporu po celou dobu studia a motivaci k sepsání této práce.

Tato práce vznikla za podpory interních grantů Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně (IGA/FT/2014/005, IGA/FT/2015/012, IGA/FT/2016/012, IGA/FT/2017/003, GAČR No. 17-09594S, NAZV QK1710156).

## ABSTRAKT

Disertační práce se zabývá sledováním vlivu vybraných protektivních kultur, jejich bezbuněčných supernatantů (CFS) a nisinu na kinetiku produkce tyraminu (TYM). Pro naplnění cíle práce byl nejprve zkoumán inhibiční účinek supernatantů z 22 protektivních kultur a nisinu vůči producentům biogenních aminů (BA) izolovaných z různých potravin. Antimikrobiální aktivita zneutralizovaných supernatantů a nisinu byla zjišťována pomocí jamkové difúzní metody. Na základě získaných výsledků byly vybrány 2 protektivní kultury *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* biovar. *diacetylactis* CCDM 686 a CCDM 689 vykazující největší antimikrobiální aktivitu vůči zkoumaným producentům tyraminu. Vliv vybraných 2 protektivních kmenů, jejich CFS a nisinu na produkci tyraminu byl následně sledován u 2 kmenů, které prokázaly signifikantní citlivost vůči testovaným supernatantům z laktokoků a na nisin. Konkrétně se jednalo o kmen *Lactilactobacillus curvatus* T3 a *Lactiplantibacillus plantarum* RIBM 89. Byly zvoleny dvě teploty kultivace:  $30 \pm 1$  °C a  $12 \pm 1$  °C. Rovněž byl zkoumán vliv přídavku protektivních kultur, jejich supernatantů a nisinu k producentům tyraminu v různých časových intervalech kultivace. Kinetika produkce tyraminu byla sledována v *in vitro* podmínkách v kultivačním médiu a výsledná množství tyraminu byla analyzována pomocí HPLC/UV po předchozí derivatizaci dansylchloridem.

Oba testované kmeny (*Lat. curvatus* T3 a *Lac. plantarum* RIBM 89) vykazovaly signifikantně vyšší produkci tyraminu při teplotě 30 °C než při teplotě 12 °C ( $P < 0,05$ ). Při obou teplotách kultivace byl pak zaznamenán nezanedbatelný vliv na snížení produkce tyraminu po přídavcích protektivních kultur a jejich CFS. Největší snížení obsahu tyraminu (o 84 % oproti kontrole) bylo zjištěno po kultivaci kmene *Lac. plantarum* RIBM 89 s protektivní kulturou *Lc. lactis* ssp. *lactis* CCDM 689 při teplotě 12 °C (čas inokulace obou kmenů 0 h). Z výsledků sledování vlivu komerčního nisinu na produkci TYM kmeny RIBM 89 a T3 plyne, že přídavek nisinu ve všech 3 koncentracích snížil obsah TYM v těchto vzorcích. Ve většině případů byl zaznamenán trend, čím vyšší aplikovaná koncentrace nisinu, tím vyšší snížení množství TYM vyprodukovaných BA-produkčními kmeny. Inokulace protektivních kultur a jejich metabolitů (CFS a nisin) v pozdější fázi růstu BA-produkčních kmenů neměla inhibiční vliv na dekarboxylázovou aktivitu těchto kmenů. Závěrem lze říci, že k zábránění vzniku a kumulace TYM ve fermentovaných potravinách lze využít nisin-produkující kmeny a jejich metabolity (CFS a nisin), a tím zvýšit kvalitu a bezpečnost fermentovaných potravin. Nicméně je třeba provést další výzkum za účelem vyšetření těchto protektivních kmenů a jejich antagonistických látek v reálné potravinové matici.

## ABSTRACT

In the present dissertation thesis, we investigated the influence of the selected protective cultures, their cell-free supernatants (CFS) and nisin on tyramine (TYM) production. Firstly, we examined the inhibitory effect of CFS from 22 protective cultures and nisin against biogenic amines producers isolated from various foods. The antimicrobial activity of the neutralized supernatants and nisin was determined by the agar-well diffusion method. Based on the obtained results, 2 protective cultures (*Lactococcus lactis* ssp. *lactis* biovar *diacetylactis* CCDM 686 and CCDM 689) whose CFS showed the highest antimicrobial activity on tyramine producers were further studied. The influence of these 2 protective strains, their respective CFS and nisin on tyramine production by 2 strains, namely *Latilactobacillus curvatus* T3 and *Lactiplantibacillus plantarum* RIBM 89, was determined. These 2 strains were highly sensitive to the tested supernatants from lactococci and to the nisin. In addition, the effect of two cultivation temperatures ( $30 \pm 1$  °C and  $12 \pm 1$  °C) and the impact of a different addition time of the protective cultures, their respective supernatants and nisin to the tyramine producers were examined. The kinetics of tyramine production were observed *in vitro* in the growth medium and the final amounts of tyramine were analyzed by HPLC/UV after previous derivatization with dansyl-chloride.

The both tested strains (*Lat. curvatus* T3 and *Lac. plantarum* RIBM 89) showed a significantly higher tyramine production at 30 °C than at 12 °C ( $P < 0.05$ ). The addition of tested protective cultures and their respective CFS to the tyramine producers led to a decrease of tyramine content in both cultivation temperatures. The highest reduction of tyramine content (by 84% compared to the control) was observed after the cultivation of *Lac. plantarum* RIBM 89 with protective culture *Lc. lactis* ssp. *lactis* CCDM 689 at 12 °C (inoculation time of the both strains were 0 h). Based on the results obtained from the monitoring an impact of nisin on TYM production by strains RIBM 89 and T3, it can be concluded that the addition of nisin at all 3 concentrations reduced the TYM content in all cases. In all BA-producing strains tested, a higher decrease of tyramine content was determined in the environment with a higher applied concentration of nisin. Inoculation of protective cultures and their metabolites (CFS and nisin) in the later growth phase of BA-producing strains had no inhibitory effect on decarboxylase activity of these strains. Consequently, in order to prevent formation and accumulation of tyramine in high concentration in fermented food products, it is advisable to use nisin-producing strain or its metabolites (CFS and nisin) to enhance safety and quality of these fermented food products. However, further research should be done in order to examine these *Lactococcus* strains and their CFSs in real food system.

# OBSAH

<b>ABSTRAKT</b> .....	<b>3</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>5</b>
<b>OBSAH</b> .....	<b>6</b>
<b>1. SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY</b> .....	<b>9</b>
1.1    BIOGENNÍ AMINY A JEJICH VZNIK V POTRAVINÁCH .....	10
1.2    VÝSKYT BA VE VYBRANÝCH FERMENTOVANÝCH POTRAVINÁCH A NÁPOJÍCH A FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ JEJICH TVORBU.....	10
1.2.1 <i>Fermentové masné výrobky</i> .....	10
1.2.2 <i>Fermentované mléčné výrobky</i> .....	13
1.2.3 <i>Výskyt BA ve fermentovaných alkoholických nápojích</i> .....	15
1.3    FYZIOLOGICKÉ ÚČINKY A TOXICITA BA .....	16
1.3.1 <i>Fyziologické účinky a toxicita histaminu</i> .....	17
1.3.2 <i>Fyziologické účinky a toxicita tyraminu a dalších stopových aminů</i> . 18	
1.3.3 <i>Fyziologické účinky a toxicita diaminů a polyaminů</i> .....	19
1.4    DETOXIKACE BA.....	20
1.5    MOŽNOSTI SNÍŽENÍ BIOGENNÍCH AMINŮ .....	22
1.5.1 <i>Snižování BA za použití ionizujícího záření</i> .....	22
1.5.2 <i>Mikroorganismy schopné degradace BA</i> .....	23
1.5.3 <i>Využití protektivní kultur a jejich antimikrobiálních látek ke snížení         tvorby BA</i> .....	26
1.5.4 <i>Využití rostlinných antimikrobiálních látek ke snížení BA</i> .....	33
1.6    METODY STANOVENÍ BA.....	35
<b>2. CÍLE PRÁCE</b> .....	<b>38</b>
<b>3. MATERIÁL A METODIKA</b> .....	<b>39</b>
3.1    MATERIÁL .....	39
3.1.1 <i>Použité mikroorganismy</i> .....	39
3.1.2 <i>Použité kultivační média a roztoky</i> .....	42
3.1.3 <i>Laboratorní zařízení a pomůcky</i> .....	44
3.2    METODIKA EXPERIMENTŮ I A II .....	45
3.2.1 <i>Příprava supernatantů protektivních kultur (CFS)</i> .....	45
3.2.2 <i>Příprava zásobního roztoku nisinu</i> .....	45

3.2.3	<i>Jamková difúzní metoda</i> .....	45
3.3	METODIKA EXPERIMENTU III.....	46
3.4	METODIKA EXPERIMENTU IV .....	47
3.5	STANOVENÍ MNOŽSTVÍ TYRAMINU V EXPERIMENTECH III – IV POMOCÍ HPLC/UV.....	48
3.5.1	<i>Příprava vzorků a předkolonová derivatizace</i> .....	48
3.5.2	<i>Vlastní chromatografické stanovení</i> .....	48
3.6	STANOVENÍ POČTU MIKROORGANISMŮ V EXPERIMENTECH III – IV .....	49
3.7	STATISTICKÉ HODNOCENÍ ZÍSKANÝCH DAT .....	49
<b>4.</b>	<b>VÝSLEDKY</b> .....	<b>50</b>
4.1	VÝSLEDKY EXPERIMENTU I .....	50
4.1.1	<i>Inhibiční působení supernatantů protektivních kultur na testované BMK s dekarboxylázovou aktivitou</i> .....	50
4.1.2	<i>Antimikrobiální aktivita supernatantů protektivních kultur na testované dekarboxyláza-pozitivní kmeny z rodu Enterococcus a Staphylococcus</i> .....	54
4.2	VÝSLEDKY EXPERIMENTU II.....	56
4.3	VÝSLEDKY EXPERIMENTU III.....	60
4.3.1	<i>Vliv protektivních kultur a jejich CFS na produkci tyraminu u kmene Lactiplantibacillus plantarum RIBM 89 při teplotě 30 °C</i> .....	60
4.3.2	<i>Vliv protektivních kultur a jejich CFS na produkci tyraminu u kmene Lactiplantibacillus plantarum RIBM 89 při teplotě 12 °C</i> .....	65
4.3.3	<i>Vliv protektivních kultur a jejich CFS na produkci tyraminu u kmene Latilactobacillus curvatus T3 při teplotě 30 °C</i> .....	70
4.3.4	<i>Vliv protektivních kultur a jejich CFS na produkci tyraminu u kmene Latilactobacillus curvatus T3 při teplotě 12 °C</i> .....	73
4.4	VÝSLEDKY EXPERIMENTU IV .....	77
4.4.1	<i>Vliv nisinu na produkci tyraminu u kmene Lactiplantibacillus plantarum RIBM 89 při teplotě 30 °C</i> .....	77
4.4.2	<i>Vliv nisinu na produkci tyraminu u kmene Lactiplantibacillus plantarum RIBM 89 při teplotě 12 °C</i> .....	80
4.4.3	<i>Vliv nisinu na produkci tyraminu u kmene Latilactobacillus curvatus T3 při teplotě 30 °C</i> .....	84
4.4.4	<i>Vliv nisinu na produkci tyraminu u kmene Latilactobacillus curvatus T3 při teplotě 12 °C</i> .....	87
<b>5.</b>	<b>SOUHRNNÁ DISKUZE</b> .....	<b>90</b>

<b>6. ZÁVĚR.....</b>	<b>95</b>
<b>7. PŘÍNOS PRO VĚDU A PRAXI .....</b>	<b>97</b>
<b>8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....</b>	<b>98</b>
<b>9. SEZNAM OBRÁZKŮ A TABULEK.....</b>	<b>119</b>
<b>10. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK .....</b>	<b>123</b>
<b>11. CURRICULUM VITAE.....</b>	<b>125</b>
<b>12. PUBLIKAČNÍ ČINNOST .....</b>	<b>127</b>
<b>13. PŘÍLOHA I.....</b>	<b>129</b>
<b>14. PŘÍLOHA II .....</b>	<b>143</b>



# 1. SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

Výzkum biogenních aminů (BA) započal před více jak 120 lety identifikací sperminu, putrescinu a kadaverinu (Sarkadi, 2008). Dnes již víme, že jsou to látky přirozeně se vyskytující v živých systémech, kde se zúčastňují mnoha důležitých fyziologických procesů. Na druhou stranu jejich nadměrný příjem v důsledku konzumace potravin s vysokým obsahem těchto látek může představovat potenciální riziko pro lidské zdraví (Ladero et al., 2010; del Rio et al., 2017; del Rio et al., 2019). V nízkých koncentracích se BA mohou nacházet v nejrůznějších potravinách. Vysoké koncentrace těchto látek lze očekávat zejména ve fermentovaných potravinách, kde vznikají metabolickou činností přítomných mikroorganismů. Z tohoto důvodu vysoké hladiny BA mohou, především u nefermentovaných potravin, značit kažení potravin a množství BA může sloužit jako indikátor čerstvosti a kvality potravin (Gardini et al., 2016; Durak-Dados et al., 2020; Dabadé et al., 2021). Intoxikace způsobené biogenními aminy jsou i v popředí zájmu Evropského úřadu pro bezpečnost potravin (EFSA), který v roce 2011 vydal stanovisko vědeckého panelu pro biologická rizika (BIOHAZ). Na základě tohoto kvalitativního posouzení rizik spojených s výskytem BA v potravinách dospěl BIOHAZ k závěru, že tyramin a histamin jsou nejtoxičtějšími BA a relevantní pro bezpečnost potravin (EFSA, 2011). Navíc toxicita těchto BA může být umocněna přítomností dalších BA, zejména kadaverinu a putrescinu (Ladero et al., 2010).

Přestože přítomnost BA v potravinách představuje hrozbu pro lidské zdraví, legislativní limity upravující jejich obsah v potravinách jsou stále nedostatečné. V Evropské unii je totiž histamin jediným biogenním aminem, pro který je stanoven maximální povolený limit. Tento limit je navíc stanoven pouze v rybách a produktech rybolovu. Nařízení komise (ES) č. 2073/2005 povoluje v produktech rybolovu z druhů ryb spojovaných s vysokým množstvím histidinu 100 mg/kg histaminu. Přičemž tento limit může být překročen ve 2 z 9 vzorků z jedné šarže až na hodnotu 200 mg/kg. V produktech rybolovu, které byly ošetřeny enzymatickým zráním v láku je povolený limit 200 mg/kg histaminu, přičemž tento limit může být překročen ve 2 z 9 vzorků z jedné šarže až na hodnotu 400 mg/kg. Nařízení komise (ES) č. 1019/2013 upravuje Přílohu I Nařízení komise (EC) č. 2073/2005 a přidává limit histaminu v rybích omáčkách vyrobených fermentací produktů rybolovu. V těchto produktech je povolený limit 400 mg/kg.

Jelikož není pro obsah ostatních biogenních aminů legislativně stanoven limit, nejsou tyto sekundární metabolity pravidelně dozorovými orgány sledovány a vyhodnocovány, což by v případě vyššího obsahu tyraminu a dalších BA mohlo představovat potenciální riziko pro konzumenta. Otravy tyraminem jsou po otravě histaminem druhou nejčastěji hlášenou potravinou intoxikací. Tato intoxikace je často spojována s konzumací různých druhů sýrů. Další rizikovou skupinou

potravin jsou fermentované masné výrobky a fermentované alkoholické nápoje (EFSA, 2011).

## 1.1 Biogenní aminy a jejich vznik v potravinách

Biogenní aminy představují skupinu dusíkatých látek s nízkou molekulovou hmotností. Podle chemické struktury je lze rozdělit na aromatické (2-fenyletylamin a tyramin), alifatické (putrescin, kadaverin, spermidin a spermin) a heterocyklické (histamin a tryptamin) sloučeniny. Podle počtu aminoskupin v molekule je možné BA rovněž klasifikovat jako monoaminy (2-fenyletylamin, histamin, tyramin a tryptamin), diaminy (putrescin a kadaverin) a polyaminy (spermin, spermidin a agmatin) (Bardócz, 1995; Silla Santos, 1996; Stadnik a Dolatowski, 2010).

Biogenní aminy v potravinách vznikají především bakteriální dekarboxylací příslušných aminokyselin (Obr. 1). Tyto reakce jsou katalyzovány substrátově specifickými enzymy – dekarboxylázami (Shalaby, 1996). Dekarboxylázy patří mezi skupinu enzymů, které mohou využívat jako kofaktor pyridoxal-5-fosfát (PLP) nebo pyruvoylový zbytek. Právě na tyto kofaktory se váže příslušná L-aminokyselina za tvorby Schiffovy báze. Kladně nabitě atomy dusíku pyridinového kruhu odtahují elektrony z  $C_{\alpha}$  uhlíku L-aminokyseliny a tím se vytváří příznivý mezomerní efekt. Zároveň dochází k destabilizaci vazeb vycházejících z  $C_{\alpha}$  uhlíku a k odštěpení oxidu uhličitého. Ke stabilizaci mezomerního stavu pak dochází prostřednictvím adice jednoho protonu na  $C_{\alpha}$  a hydrolyzou Schiffovy báze na primární amin (Marková a Králová, 2004; EFSA, 2011; Ahmad et al., 2020).

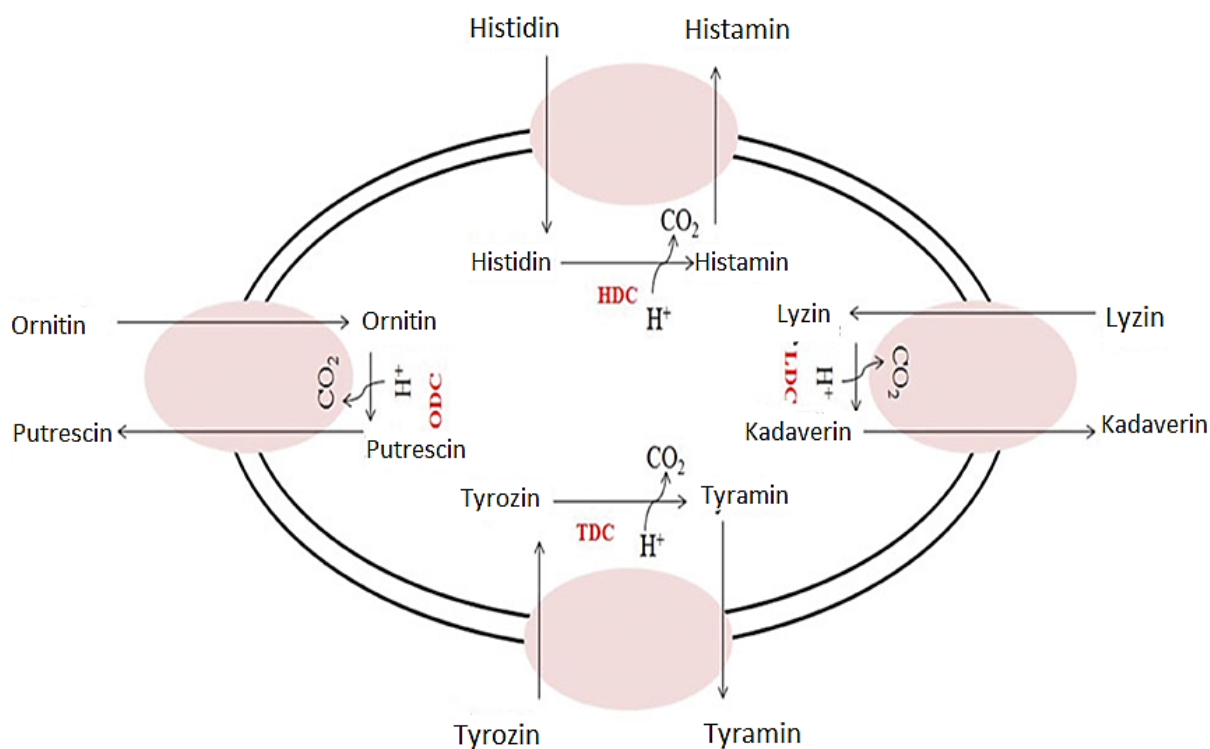
Vzniklé biogenní aminy jsou pak následně vyloučeny z cytoplazmy buňky pomocí transportního proteinu v cytoplazmatické membráně. Přítomnost těchto antiporterů byla zjištěna například u *Lactobacillus* (nyní *Lentilactobacillus*) *buchneri* ST2A a *Streptococcus thermophilus* (antiporter pro histidin/histamin), *Lactobacillus* (nyní *Levilactobacillus*) *brevis* (antiport pro tyrozin/tyramin) a *Escherichia coli* (antiport pro lyzin/kadaverin a ornitin/putrescin) (EFSA, 2011; Linares et al., 2011).

## 1.2 Výskyt BA ve vybraných fermentovaných potravinách a nápojích a faktory ovlivňující jejich tvorbu

### 1.2.1 Fermentové masné výrobky

Fermentace masných výrobků vytváří vhodné podmínky pro tvorbu biogenních aminů. Vysoký obsah bílkovin a proteolytická aktivita během zpracování masných výrobků poskytuje prekuzory pro dekarboxylázovou aktivitu přítomných mikroorganismů (Bover-Cid et al., 2001; Sarkadi, 2008). Nejčastěji se vyskytujícím BA ve fermentovaných masných výrobcích bývá tyramin (TYM). Výskyt histaminu (HIM) a diaminů, putrescinu (PUT) a kadaverinu (CAD), je rovněž docela běžný (De Mey et al, 2014). V některých výrobcích se můžou

nacházet v malém množství i 2-fenyletylamin (PHM) a tryptamin (TRM) (Suzzi a Gardini, 2003; Glória, 2005).



Obr. 1: Dekarboxylace aminokyselin za vzniku příslušných BA a jejich transport přes buněčnou membránu. Histidin dekarboxyláza (HDC), lyzindekarboxyláza (LDC), tyrozin dekarboxyláza (TDC), ornitindekarboxyláza (ODC) (upraveno dle Gardini et al., 2016).

Během výroby a skladování masných výrobků má na vznik BA vliv mnoho faktorů. Jedním z nejdůležitějších faktorů je však kvalita vstupních surovin, zejména kvalita syrového masa. V čerstvém mase použitém pro výrobu salámů jsou ve významných množstvích obsaženy pouze spermidin, spermin a putrescin (Stadnik a Dolatowski, 2010). Vysoké koncentrace těchto biogenních aminů jsou připisovány mikrobiálnímu růstu v závislosti na čerstvosti masa. Čerstvé maso vystavené nevhodným teplotním podmínkám je charakteristické vysokým počtem enterokoků a bakterií z čeledi *Enterobacteriaceae*. V důsledku toho může docházet ve výrobku ke vzniku a akumulaci tyraminu (okolo 250 mg/kg), kadaverinu (340 mg/kg) a putrescinu (80 mg/kg). Naopak salámy vyrobené ze zmrzlého masa se vyznačují přítomností pouze tyraminu, jehož maximální koncentrace může dosahovat hodnot kolem 100 mg/kg (Glória, 2005; Vidal-Carou, 2007).

Vhodný výběr startovacích kultur je rovněž zásadní pro prevenci a akumulaci BA ve fermentovaných masných výrobcích (Suzzi a Gardini, 2003; Hu et al., 2007; Van Ba et al., 2016; Domínguez et al., 2016). Hojně využívanými startérovými kulturami v masném průmyslu bývají bakterie mléčného kvašení (BMK) spolu s mikrokoky nebo s koaguláza-negativními stafylokoky. Hlavním

důvodem, proč se přidávají tyto mikroorganismy do potravin, je bezpochybně jejich schopnost svojí lipolytickou a proteolytickou činností dodat výrobkům typickou strukturu, chuť a vůni. Na druhou stranu řada BMK patří mezi potenciální producenty biogenních aminů. Proto je také důležité tyto mikroorganismy prověřovat na schopnost tvorby biogenních aminů a používat pouze dekarboxyláza-negativní kmeny (Corsetti et al., 2014).

Z dalších faktorů ovlivňujících tvorbu BA je nutné zmínit pH, vodní aktivitu, redoxní potenciál, NaCl a teplotu (Sarkadi, 2008; Gücükoğlu a Küplülü, 2010; Buňková et al., 2011). Hodnota pH je jedním z důležitých faktorů ovlivňujících dekarboxylázovou aktivitu. Existují dva protichůdné mechanismy působení pH. Rychlý a prudký pokles pH ve fermentovaných masných výrobcích inhibuje kontaminující bakterie. Na straně druhé nízké pH podporuje tvorbu BA (napomáhá dekarboxylačním reakcím), a právě tyto látky chrání mikroorganismy před nepříznivými podmínkami růstu (nízkému pH). Proto je velmi důležité najít rovnovážný stav mezi těmito mechanismy (Bover-Cid et al., 2008; EFSA, 2011).

Důležitou roli hraje i množství vody a poměr soli během fermentace a skladování fermentovaných masných výrobků. Sůl brání produkci biogenních aminů tím, že snižuje vodní aktivitu. Mikroorganismy poté nemají dostatečné množství volné vody potřebné ke svému přežití. Například Roseiro et al. (2006) zkoumali vliv koncentrace soli (3 a 6 %) na tvorbu BA v portugalském fermentovaném masném výrobku Painho de Portalegre. Zjistili, že množství kadaverinu, putrescinu, tyraminu a 2-fenyletylaminu ve vzorku salámu obsahujícího 6 % NaCl se snížilo o 83 %, 43 %, 28 % a o 98 % oproti salámu obsahujícího 3 % NaCl. K podobnému závěru došli i jiní autoři (Chander et al., 1989; Stratton et al., 1991).

Dalším neméně důležitým faktorem je teplota. Zejména pak teplota během skladování sehrává důležitou roli při tvorbě BA. Optimální teplota pro růst většiny bakterií s dekarboxylázovou aktivitou se pohybuje v rozmezí 20–37 °C. Proto vyšší teplota zpravidla umocňuje proteolytické a dekarboxylační reakce, což se projeví zvýšenou koncentrací aminů. Naopak při nízkých teplotách je v důsledku potlačení mikrobiálního růstu a snížení enzymové aktivity kumulace biogenních aminů v potravinech minimální (Karovičová a Kohajdová, 2005; Vidal-Carou, 2007).

Rovněž bylo zjištěno, že existuje vztah mezi obsahem BA a velikostí fermentovaného výrobku. Průměr výrobku ovlivňuje prostředí, ve kterém rostou mikroorganismy. Různý průměr odpovídá různým stupňům anaerobiózy, různým redoxním potenciálům, koncentracím chloridu sodného a hodnotám aktivity vody. V salámech s větším průměrem je obvykle nižší koncentrace soli a vyšší vodní aktivita. Ve větších salámech je obecně vyšší obsah biogenních aminů než v menších salámech. Větší průměr tak může být důvodem k vyšší tvorbě některých biogenních aminů, jako je tyramin nebo putrescin. Různá je i distribuce aminů v salámu. Větší množství bylo nalezeno uprostřed, než na okraji salámu (Bover-Cid et al., 1999; Parente et al., 2001; Suzzi a Gardini, 2003).

## 1.2.2 Fermentované mléčné výrobky

Z fermentovaných mléčných výrobků představují sýry největší riziko pro konzumenta. Jsou totiž vedle ryb nejčastěji uváděnou potravinou spojovanou s intoxikací BA. Tato intoxikace (viz podkapitola 1.3.2.) je často spojována s konzumací různých druhů sýrů bohatých na obsah tyraminu (EFSA, 2011). Stejně jako fermentované masné výrobky představují totiž sýry biologicky a biochemicky dynamický systém, který se neustále mění a tím vytvářejí ideální prostředí pro tvorbu BA. Množství a zastoupení jednotlivých BA se může lišit nejen mezi různými druhy sýrů, ale také v rámci stejného typu. Obecně hlavními BA v sýrech bývají tyramin, putrescin, kadaverin a histamin (Pachlová et al., 2012; Buňková et al., 2013; Schirone et al., 2013; Ma et al., 2020). Nicméně, v některých výrobcích lze detekovat v nízkých koncentracích i další BA, tzn. 2-fenyletylamin, tryptamin, spermin a spermidin (Novella-Rodríguez et al., 2003; Buňková et al., 2012; Shirone et al., 2013; Kandasamy et al., 2021; Ma et al., 2020).

Tvorba a akumulace BA v sýrech závisí především na množství a druhu mikroorganismů, na jejich proteolytické a dekarboxylázové aktivitě, na tepelném ošetření mléka před samotnou výrobou sýra a na podmínkách a délce zrání. Dále může být ovlivněna i fyzikálně-chemickými parametry sýra (pH, dostupnost aminokyselin, koncentrace soli, vodní aktivita a tučnost sýra). Mikrobiologická kvalita mléka je jedním z nejdůležitějších faktorů, které ovlivňují tvorbu BA v sýrech (Novella-Rodríguez et al., 2003; Buňková et al., 2012; Bogdanović et al., 2020; Ma et al., 2020). V provozech s nedostatečnou hygienickou úrovní dochází při zrání sýrů k výrazné tvorbě BA vlivem kontaminující mikroflóry, zejména z čeledi *Enterobacteriaceae* (Buňková et al., 2012; Shirone et al., 2013). Například v italském sýru Montasio tato skupina mikroorganismů byla detekována po 120 dnech zrání a produkovala histamin, putrescin a kadaverin (Maifreni et al., 2013). Pozitivní korelace mezi obsahem kadaverinu a vysokým počtem enterobakterií byla také pozorována v italských sýrech s modrou plísní (Marino et al., 2000). V těchto sýrech největší zastoupení enterobakterií patřilo rodu *Enterobacter*, *Serratia* a *Escherichia*; v minoritním zastoupení byly přítomny rody *Hafnia*, *Arizona*, *Citrobacter* a *Klebsiella*. Celkem 104 kmenů enterobakterií prokázalo schopnost produkce kadaverinu. Osmdesát devět procent těchto izolátů produkovalo CAD v koncentracích přesahujících 1300 mg/l. Většina izolátů (96 %) také produkovala putrescin. Schopnost produkce histaminu ve španělských sýrech byla zjištěna u *Hafnia alvei*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* a *Serratia* spp. (Roig-Sagués et al., 2002). Celkový mikrobiální obraz mléka, proto hraje významnou roli při tvorbě a akumulaci BA v sýrech. Tento fakt je podpořen i skutečností, že více BA bývá zpravidla detekováno v sýrech vyrobených z nepasterovaného mléka. Pasterace mléka je jednou z nejpoužívanějších technik ke snížení celkového počtu mikroorganismů, zejména kontaminující mikroflóry, a přispívá tak ke snížení tvorby BA v sýrech. Například v italských tradičních sýrech z regionu Abruzzo, které se vyrábí

z nepasterovaného ovčího mléka, se celkový obsah biogenních aminů pohyboval mezi 227–5861 mg/kg. Nejvíce produkovaným BA byl histamin (11–761 mg/kg), dále v pořadí tyramin (8–1771 mg/kg), putrescin (0–986 mg/kg), kadaverin (0–2128 mg/kg) a 2-fenyletylamin (0–232 mg/kg). Oproti tomu v sýrech ze stejné oblasti, ale vyráběných z pasterovaného ovčího mléka se celkový obsah BA pohyboval mezi 10–582 mg/kg (Shirone et al., 2013). Buňková et al. (2013) také uvádějí vyšší obsah BA v sýrech z českých a slovenských farem, které se vyrábí z nepasterovaného kozího mléka. Někteří autoři vidí možné odůvodnění nižšího obsahu BA v sýrech z pasterizovaného mléka také ve faktu, že pasteraci může dojít k destrukci pyridoxal-5-fosfátu. Tento kofaktor totiž je nezbytný pro funkci dekarboxyláz (Novella-Rodríguez et al., 2003; Linares et al., 2011; Benkerroum, 2016).

Vedle kontaminující mikroflóry biogenní aminy mohou být rovněž produkovány startérovými a non-startérovými BMK, které byly použity při výrobě těchto výrobků nebo které se do nich dostaly během jejich technologického zpracování ze vstupních surovin. V mléku se běžně nacházejí v nízkém počtu i non-startérové BMK. Mohou přežívat pasteraci a následně během zrání doby může docházet k jejich rychlému pomnožení ( $10^7$ – $10^8$  CFU/g). Mohou tak produkovat významné množství BA (Pachlová et al., 2018). Schopnost tvorby BA byla popsána u řady zástupců BMK, zejména z rodu *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* a *Streptococcus* (Roig-Sagués et al., 2002; Buňková et al., 2010a, Linares et al., 2011; Lorencová et al., 2012; Loizzo et al., 2013). Schopnost produkce tyraminu byla zjištěna u *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lc. lactis* subsp. *cremoris*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* a *Streptococcus thermophilus* (Buňková et al., 2009; Ladero et al., 2015). Tyto kmeny se běžně používají jako zákysové kultury. Tak jako u fermentovaných masných výrobků, je nutné prověřovat u startérových kultur dekarboxylázovou aktivitu a používat pouze BA-negativní kultury. Schopnost produkce TYM byla rovněž zjištěna u non-startérových kultur nacházející se běžně v sýrech, zejména *Lactobacillus* (nyní *Lacticaseibacillus*) *casei/paracasei*, *Lactobacillus* (nyní *Latilactobacillus*) *curvatus* a *Lactobacillus* (nyní *Lactiplantibacillus*) *plantarum* (Buňková et al., 2010a; Ladero et al., 2015; Pachlová et al. 2018). Dalšími významnými producenty tyraminu jsou zástupci rodu *Enterococcus*. V sýru čedar a v sýru holandského typu byly zjištěny jako producenti TYM kmeny *E. durans*, *E. faecium* a *E. faecalis* (Rea et al., 2004; Burdychová a Komprda, 2007). Stejní zástupci kromě tyraminu také produkovali 2-fenyletylamin v tradičním italském sýru Semicotto Caprino vyráběného z nepasterovaného kozího mléka (Galgano et al. 2001).

Jestliže srovnáme výskyt BA v sýrech čerstvých a zrajících, tak vyšší obsah BA bývá zjištěn u sýrů zrajících. Novella-Rodríguez et al. (2003) ve své studii uvádí, že pět z dvaceti vzorků čerstvých sýrů neobsahovalo žádné biogenní aminy, v ostatních vzorcích byla detekována produkce TYM, PUT a CAD. Nicméně množství těchto BA nepřesahovalo 3 mg/kg. Ostatní autoři také uvádějí

podobný trend (Linares et al., 2011; Buňková et al., 2013; Dabadé et al., 2021). Tento trend lze přisuzovat skutečností, že u čerstvých sýrů nedochází k tak významné proteolýze jako u sýrů zrajících, a tudíž přítomné mikroorganismy nemají prekurzory pro tvorbu BA. Proto například sýry s modrou plísní jsou vysoce rizikovou skupinou sýrů náchylnou k vysoké akumulaci BA (EFSA, 2011). Během zrání těchto sýrů dochází totiž k velmi intenzivní lipolýze a proteolýze činností charakteristických bakteriálních a plísnových kultur. Například ve španělském sýru Cabrales (sýr s modrou plísní v těstě) bylo detekováno až 1807 mg/kg tyraminu a 928 mg/kg histaminu (Roig-Sagués et al., 2002). Dále v čerstvých sýrech přítomná mikroflóra s dekarboxylázovou aktivitou nemá dostatek času vyprodukovat významná množství BA. Proto obvykle s narůstající dobou zrání nebo skladování se u sýrů koncentrace BA zvyšuje (Galgano et al., 2008; Dabadé et al., 2021). Podmínky zrání a skladování sýrů mohou rovněž ovlivňovat tvorbu BA. Buňková et al. (2010a) zjistili ve své studii, že nejvyšší množství TYM, PUT a CAD bylo detekováno v eidamských blocích, které byly nechány zrát 98 dní při 10 °C. Naproti tomu bloky sýrů, které zrály nejprve 23 dní při 10 °C a pak ve zbytku zrací doby při 5 °C, obsahovaly výrazně nižší množství uvedených BA.

Různá je i distribuce BA v jednotlivých částech sýra. Větší množství tyraminu, putrescinu a kadaverinu bylo nalezeno v horní vrstvě (0,7 mm) bloku eidamského typu než uprostřed. Tento trend byl pozorován nezávisle na zracích a skladovacích podmínkách (Buňková et al., 2010a). Autoři jako možné vysvětlení tohoto trendu vidí v počtu přítomných BMK, kdy právě ve svrchních vrstvách eidamského bloku detekovali vyšší počet BMK než uprostřed. Různé části sýrů mohou vytvářet odlišné podmínky (různá aktivita vody, obsah O<sub>2</sub> a stupeň proteolýzy), které ovlivňují růst a metabolismus přítomných mikroorganismů (Pachlová et al., 2012).

### **1.2.3 Výskyt BA ve fermentovaných alkoholických nápojích**

Pivo se běžně řadí mezi potraviny a nápoje, které mohou u některých osob způsobovat zdravotní problémy, a to z důvodu přítomnosti BA. Po konzumaci běžného i nealkoholického piva u některých pacientů užívající léky inhibující detoxikační enzym monoaminoxidázu (viz podkapitola 1.4.) byla pozorována hypertenzní krize v důsledku zvýšeného příjmu tyraminu. Příjem TYM přesahující 6 mg během 4 hodin nebo příjem TYM z piva obsahujícího více než 10 mg tohoto BA v litru se považuje za nebezpečný pro tyto osoby. Pivo může být rovněž příčinou bolesti hlavy u osob trpících na migrény. Alkohol a pravděpodobně některé další BA obsažené v pivu umocňují účinky TYM. Na druhou stranu žádné zdravotní problémy nebyly pozorovány u zdravých konzumentů piva (Kalač et al., 2002).

Biogenní aminy nacházející se v pivu lze rozdělit do dvou skupin. První skupina zahrnuje putrescin, spermin (SPM), spermidin (SPD) a agmatin (AGM)

a lze tyto BA považovat za přirozené složky piva primárně pocházející ze sladu a chmelu. Zatímco druhá skupina, zejména HIM, TYM a CAD, je obvykle výsledkem dekarboxylázové aktivity kontaminující mikroflóry, zejména bakterií mléčného kvašení (Kalač a Křížek, 2003; Poveda et al., 2017). Buňka et al. (2012) zkoumali přítomnost a množství BA celkem u 114 vzorků alkoholického a nealkoholického lahvového piva vyrobeného ve 28 pivovarech v České republice. Piva byla analyzována ihned po nákupu a poté na konci období minimální trvanlivosti (skladovací teplota 8 °C). Koncentrace HIM, PHM a TRM ve studovaných vzorcích byly velmi nízké (většinou pod 30 mg/l). Spermin a spermidin se také vyskytovaly v malém množství, zatímco hladiny tyraminu, putrescinu a kadaverinu dosáhly významných hodnot, zejména u alkoholických piv. U téměř 25 % testovaných vzorků alkoholických piv (na konci období minimální trvanlivosti) bylo překročeno celkové množství všech sledovaných BA 100 mg/l a u 6 % dokonce množství 200 mg/l. Podobné výsledky uvádí ve své studii i Lorencová et al. (2020), kteří analyzovali přítomnost BA ve 115 vzorcích piva z minipovovarů z České republiky. Nejvíce detekovanými BA byly tyramin, putrescin a kadaverin. Obsah těchto BA se s dobou skladování piva zvyšoval. Před koncem data minimální trvanlivosti u 30 % testovaných vzorků piv se obsah BA pohyboval mezi 50–100 mg/l a u 18 % bylo detekováno množství BA vyšší než 100 mg/l (104–213 mg/l). S ohledem na běžnou spotřebu piva na osobu a den, konzumace takovýchto piv by mohlo, představovat zdravotní riziko i zdravých spotřebitelů.

Na druhou stranu Almeida et al. (2012) uvádí velmi nízké koncentrace BA ve vzorcích piva z Portugalska. Nejdominantnějšími BA byly putrescin a tyramin. Množství PUT se pohybovalo do 12,8 mg/l a množství TYM do 5,9 mg/l. Aflaki et al. (2014) pozorovali velmi nízké koncentrace u nealkoholických piv z Íránu s koncentracemi pod 2,56 mg/l.

### **1.3 Fyziologické účinky a toxicita BA**

V eukaryotických buňkách zastávají biogenní aminy nepostradatelnou roli v podobě prekurzorů pro syntézu hormonů, alkaloidů, nukleových kyselin a proteinů (Karovičová a Kohajdová, 2005). V lidském organismu se pak podílí na regulaci tělesné teploty, ovlivňují krevní tlak a regulují trávení. Biogenní aminy dopamin a serotonin též slouží jako neurotransmitery v centrální nervové soustavě (Stadnik a Dolatowski, 2010). Polyaminy zase hrají důležitou roli při růstu a diferenciaci buněk a stabilizaci membrán (Önal, 2007).

Význam syntézy BA v prokaryotických buňkách není zatím zcela objasněný. Nicméně některé studie poukazují na možnost, že dekarboxylací aminokyselin na příslušný BA mohou některé mikroorganismy získávat touto alternativní cestou energii (Wolken et al., 2006; Trip et al., 2012). Taktéž se předpokládá, že produkce určitých biogenních aminů představuje obranný mechanismus



mikroorganismů proti kyselému prostředí (Trip et al., 2012; Romano et al., 2014; Perez et al., 2015).

### 1.3.1 Fyziologické účinky a toxicita histaminu

Mezi nejvíce toxické biogenní aminy patří jednoznačně histamin. Histaminové otravy pak lze považovat jednoznačně mezi nejzávažnější. Histamin se v lidském těle nachází především v žírných buňkách (mastocytech) a bazofilních granulocytech, kde je uchováván ve specifických granulích. Prostřednictvím degranulace (vytěsněním granul) pak může být v reakci na různé podněty z buněk uvolňován ve značném množství. Široké spektrum působení histaminu je umožněno interakcí se specifickými receptory ( $H_1$ ,  $H_2$ ,  $H_3$  a  $H_4$ ).  $H_1$  receptory se nacházejí v mozku a v periferních tkáních. V mozku regulují cirkadiánní rytmus a pozornost. V periferních tkáních zase působí vazodilataci a bronchokonstrikci jako důsledek alergické reakce (Criado et al., 2010; Ladero et al., 2010).

Přestože jsou  $H_2$  receptory přítomny v mnoha různých tkáních organismu, hlavním úkolem těchto receptorů se zdá být sekrece žaludečních šťáv. V přítomnosti histaminu tyto receptory vylučují žaludeční šťávy a vyvolávají kontrakce hladké svaloviny střeva s klinickými projevy břišních křečí, průjmů a zvracení (Jutel et al., 2009; Ladero et al., 2010; O'Mahony et al., 2011).

Třetí typ histaminových receptorů ( $H_3$ ) se vyskytuje převážně v centrálním nervovém systému (CNS). Dále je můžeme nalézt v kardiovaskulárním systému a gastrointestinálním traktu (Mahdy a Webster, 2017).  $H_3$  receptory působí jako autoreceptory na presynaptické membráně histaminergních neuronů CNS, kde regulují syntézu a uvolňování histaminu a dalších neurotransmiterů, jako jsou noradrenalin, serotonin, dopamin a acetylcholin (Ladero et al., 2010; Mahdy a Webster, 2017). Poslední objevený histaminový receptor ( $H_4$ ) je exprimován především v buňkách imunitního systému, předpokládá se, že se jedná o modulátor imunitních reakcí. Jedním z hlavních pozorovaných procesů, na kterých se podílí tyto receptory, je histaminem indukovaná chemotaxe žírných buněk, eozinofilů a dendritických buněk (Parsons a Ganellin, 2006).

Intoxikace histaminem (tzv. „scombroid poisoning“) jsou často spojovány, jak již anglický název napovídá, s konzumací ryb čeledi *Scombridae* a *Scomberesocidae* (Feng et al., 2016). Tyto druhy ryb obecně obsahují ve svém těle vysoké hladiny volného histidinu (až 5 000–20 000 mg/kg), ze kterého pak činností bakteriálních dekarboxyláz dochází ke kumulaci významného množství histaminu. Nicméně intoxikace HIM byla zaznamenána i po konzumaci jiných druhů ryb než z výše uváděných čeledí (FAO/WHO, 2018). Další rizikovou skupinou potravin jsou sýry, zejména švýcarské, které se vyrábějí z nepasterizovaného mléka (Feng et al., 2016). Koncentrace HIM v sýrech, které byly spojovány s ohniskem otravy HIM, se pohybovala od 850 do 1870 mg/kg (EFSA, 2011). Klinické projevy intolerance a otravy histaminem spočívají v široké škále nespecifických gastrointestinálních a extraintestinálních symptomů v důsledku distribuce čtyř výše popsanych histaminových receptorů v různých

orgánech a tkáních těla (Hungerford, 2010). Schnedl a Enko (2020) ve své studii komplexně analyzovali příznaky histaminové intolerance u 133 pacientů. Nejčastější a nejzávažnější projevy byly gastrointestinální. Břišní distenze byla pozorována u 92 % pacientů a postprandiální plnost, průjem, bolest břicha a zácpa u 55–73 % pacientů. Na druhém místě byly zaznamenány poruchy nervového a kardiovaskulárního systému (necitlivost nebo pálení úst, kovová chuť v ústech, závratě, bolesti hlavy, palpitace, tachykardie a arytmie) následované respiračními a dermatologickými příznaky (astma, červenání a svědění kůže a vyrážky). Tyto symptomy se většinou objevují do 30 min po pozření potravin s vysokým obsahem HIM a odezní během 24 hodin. V závažnějších případech mohou symptomy přetrvávat i několik dní (Hungerford, 2010). Nízká specifita a složitá variabilita symptomů nepochybně přispívají k obtížné diagnostice intoxikace HIM.

Co se týká četnosti výskytu intoxikace histaminem, mezi roky 2010–2016 bylo oficiálně hlášeno 221 ohnisek otravy HIM z členských zemí EU. Nejčastější příčinou otravy byla konzumace ryb a produktů z rybího masa, dále sýry a kombinace více druhů potravin (EFSA, 2017). Nejnovější údaje EFSA a Evropského střediska pro prevenci a kontrolu nemocí (ECDC) ukazují, že v roce 2017 došlo k nárůstu ohnisek o 22 % ve srovnání s předchozím rokem. Konkrétně v roce 2017 bylo zaznamenáno celkem 117 ohnisek intoxikace histaminem u 572 osob, z nichž 9 % vyžadovalo hospitalizaci. Naštěstí nebylo zaznamenáno žádné úmrtí (EFSA a ECDC, 2018).

### **1.3.2 Fyziologické účinky a toxicita tyraminu a dalších stopových BA**

Biogenní aminy tyramin (TYM), tryptamin (TRM) a 2-fenyletylamin (PHM) se nacházejí v lidském těle jen ve stopovém množství, a proto je někdy nazýváme jako „stopové aminy – trace amines“. V centrálním nervovém systému tyto biogenní aminy působí jako neurotransmitery a neuromodulátory (Branchek a Blackburn, 2003; Broadley, 2010; Narang et al., 2011). Zvýšené množství těchto aminů nepřímo způsobuje uvolnění noradrenalinu ze sympatického nervového systému s možným důsledkem hypertenzní krize, migrenózních bolestí hlavy, v krajních případech až krvácení do mozku a k selhání srdce (Joosten, 1988; Shalaby, 1996; Naila et al., 2010).

Otravy tyraminem (tzv. „cheese reaction“) jsou po otravě histaminem druhou nejčastěji hlášenou potravinou intoxikací. Přesto limit pro obsah TYM v potravinách, zejména v sýrech, není legislativně stanoven. V 60. letech dvacátého století byly zaznamenány první příznaky otravy TYM po konzumaci sýru u pacientů léčených inhibitory enzymu monoaminoxidázy – MAOI (Ladero et al., 2010; EFSA, 2011). Proto je tato intoxikace často spojována s konzumací různých druhů sýrů. Další rizikovou skupinou potravin jsou fermentované masné výrobky (EFSA, 2011). Mezi typické příznaky intoxikace TYM patří nevolnost, bolesti hlavy, migrény, problémy s dýcháním a zvýšení krevního tlaku (Ruiz-

Capillas a Herrero, 2019). Co se týká toxické dávky TYM, v dostupné literatuře jsou uváděny různé limitní hodnoty. Například Benkerroum et al. (2016) uvádí, že k významnému zvýšení krevního tlaku u zdravých jedinců je zapotřebí dávky TYM v množství 600 mg až 2000 mg. Rafehi et al. (2019) ve své studii uvádí, že perorální podání 400 mg tyraminu může u některých zdravých jedinců zvýšit systolický krevní tlak až na 100 mmHg. Mnohem menší množství tyraminu v potravě však může mít toxický účinek na jedince léčené léky MAOI. U těchto jedinců může již 6 mg TYM vyvolat mírné symptomy a 10–25 mg TYM způsobovat vážné zdravotní komplikace (EFSA, 2011).

### 1.3.3 Fyziologické účinky a toxicita diaminů a polyaminů

Putrescin (PUT) slouží jako prekurzor sperminu (SPM) a spermidinu (SPD). Spolu s těmito polyaminy se pak podílí na regulaci růstu a diferenciaci buněk (Kalač a Krausová, 2005; Larqué et al., 2007; Ladero et al., 2010). O fyziologických funkcích kadaverinu se mnoho neví, ale předpokládá se, že může nahrazovat funkci polyaminů a udržovat tak životaschopnost buněk v období jejich deficitu (Hölttä a Pohjanpelto, 1983). Negativní působení těchto diaminů spočívá hlavně v odčerpání kapacity detoxikačních enzymů. V důsledku tohoto jevu dochází k zesílení účinků toxičtějších BA, zejména histaminu a tyraminu (Glória, 2005). Dále z těchto diaminů mohou v potravinách vznikat reakcí s dusitany karcinogenní látky zvané *N*-nitrosaminy. Konkrétně putrescin je prekurzorem pro vznik *N*-nitrosopiperidinu a kadaverin pro vznik *N*-nitrosopyrrolidinu (De Mey et al., 2014).

Polyaminy jsou malé kladně nabitě molekuly, které můžeme najít prakticky ve všech živých buňkách. Jsou totiž esenciální pro život eukaryotických buněk. Podílejí se na mnoha krocích proteosyntézy. Mají vliv na biologické funkce proteinů, stabilitu konformace nukleových kyselin a procesy buněčného růstu a dělení (Glória, 2005; Kalač a Krausová, 2005; Larqué et al., 2007). Nadměrné požití sperminu a spermidinu může mít negativní vliv na zdraví člověka modulací epitelové střevní bariéry. Miyake et al. (2006) uvedli, že 50 mmol/l SPM může způsobit poškození střevní sliznice. Byla pozorována exfoliace a zmenšování epiteliálních buněk střevní sliznice. Vliv polyaminů na růst a diferenciaci buněk se může negativně uplatnit při růstu nádorů, proto se polyaminy v poslední době dostávají do popředí zájmu (Abdulhussein a Wallace, 2014; Muñoz-Esparza et al., 2019).

## 1.4 Detoxikace BA

Běžný příjem BA je naše tělo schopno účinně metabolizovat detoxikačním systémem nacházejícím se především v trávicím traktu. Hlavní roli při tom hrají enzymy monoaminoxidáza (EC 1.4.3.4), diaminoxidáza (EC 1.4.3.22), polyaminoxidáza (EC 1.5.3.11) a histamin-*N*-metyltransferáza (EC 2.1.1.8). Aminooxidázy jsou enzymy, které katalyzují oxidační deaminaci biogenních aminů na příslušné aldehydy, amoniak a peroxid vodíku. Tyto metabolity jsou pro organismus toxické, proto jsou ihned konvertovány na další látky. Vzniklé aldehydy jsou většinou přeměněny na příslušné kyseliny za katalýzy enzymem aldehyddehydrogenáza (ALDH) a dále v těle metabolizovány (Finberg a Rabey, 2016; Rafahi et al., 2019; Santin et al., 2021). Peroxid vodíku je přeměněn na vodu a kyslík enzymem kataláza v periferních tkáních nebo enzymem glutathionperoxidáza v mozkové tkáni (Sturza et al., 2019). Vzniklý amoniak je v těle buď přeměněn na glutamin enzymem glutaminsyntáza nebo vstupuje do močovinového cyklu v jaterních mitochondriích a je následně vyloučen močí.

Monoaminoxidázy (MAO) se řadí mezi flavoenzymy obsahující ve své sktraktuře kovalentně vázaný kofaktor flavinadenindinukleotid (FAD). Nacházejí se na vnější mitochondriální membráně a katalyzují oxidační deaminaci neurotransmitterů a stopových aminů. Existují ve dvou isoformách, MAO-A a MAO-B, které se liší substrátovou specifitou. MAO-A katalyzuje přednostně oxidační deaminaci serotoninu, zatímco MAO-B má větší afinitu k 2-fenylatylaminu. Obě isoformy pak katalyzují tyramin, tryptamin, dopamin, noradrenalin a adrenalin (Corbineau et al., 2017; Santin et al., 2021). Oxidativní deaminací tyraminu vzniká *p*-hydroxyfenylacetaldehyd, který je poté konvertován ALDH na kyselinu *p*-hydroxyfenyloctovou (Rafahi et al., 2019). Další BA tryptamin je oxidován na indol-3-acetaldehyd a poté může být dál konvertován na indol-3-etanol (Yu et al., 2003). 2-fenyletylamin je degradován na 2-fenylacetaldehyd a poté je tento aldehyd přeměněn na fenyloctovou kyselinu (Panoutsopoulos et al., 2004).

Diaminoxidázy (DAO) jsou enzymy, které pro svoji funkci vyžadují  $\text{Cu}^{2+}$  a katalyzují oxidační deaminaci primární aminové skupiny histaminu a diaminů putrescinu a kadaverinu (Muñoz-Esparza et al., 2019; Boehm et al., 2020; Comas-Basté et al., 2020). Putrescin je činností těchto enzymů přeměněn na 4-aminobutanal a kadaverin na 5-aminopentanal. Tyto aldehydy podlehnou spontánní cyklizací za vzniku  $\Delta^1$ -pyrrolinu a  $\Delta^1$ -piperidinu (Pegg et al., 2013; Boehm et al., 2020). Histamin je oxidativní deaminací konvertován na imidazol-4-acetaldehyd a dále přeměněn aldehyd-dehydrogenázou na imidazoloctovou kyselinu. Při degradaci HIM může také hrát roli enzym histamin-*N*-metyltransferáza. Tento enzym katalyzuje metylaci HIM za vzniku 1-methylhistaminu. Další přeměny tohoto metabolitu probíhají za účasti enzymů DAO a ALDH. Nejprve vzniká 1-methylimidazol-4-acetaldehyd, který je následně konvertován na příslušnou kyselinu (Comas-Basté et al., 2020).

Polyaminoxidázy (PAO) se řadí mezi flavoenzymy obsahující ve své sktruktuře kovalentně vázaný kofaktor flavinadenindinukleotid (FAD). Tyto aminoxidázy katalyzují oxidaci sekundárních aminoskupin polyaminů, zejména sperminu a spermidinu, za vzniku různých produktů v závislosti na druhu organismu (Salvi a Tavladoraki, 2020). Savčí PAO přednostně oxidují *N*<sup>1</sup>-acetylspermin a *N*<sup>1</sup>-acetylspermidin. Proto katabolismus sperminu a spermidinu začíná acetylací těchto polyaminů za katalýzy enzymem spermidin/spermin-*N*<sup>1</sup>-acetyltransferáza (SSAT). Tato acetylace snižuje kladný náboj těchto BA. V důsledku tohoto děje dochází ke snížení schopnosti těchto BA vázat se na záporně nabitě makromolekuly a je umožněna jejich degradace. *N*<sup>1</sup>-acetylspermin je oxidačně deaminován za katalýzy PAO na spermidin. *N*<sup>1</sup>-acetylspermidin je za katalýzy PAO konvertován na putrescin. Jako vedlejší produkty vznikají *N*-acetyl-3-aminopropanal a peroxid vodíku (Pegg, 2013; Fernández-Reina et al., 2018). *N*-acetyl-3-aminopropanal je přeměněn za katalýzy ALDH na *N*-acetyl-β-alanin, který je následně pomocí specifické hydrolázy deacetylován na β-alanin (Seiler, 2004).

Kapacita detoxikačních enzymů je však omezená a nadměrné množství BA již organismy nedokáží metabolizovat. Míra schopnosti takto zneškodňovat BA je však velmi individuální a může být ovlivněna taktéž mnoha různými faktory. Prvním z faktorů je zdravotní stav jedince. U osob trpícími nemocemi dýchacích cest nebo chorobami trávicího traktu (gastritida, syndrom dráždivého střeva, Crohnova choroba a žaludeční vředy) je většinou aktivita aminoxidáz nižší než u zdravých jedinců. Dalším faktorem jsou inhibitory aminoxidáz. U některých jedinců byl pozorován inhibiční účinek některých léků (léky proti bolesti, antidepressiva a léky používané pro léčbu Alzheimerovy a Parkinsonovy choroby) na výše uvedené enzymy (Joosten, 1988; Bardócz, 1995; Silla Santos, 1996; Karovičová a Kohajdová, 2005; Stadnik a Dolatowski, 2010). Inhibitory monoaminoxidázy (MAOI) byly objeveny v USA v 50. letech 20. století u pacientů léčených iproniazidem proti tuberkulóze. V současné době MAOI lze klasifikovat do tří skupin: a) nevratné a neselektivní inhibitory jako je např. fenelzin; b) nevratné a selektivní inhibitory jako je např. selegilin (MAO-B) a klorygin (MAO-A); c) reverzibilní a selektivní inhibitory jako je moklobemid (MAO-A) a lazabemid (MAO-B) (Feng et al., 2016).

Rovněž kouření a konzumace alkoholu může snižovat aktivitu detoxikačních enzymů (Karovičová a Kohajdová, 2005; Ladero et al., 2010; Stadnik a Dolatowski, 2010).

## 1.5 Možnosti snížení biogenních aminů

Zdravotní riziko spojené s konzumací fermentovaných výrobků s vysokým obsahem BA vede k trvalému úsilí o jejich snížení na minimum. Za tímto účelem byla navržena řada opatření, která především doporučují na (Alvarez a Moreno-Arribas, 2014; Gardini et al., 2016; Ahmad et al., 2020):

- omezení nebo snížení tvorby prekurzorů BA, např. zkrácením doby zrání fermentovaných potravin, zejména sýrů,
- zlepšení hygienických podmínek při výrobě a pak následně při skladování těchto výrobků, aby se zamezilo výskytu kontaminující mikroflóry s dekarboxylázovou aktivitou,
- prověřování startovacích kultur na schopnost tvorby BA a použití jen dekarboxyláza-negativních startovacích kultur,
- implementace faktorů, které inhibují dekarboxylázovou aktivitu přítomných mikroorganismů, do technologického postupu.

V následujících podkapitolách jsou uvedeny možné strategie, které jsou dosud uváděny v dostupné literatuře a které by mohly vést ke snížení biogenních aminů.

### 1.5.1 Snižování BA za použití ionizujícího záření

Ozařování potravin je jednou z technik konzervace potravin. Podle Vyhlášky č. 133/2044 Sb. lze k ošetření potravin a surovin využít ultrafialové záření o vlnové délce 250–270 nm a ionizující záření tvořené částicemi nabitými, nenabitými nebo obojími, schopnými přímo nebo nepřímo ionizovat. Tato konzervační technika má potenciální využití i pro regulaci množství BA v potravinách. Působením ionizujícího záření dochází jednak ke snížení počtu mikroorganismů odpovědných za produkci BA a jednak může docházet k radiolýze biogenních aminů (Kim et al., 2004; Shalaby et al., 2016). Radiolytická degradace BA byla demonstrována v modelovém systému ve studii Kim et al. (2004). Vodné roztoky 9 biogenních aminů (HIM, CAD, PUT, TRM, TYM, PHM, SPM, SPD a AGM) byly ozářeny ionizujícím zářením o dávkách 2,5; 5; 10; 20 a 25 kGy. Míra degradace jednotlivých BA se lišila v závislosti na dávce ionizujícího záření, přičemž se pohybovala mezi 5 a 100 %. Úplná degradace putrescinu a sperminu byla pozorována při dávce 5 kGy a spermidinu pak při dávce 10 kGy. Radiolýza histaminu a 2-fenyletylaminu byla zaznamenána až při dávkách 15 kGy. Ostatní BA degradovaly až při dávce 20 kGy (Kim et al., 2004).

Studie dalších autorů poukazují na snížení obsahu různých BA v potravinách ozářených různými dávkami ionizujícího záření. Rabie a Toliba (2013) zkoumali vliv gama záření na tvorbu a akumulaci BA v egyptských uzených klobásách během skladování po dobu 90 dnů při 4 °C. Tyto klobásy byly ozářeny gama zářením o dávce 2, 4 a 6 kGy. Celkové množství BA v neozářených klobásách se pohybovalo 596 mg/kg na konci doby skladování. Ionizující záření o dávce 2 kGy snížilo celkový obsah BA v klobásách na 290 mg/kg, dávka 4 kGy na 95 mg/kg a dávka 6 kGy na 26 mg/kg.

Další studie zkoumala vliv gama záření na kvalitu a obsah BA ve vzorcích egyptského sýru Rumi během 6 měsíců skladování (Shalaby et al., 2016). Vzorky sýrů Rumi byly ozářeny gama zářením o dávce 5, 10 a 15 kGy a skladovány při teplotě 5 °C. V neozářených vzorcích byla na konci doby skladování sledována produkce TYM (931 mg/kg), CAD (67 mg/kg), PUT (41 mg/kg) a HIM (10 mg/kg). Ozáření sýrů Rumi dávkou 5 kGy mělo výrazný vliv na produkci HIM a PUT, které byly detekovány v zanedbatelných množstvích na konci doby skladování (0,6 mg/kg a 4 mg/kg). Ve vzorcích ozářených dávkou 10 kGy již histamin nebyl detekován a ostatní BA byly detekovány v množství 2 mg/kg (PUT), 6 mg/kg (CAD) a 10 mg/kg (TYM). Ve vzorcích ozářených dávkou 15 kGy kromě HIM nebyl detekován PUT. Navíc ostatní BA byly zjištěny v zanedbatelných množstvích. Celkový obsah BA činil v těchto vzorcích 4 mg/kg.

Studie dalších autorů také poukazují na vliv ozařování na snížení hladiny biogenních aminů, zejména pak histaminu, u různých druhů ryb (Mendes et al., 2000; Mbarki et al., 2008) a u různých druhů masa (Min et al., 2007a; Min et al., 2007b; Büyükdveci et al., 2019).

Ozařování potravin různými dávkami ionizujícího záření vede ke snížení obsahu biogenních aminů v těchto potravinách, Nicméně existují jisté obavy týkající se nepříznivého ovlivnění výživových hodnot a organoleptických vlastností potravin. Hlavní obavy se týkají tvorby volných radikálů a oxidace lipidů a proteinů vedoucí ke zhoršení nutriční hodnoty potravinářských produktů, obzvláště pokud jsou potraviny vystaveny vyšším dávkám ionizujícího záření (Brewer, 2009; Moini et al., 2009; Naila et al., 2010).

### 1.5.2 Mikroorganizmy schopné degradace BA

V dosud publikované literatuře (Dapkevicius et al., 2000; Martuscelli et al., 2000; Zaman et al., 2010; Capozzi et al., 2012; Naila et al., 2012; Callejón et al., 2014; Eom et al., 2015) byla schopnost degradace BA zjištěna u řady bakteriálních rodů (např. *Bacillus*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Lactobacillus*, *Lactiplantibacillus*, *Latilactobacillus*, *Micrococcus*, *Pediococcus*, *Salmonella*, *Serratia* a *Staphylococcus*), ale také u některých plísní (*Aspergillus niger*, *A. oryzae*, *Alternaria* sp., *Epicoccum nigrum*, *Fusarium sporum*, *F. culmorum*, *Penicillium citrinum*, *P. roqueforti*, *Phoma* sp. a *Ulocladium chartarum*). Degradáční schopnost těchto mikroorganismů je umožněna přítomností nejčastěji aminoroxidáz (Adachi et al., 1966; Murooka et al., 1979; Leuschner et al., 1998; Yogadina et al., 2002; Zaman et al., 2010; Cueva et al., 2012; Niu et al., 2019).

Bakteriální aminoroxidázy katalyzují tak, jako v lidském těle (viz podkapitola 1.4), oxidativní deaminaci BA na příslušné aldehydy, amoniak a peroxid vodíku (Yogadina et al., 2002). Murooka et al. (1979) zkoumali distribuci membránově vázaných monoaminooxidáz u různých druhů mikroorganismů. Zjistili přítomnost MAO u zástupců čeledi *Enterobacteriaceae* (*Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae*, *K. aerogenes*, *Providencia alcalifaciens*, *Salmonella typhimurium* a *Serratia marcescens*) a dále u

*Pseudomonas aeruginosa*, *Micrococcus luteus* a *Brevibacterium* (nyní *Corynebacterium*) *ammoniagenes*. Většina těchto MAO prokázala vysokou katalytickou aktivitu vůči tyraminu, oktopaminu a dopaminu, v menší míře pak na noradrenalin. MAO z *Enterobacter cloacae* také oxidovala histamin. Surový enzymový extrakt z *Micrococcus* (nyní *Kocuria*) *varians* LTH 1540 prokázal vysokou katalytickou aktivitu vůči tyraminu (Leuschner et al., 1998). V menší míře byl oxidačně deaminován 2-fenyletylamin a tryptamin. Autoři zjistili, že tento enzym není membránově vázaný, ale nachází se cytoplazmě. Největší aktivita byla zaznamenána při pH 7–8 a teplotě 37–40 °C. Zvyšující se koncentrace soli inhibovala aktivitu enzymu. V přítomnosti 6% soli bylo degradováno pouze 30 % TYM a v přítomnosti 8% soli pouze 12 % TYM. Inhibiční účinek na aktivitu enzymu byl pozorován i v přítomnosti látky hydralazin. Adachi et al. (1966) izolovali putrescinoxidázu z bakterie *Micrococcus rubens* (nyní *Kocuria rosea*). Odhalili, že tato aminooxidáza patří mezi flavoproteiny a katalyzuje primárně oxidaci putrescinu, ale v menší míře i kadaverinu a spermidinu. Niu et al. (2019) izolovali z čínského rýžového vína kmen *Lactobacillus plantarum* CAU 3823 (nyní *Lactiplantibacillus plantarum*), který prokázal schopnost degradace 8 biogenních aminů (TYM, HIM, TRM, CAD, PUT, PHM, SPM a SPD) v MRS (De Man, Rogosa a Sharpe) bujónu obohaceném o příslušné BA v koncentraci 50 mg/l. Množství jednotlivých BA bylo sníženo o 40–56 %. Degradční schopnost tohoto kmene byla potvrzena i v čínském rýžovém víně, kde byl tento kmen přidán jako doplňková startérová kultura. Celkové množství BA bylo sníženo o více jak 40 %. Z tohoto kmene bylo následně izolováno a charakterizováno 9 aminooxidáz, z toho 8 bylo identifikováno jako MAO obsahující ve své sktruktuře kovalentně vázaný kofaktor FAD. Jejich molekulová hmotnost se pohybovala mezi 46 a 60 kDa. Tyto enzymy se vyznačovaly výbornou termostabilitou, kdy si udržely 50% aktivitu po zahřátí na 80 °C po dobu 2 hodin. Největší katalytická aktivita (36,9 U/mg) byla zjištěna při teplotě 28 °C a při pH 3–5. Naopak katalytická aktivita těchto enzymů byla snížena různou měrou přítomností dvojmocných iontů ( $Zn^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$  a  $Mg^{2+}$ ) v koncentraci 0,2 mol/l.

Dapkevicius et al. (2000) zkoumali aktivitu diaminooxidázy a schopnost 48 kmenů BMK izolovaných z fermentované rybí pasty degradovat histamin v modelovém systému i v silážované rybí suspenzi. Pět kmenů *Lactobacillus sakei* (nyní *Latilactobacillus sakei*) prokázalo degradační schopnost pouze v modelovém systému (médiu obsahující 50 mg/l HIM, pH 6, teplota 30 °C). Množství HIM bylo sníženo o 40–60 %. Degradace HIM enzymem DAO (633,5 U/l) byla pozorována v obou systémech, avšak větší degradace HIM byla pozorována v modelovém systému (fosfátový pufr o pH 7). Byl sledován vliv různých teplot (37, 30, 22 a 15 °C), vliv přísadků NaCl (2 %) a sacharózy (12 %), vliv pH 4,5 a vliv mikroaerofilního prostředí na aktivitu DAO. Největší degradační schopnost DAO byla sledována při teplotách 37 a 30 °C, ale byla aktivní i při teplotách 22 a 15 °C (60% a 40% úbytek HIM). Přítomnost soli ani



sacharózy v uvedených koncentracích nesnížila degradační schopnost enzymu DAO (100% úbytek HIM během 3,5 a 5 h). Mikroaerofilní prostředí již výrazněji ovlivnilo aktivitu DAO, kdy za stejný čas (5 h) byl pozorován pouze 40% úbytek HIM. Aktivita DAO byla zcela inhibována pH 4,5. Stejnou inhibici aktivity DAO pozorovali autoři v silážované rybí suspenzi. Autoři přepokládají, že při tomto pH dochází k denaturaci tohoto enzymu.

Podobnou studií se zabývali i Naila et al. (2012). Zkoumali degradační schopnost 5 bakterií (*Latilactobacillus sakei* AGR46, AGR37, Lb706; *Arthrobacter crystallopoietes* DSM20117 a *Vergibacillus halodonitrificans* Nai18) a enzymu diaminoxidáza. Degradace histaminu studovanými bakteriemi byla sledována v TSB (Tryptic soy broth) obsahujícím 500 mg/kg histaminu při 30 °C po dobu 9 dnů. U všech kmenů, kromě *A. crystallopoietes* DSM 20117, byla zjištěna schopnost degradace histaminu. Kmen *V. halodonitrificans* Nai18 snížil obsah histaminu přibližně o 30 % a kmeny *L. sakei* o 40–50 %. Degradací aktivity enzymu diaminoxidázy (2534 U/l) byla nejdříve sledována v modelovém systému (0,5M fosfátový pufr o pH 6, 1 % NaCl, 37 °C, 500 mg/kg HIM) a následně v reálné potravíně (tuňáková polévka, pH 6, 1 % NaCl, 37 °C, 500 mg/kg HIM). V obou systémech bylo sníženo množství histaminu až na nezjistitelnou úroveň.

Tři kmeny *Bacillus subtilis* prokázaly schopnost degradace HIM a TYM v LB (Luria-Bertani) bujónu obohaceném o 0,25 % HIM a TYM. Degradace HIM se pohybovala od 19 do 48 %, degradace TYM od 26 do 33 % (Eom et al., 2015). Dvacet jedna kmenů *Staphylococcus xylosum* izolovaných z tradiční italské fermentované klobásky prokázalo schopnost degradace HIM a TYM na různé úrovni. Degradací schopnost těchto kmenů byla sledována v 50 mmol/l fosfátovém pufru o pH 7 a obohaceném o TYM (3,46 mmol/l) a HIM (1,63 mmol/l). Sedmnáct kmenů degradovalo jak HIM, tak i TYM, tři kmeny pouze HIM a jeden kmen pouze TYM. Kmen *S. xylosum* S81 prokázal největší degradační schopnost. Snížil množství histaminu až na nezjistitelnou úroveň. Dále kmeny S206, S79 a S90 snížily obsah HIM o 93 %, 68 % a 53 %. Vysokou degradační schopnost obou BA prokázal kmen S142, který snížil obsah HIM o 63 % a obsah TYM o 47 % (Martuscelli et al., 2000).

Některé mikroorganismy mohou využívat k degradaci BA enzym lakázu (Callejón et al., 2014). Lakázy (EC 1.10.3.2) patří do skupiny rozmanitých enzymů nazývaných jako „multicopper oxidáza“ (MCO). Tyto enzymy jsou v přírodě široce distribuované a zastávají různé biologické funkce. Lakázy obsahují ve svých katalytických centrech 4 atomy mědi a oxidují nejrozličnější substráty za redukce molekuly kyslíku na vodu (Callejón et al., 2016; Janusz et al., 2020). Přítomnost těchto enzymů byla zjištěna u *L. plantarum* a *Pediococcus acidilactici*. Tyto kmeny prokázaly degradační schopnost PUT, HIM a TYM v červeném víně obohaceném o příslušné BA v koncentraci 40 mg/l. Kmen *L. plantarum* J16 snížil obsah HIM o 13 %, obsah TYM o 23 % a PUT o 27 %.

Kmen *P. acidilactici* CECT 5930 snížil obsah stejných BA o 14 %, 19 % a 36 % (Callejón et al., 2014).

Kromě aminoroxidáz byla zjištěna možná degradace některých aminů za účasti dehydrogenáz. Siddiqui et al. (2000) izolovali histamindehydrogenázu z *Nocardioides simplex* IFO 12069. Tento enzym katalyzuje, stejně jako aminoroxidázy, oxidativní deaminaci histaminu na imidazol-4-acetaldehyd. Největší katalytická aktivita byla prokázána vůči HIM, v menší míře pak vůči putrescinu a agmatinu. Enzym byl nejvíce aktivní v pufru Tris-HCl o pH 8,5 a nejvíce stabilní ve fosfátovém pufru o pH 7. Plnou katalytickou aktivitu si zachovala tato dehydrogenáza při zahřevu na 60 °C. Dehydrogenáza izolovaná z kmene *Alcaligenes xylosoxidans* IFO13495 katalyzuje oxidativní deaminaci histaminu, tyraminu, tryptaminu a 2-fenyletylaminu. Tento enzym byl stabilní v rozmezí pH 5–12, přičemž optimální pH pro katalýzu oxidace uvedených BA bylo v mírně alkalickém prostředí (pH 8). Plnou aktivitu si tento enzym zachoval i po inkubaci při teplotě 70 °C po dobu 40 minut (Kondo et al., 2004). Lee et al. (2015) zjistili schopnost degradace HIM u 8 izolátů ze solených ryb: *Rummeliibacillus stabekisii*, *Agrobacterium radiobacter* (dříve *Agrobacterium tumefaciens*), *Bacillus licheniformis*, *B. cereus* (2 kmeny), *B. amyloliquefaciens*, *B. subtilis* a *Paenibacillus polymyxa* (dříve *Bacillus polymyxa*). Degradace byla sledována v TBS bujónu obohaceném o 50 mg/kg HIM a inkubace probíhala při 30 °C 24 hodin. Úbytek HIM byl pozorován v rozmezí 52–100 %. Největší degradační schopnost prokázal kmen *Paenibacillus polymyxa*. Degradaci schopnost tohoto kmene byla dále sledována v závislosti na různých teplotách (4, 15, 25, 30, 37, a 45 °C), pH (pH 2–11) a koncentraci soli (0,5; 5; 10; 15 a 20 %). Největší aktivita histamindehydrogenázy (1,15 U/mg) byla sledována při teplotě 30 °C a následně při teplotě 37 °C. Funkce enzymu byla zcela inhibována při 4 a 45 °C. Optimální funkce enzymu při 30 °C byla pozorována v rozmezí pH 5–10, největší degradační schopnost pak při pH 7. Největší aktivita histamindehydrogenázy (1,16 U/mg) byla sledována při koncentraci soli 0,5 % a 5 %.

### 1.5.3 Využití protektivní kultur a jejich antimikrobiálních látek ke snížení tvorby BA

V současné době stále více spotřebitelů preferuje „přirozené potraviny“, zdravotně nezávadné, minimálně zpracované, s minimem nebo úplně bez přídavných látek. Proto řada výrobců potravin opouští od zavedených technologických postupů a hledá alternativní řešení, aby těmto požadavkům vyhověla. Jednou z vhodných alternativ může být bioprezervace potravin (Corsetti et al., 2014). Bioprezervace je způsob konzervace potravin, kdy údržnost potravin je zajištěna aplikací protektivních kultur nebo jejich metabolitů, které inhibují růst nežádoucích mikroorganismů (Reis et al., 2012). Obzvláště perspektivní se pak jeví aplikace bakterií mléčného kvašení a jejich metabolitů

(zejména pak bakteriociny). Vzhledem k jejich dlouhé historii využívání v potravinářských produktech si řada BMK nese status GRAS (obecně považováno za bezpečné). Disponují širokou škálou antimikrobiálních látek, které je možné rozdělit do dvou hlavních skupin: látky s molekulovou hmotností <1000 Da a látky s molekulou hmotností > 1000 Da (Šuškovíc et al., 2010).

### ***Antimikrobiální látky s molekulovou hmotností nižší než 1000 Da***

#### **Organické kyseliny**

Organické kyseliny (zejména mléčná a octová) jsou hlavními produkty fermentace hexóz bakteriemi mléčného kvašení. Homofermentativní BMK při fermentaci hexóz tvoří ekvimolární množství kyseliny mléčné. Naproti tomu heterofermentativní BMK tvoří vedle kyseliny mléčné další konečné produkty. Nejčastěji to bývá kyselina octová, ethanol a oxid uhličitý (Jeevaratnam et al., 2005).

V nedisociované formě mohou organické kyseliny snadněji procházet skrz lipidovou dvojvrstvu v buněčné membráně. V cytoplazmě následně dochází k jejich disociaci a uvolnění vodíkového protonu. Dochází tak k jejímu okyselování a posléze i k narušení protonmotivní síly (Šuškovíc et al., 2010).

#### **Oxid uhličitý**

Oxid uhličitý vzniká jako vedlejší produkt při fermentaci cukrů heterofermentativními bakteriemi mléčného kvašení. Antimikrobiální působení CO<sub>2</sub> spočívá především ve vytváření anaerobního prostředí náhradou molekulárního kyslíku. Také se může ukládat ve fosfolipidové dvojvrstvě, a tím ovlivnit propustnost membrány (Šuškovíc et al., 2010).

#### **Peroxid vodíku**

BMK mohou za přítomnosti kyslíku a za katalýzy flavinových enzymů produkovat peroxid vodíku (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Může také vznikat ze superoxidového radikálu za přítomnosti enzymu superoxid-dizmutázy. Tento enzym je přítomný u mnoha bakterií mléčného kvašení, zejména pak u bakterií rodu *Lactococcus* (Kimoto-Nira et al., 2014).

Mikrobicidní účinek H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> spočívá především v peroxidaci membránových lipidů, a tím i ve zvýšení membránové permeability. Rovněž je součástí ochranného laktoperoxidázového systému v čerstvém mléku. Tento systém je složen ze tří synergicky působících složek, a to z peroxidu vodíku, laktoperoxidázy a thiokyanátu. Mechanismus účinku spočívá v tom, že laktoperoxidáza v přítomnosti H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oxiduje thiokyanát na hypothiokyanát. Baktericidní účinek této látky spočívá zejména v inhibici glyceraldehid-3-fosfátdehydrogenázy, enzymu zúčastňujícího se glykolýzy (Sisecioglu et al., 2010).

## Diacetyl

Diacetyl je látka zodpovědná za charakteristické aroma másla a je produkován některými kmeny rodu *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus* a *Pediococcus* (Caplice a Fitzgerald, 1999). Obecně je známo, že vůči této látce jsou více citlivé gramnegativní než grampozitivní bakterie. Možným vysvětlením může být zjištění, že u gramnegativních bakterií diacetyl inhibuje příjem argininu, díky schopnosti navázat se na jeho vazebné místo na proteinovém přenašeči (Corsetti et al., 2014).

### *Antimikrobiální látky s molekulovou hmotností vyšší než 1000 Da*

Do této skupiny řadíme širokou škálu ribozomálně syntetizovaných extracelulárně uvolněných látek peptidové nebo proteinové povahy nazývaných bakteriociny. Bakteriociny produkované bakteriemi mléčného kvašení jsou kationické amfifilní molekuly obsahující 20 až 60 aminokyselinových zbytků (Chen a Hoover, 2003; Barbosa et al., 2018). Tyto bakteriociny jsou termostabilní a svoji aktivitu si uchovávají i v širokém rozsahu hodnot pH. Jsou bezbarvé, bez zápachu, bez chuti, a navíc jsou dobře stravitelné v trávicím traktu, a tak nenarušují složení střevní mikroflóry (Perez et al., 2014).

Obecně je uznávána klasifikace bakteriocinů do 3 nebo 4 tříd (Klaenhammer, 1993, Chen a Hoover, 2003):

- Třída I – malé membránově aktivní peptidy (<5 kDa).
- Třída II – malé membránově aktivní peptidy, které neobsahují lanthionin (<10 kDa); rozdělení do 3 podtříd (IIa, IIb a IIc).
- Třída III – vysokomolekulární bakteriociny (<30 kDa) včetně bakteriolytických extracelulárních enzymů.
- Třída IV – komplexní bakteriociny.

Nicméně v současné době s objevem nových bakteriocinů a nových poznatků o jejich struktuře a funkci je snaha o reklasifikaci tohoto rozdělení. Nejradikálnější dělení navrhl Cotter et al. (2005). Podle tohoto autora by měly být bakteriociny grampozitivních bakterií rozděleny do 2 tříd (na lanthibiotika a nelanthibiotika) a bakteriolytické enzymy by měly tvořit samostatnou skupinu. Čtvrtá třída je zcela vypuštěna z důvodu absence zástupců.

Dále budou podrobněji popsány pouze Třídy I a II, do kterých patří většina bakteriocinů BMK. Třída I zahrnuje malé termostabilní peptidy (<5 kDa), které v důsledku posttranslačních úprav obsahují neobvyklé aminokyseliny (AMK), jako jsou dehydroalanin, dehydrobutyrin, lanthionin a  $\beta$ -methyllanthionin. Proto se také nazývají lantibiotika (Balciunas et al., 2013). Lantibiotika se dále dělí na dvě skupiny podle jejich struktury a způsobu účinku. Lantibiotika typu A jsou flexibilní, lineární, amfipatické molekuly, jejichž činnost je založena na působení na cytoplazmatickou membránu. Jedním z nejznámějších zástupců je bezesporu nisin (Parada et al., 2007). Z dalších zástupců je to například laktocin S (*Latilactobacillus sakei*) nebo lakticin 481 (*Lactococcus lactis*). Lantibiotika typu

B mají neohebnou globulární strukturu a inhibují pomocí specifických enzymů, které vytváří komplexy s membránou (Chen a Hoover, 2003).

Do třídy II jsou řazeny termostabilní peptidy (<10 kDa), u kterých však nedochází k posttranslačním úpravám, a proto neobsahují lanthionin (nelantibiotika). Tato třída je dále dělena do 5 podtříd (Nes et al., 2007). Zástupci první podtřídy IIa jsou peptidy podobné pediocinu PA-1 (*Pediococcus acidilactici*), který byl také prvním charakterizovaným bakteriocinem této podtřídy. V současnosti přitahují velkou pozornost díky antagonistickému působení vůči listeriím. Mimo něj sem patří např. sakaciny A a P (*Lactilactobacillus sakei*) a entorocin A (*Enterococcus faecium*). Podtřída IIb je tvořena bakteriociny složenými ze dvou různých peptidů. Dvoupeptidové bakteriociny vyžadují oba peptidy k plné aktivitě. Příkladem takových bakteriocinů jsou například lactococcin G (*Lactococcus lactis*) a plantaricin EF (*Lactiplantibacillus plantarum*). Do třetí podtřídy IIc jsou řazeny tzv. „leaderless“ bakteriociny. Poprvé byly identifikovány jako hemolytické peptidy u některých zástupců rodu *Streptococcus* a *Staphylococcus*. Čtvrtou podtřídou IId tvoří peptidy, které vznikají degradací proteinů. Jeden z nejlépe prostudovaných zástupců je propionicin F (*Propionibacterium freudenreichii*). Poslední podtřída IIe obsahuje rozličnou řadu bakteriocinů, které nebyly zařazeny do předcházejících 4 podtříd. Do této skupiny patří např. acidocin B (*Lactobacillus acidophilus*; Nes et al., 2007; Perez et al., 2014).

## Nisin

Nisin (nisin A) je nízkomolekulární polypeptid tvořený 34 aminokyselinovými zbytky. Obsahuje 5 cyklických struktur: jeden lanthionový a čtyři  $\beta$ -methyllanthionové kruhy. Tyto cyklické struktury zapůjčují nisinu strukturu podobnou šroubovici, která má amfipatický charakter (Bemena et al., 2014). Do současné doby bylo izolováno a identifikováno 9 přirozených variant nisinu. První byla identifikována varianta A z kmene *Lactococcus lactis*, dále nisin Z (*Lc. lactis* NIZO 22186), nisin F (*Lc. lactis* F10), nisin Q (*Lc. lactis* 61-14), nisin O<sub>1</sub>–O<sub>4</sub> (*Blautia obeum* A2-162), nisin U a U12 (*Streptococcus uberis* 42 a D536), nisin P (*Streptococcus gallolyticus* subsp. *pasteurianus*), nisin J (*Staphylococcus capitis*) a nisin H (*Streptococcus hyointestinalis*) (Reiners et al., 2020).

V současnosti je nisin jediný bakteriocin grampozitivních bakterií, který byl schválený Evropským úřadem pro bezpečnost potravin, Světovou zdravotnickou organizací (WHO) a Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv ve Spojených státech (FDA) pro využití v potravinářství jako konzervační látka E 234 (EFSA, 2017). Producentem tohoto bakteriocinu je především *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, který se běžně vyskytuje v mléku a mléčných výrobcích. Je proto pro člověka zcela netoxický a potraviny obsahující nisin, mohou nést označení „konzervováno přirozenou cestou“ (Cleveland et al., 2001). Nisin disponuje širokým spektrem působení proti grampozitivním bakteriím (*Lactococcus* sp., *Lactobacillus* sp.,

*Leuconostoc* sp., *Staphylococcus* sp., *Micrococcus* sp. a *Listeria* sp.). Rovněž účinně inhibuje růst sporotvorných bakterií rodu *Bacillus* a *Clostridium*, přičemž spory těchto bakterií jsou na nisin citlivější než jejich vegetativní formy. Naopak proti gramnegativním bakteriím, kvasinkám a plísním je nisin za běžných podmínek neúčinný (Chen a Hoover, 2003).

Do potravin je doporučováno přidávat nisin ve formě komerčního přípravku Nisaplin. Tento preparát byl vynalezen společností Aplin & Barrett (nyní Danisco) mezi léty 1962 až 1965. Obsahuje 2,5 % nisinu A, zbytek tvoří sůl a odtučněné sušené mléko (Thomas et al., 2000; EFSA, 2006). V Tab. 1 je uveden přehled některých potravin, kde je přidáván nisin v podobě tohoto komerčního přípravku k inhibici určitých typů mikroorganismů.

Tab. 1 – Výčet některých potravin, kde se využívá nisin (komerční přípravek Nisaplin) k bioprezervaci (Thomas et al., 2000)

Potravina	Nisaplin [mg/kg, mg/l]	Cílový mikroorganismus
Tavený sýr	100–600	<i>Bacillus</i> sp., <i>Clostridium</i> sp.
Mléko a mléčné produkty	10–50	<i>Bacillus</i> ( <i>B. sporothermodurans</i> )
Tekuté vaječné produkty	5–200	<i>Bacillus</i> ( <i>B. cereus</i> )
Pasterizované polévky	100–250	<i>Bacillus</i> sp.
Lívance	150–250	<i>B. cereus</i>
Ovocné džusy	30–60	<i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i> ,
Konzervované potraviny	100–200	<i>B. stearothermophilus</i> , <i>Cl. thermosaccharolyticum</i> , <i>Cl. botulinum</i>
Dresinky a omáčky	50–200	Bakterie mléčného kvašení, <i>Bacillus</i> sp., <i>Clostridium</i> sp.
Frankfurtské párky a Boloňský salám	200–400	Bakterie mléčného kvašení, <i>Brochothrix thermosphacta</i> , <i>Listeria monocytogenes</i>
Ricotta	100–200	<i>L. monocytogenes</i>

V Evropské unii je použití nisinu jako konzervační látky regulováno Nařízením komise (EC) č. 1129/2011 o potravinářských přídatných látkách a je povolený při výrobě následujících potravin:

- Kysaná smetana (max. limit: 10 mg/kg nebo mg/l).
- Mascarpone (max. limit: 10 mg/kg nebo mg/l).
- Tavené a zrající sýry (max. limit: 12,5 mg/kg nebo mg/l).
- Pasterizovaná tekutá vaječná melanz (max. limit: 6,25 mg/kg nebo mg/l).

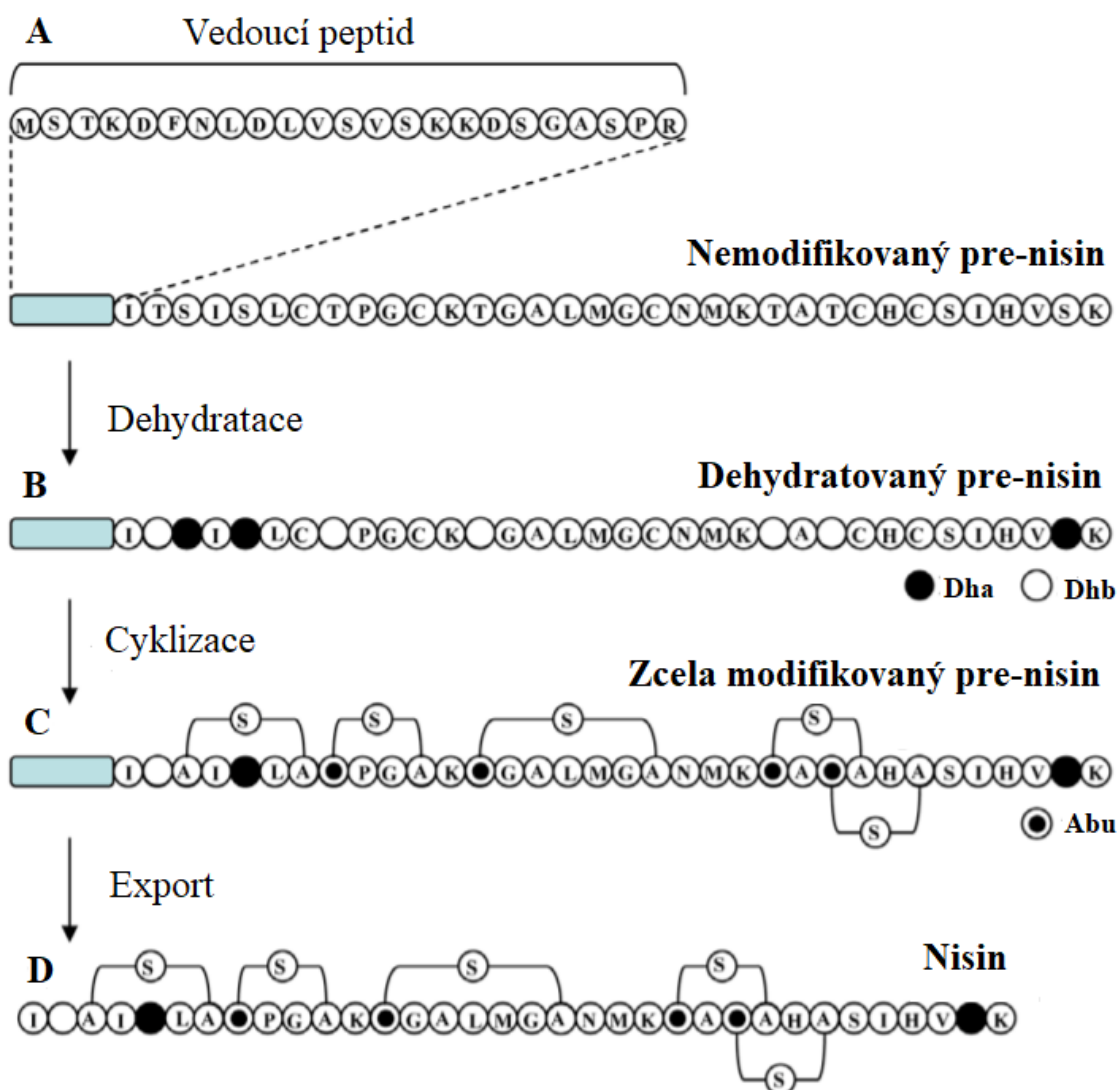
- Pudingy ze semoliny a topioky a podobné produkty (max. limit: 3 mg/kg nebo mg/l).

### **Biosyntéza nisinu**

Bakteriociny jsou syntetizovány na ribozomech jako neaktivní prepeptidy, které jsou transportovány na povrch buňky v průběhu exponenciální nebo začátkem stacionární fáze růstu buňky. Na povrchu buňky jsou následně enzymaticky přeměněny na jejich aktivní formy. Biosyntéza bakteriocinu je kódována obvykle osmi až dvanácti geny, v případě nisinu je to pak jedenáct genů organizovaných ve 4 operonech: *nisABTCIPRK*, *nisI*, *nisRK* a *nisFEG* (Balciunas et al., 2013; Suzuki a Suzuki, 2021).

Biosyntéza nisinu začíná tvorbou prepeptidu, složeného z 57 aminokyselinových zbytků, kódovaného strukturním genem *nisA*. Tento prepeptid se skládá z N-koncového vedoucího peptidu o délce 23 AMK a C-koncového propeptidu (Obr. 2A). Propeptid následně prochází posttranslačními úpravami. Nejprve dochází k dehydrataci serinu a threoninu za vzniku dehydroalaninu a dehydrobutyru (gen *nisB*, Obr. 2B). Následně dochází k tvorbě thioetherových můstků mezi alaninem a aminomáselnou kyselinou za vzniku čtyř  $\beta$ -methyllanthionových kruhů a mezi 2 molekulami alaninu za vzniku lanthionového kruhu (gen *nisC*, Obr. 2C). Po modifikačních úpravách následuje transport prepeptidu pomocí ABC transportéru (gen *nisT*) do extracelulárního prostoru, kde pomocí proteázy (gen *nisP*) je odštěpen vedoucí peptid z prepeptidu za uvolnění aktivní formy nisinu (Obr. 2D). Buňka se před účinky nisinu chrání „obranným systémem“ složeného z ABC-transportéru (gen *nisFEG*) a lipoproteinu *nisI*, který se pravděpodobně nachází vně membrány a brání vytvoření póru na cytoplazmatické membráně (Chen a Hoover, 2003; Šušková et al., 2010; Punyaappa-path a Phumkhachorn, 2015).

Biosyntéza nisinu a mnoha lantibiotik je regulována quorum-sensing systémem, který se skládá z histidin-kinázy (*nisK*), regulátoru (*nisR*) a samotného antimikrobiálního peptidu ve funkci autoinduktora. Nisin sám o sobě působí jako feromon, který iniciuje autofosforylaci histidin-kinázy. Uvolněná fosfátová skupina se pak váže na regulátor *nisR*, a tím se aktivuje transkripce dalšího prepeptidu (Cheigh a Pyun, 2005; Dischinger et al., 2014; Abdolahi et al., 2018).

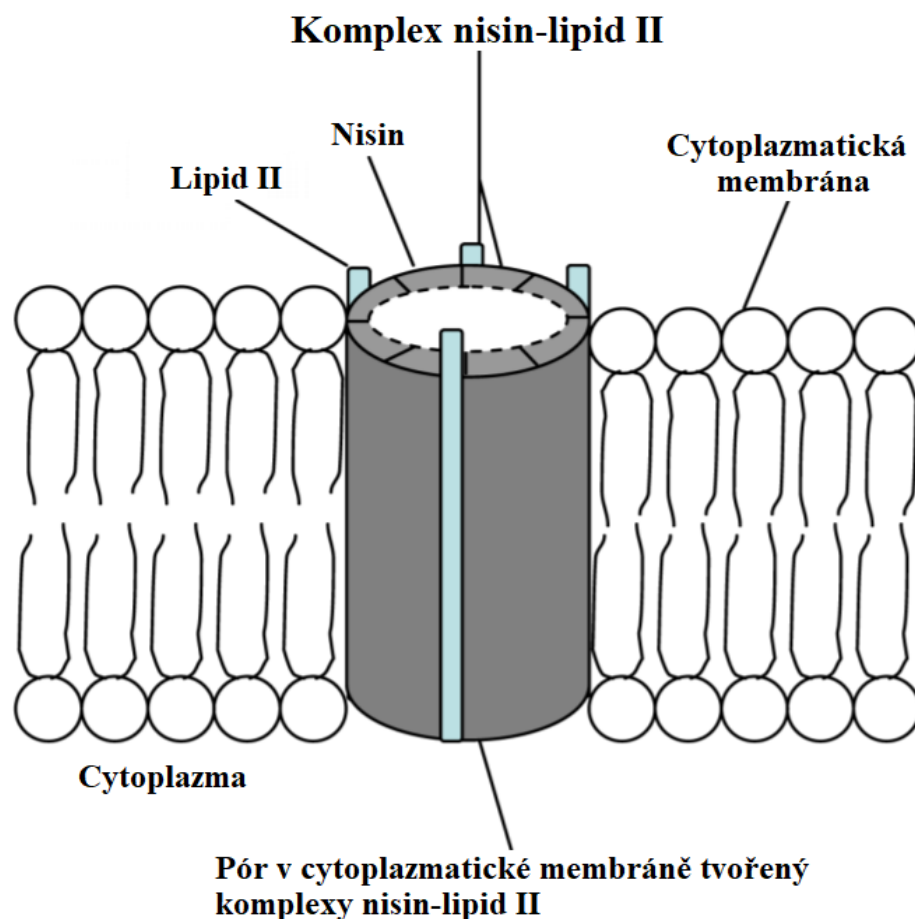


Obr. 2: Biosyntéza nisinu. Dha – dehydroalanin, Dhb – dehydrobutyryn, Abu – aminomáselná kyselina, A – alanin, S – thioetherový můstek (upraveno dle Punyauppa-path a Phumkhachorn, 2015)

### Mechanismus působení nisinu

Primárním cílem nisinu a taktéž většiny bakteriocinů je cytoplazmatická membrána buněk, kde narušují protonmotivní sílu (proton motive force – PMF) tvorbou pórů nebo kanálků. K počáteční interakci mezi nisinem a buněčnou membránou dochází za pomoci lipidu II, který slouží jako „dokovací“ molekula (Hasper et al., 2004; Punyauppa-path a Phumkhachorn, 2015). Pro počáteční vazbu jsou nezbytně nutné elektrostatické interakce mezi kladně nabitým nisinem a záporně nabitou bakteriální membránou. Bylo navrženo, že póry jsou tvořeny osmi molekulami nisinu a 4 molekulami lipidů II (viz Obr. 3). Tvorba pórů o velikosti 2 – 2,5 nm vede k pasivnímu odtoku tzv. malých molekul (ionty draslíku, hořčíku a fosforu, aminokyseliny a molekuly ATP) z buňky. Zhroutení PMF vede ke smrti buňky v důsledku zastavení všech biosyntetických procesů a vyčerpání ATP (Bemena et al., 2014; Dishinger et al., 2014).





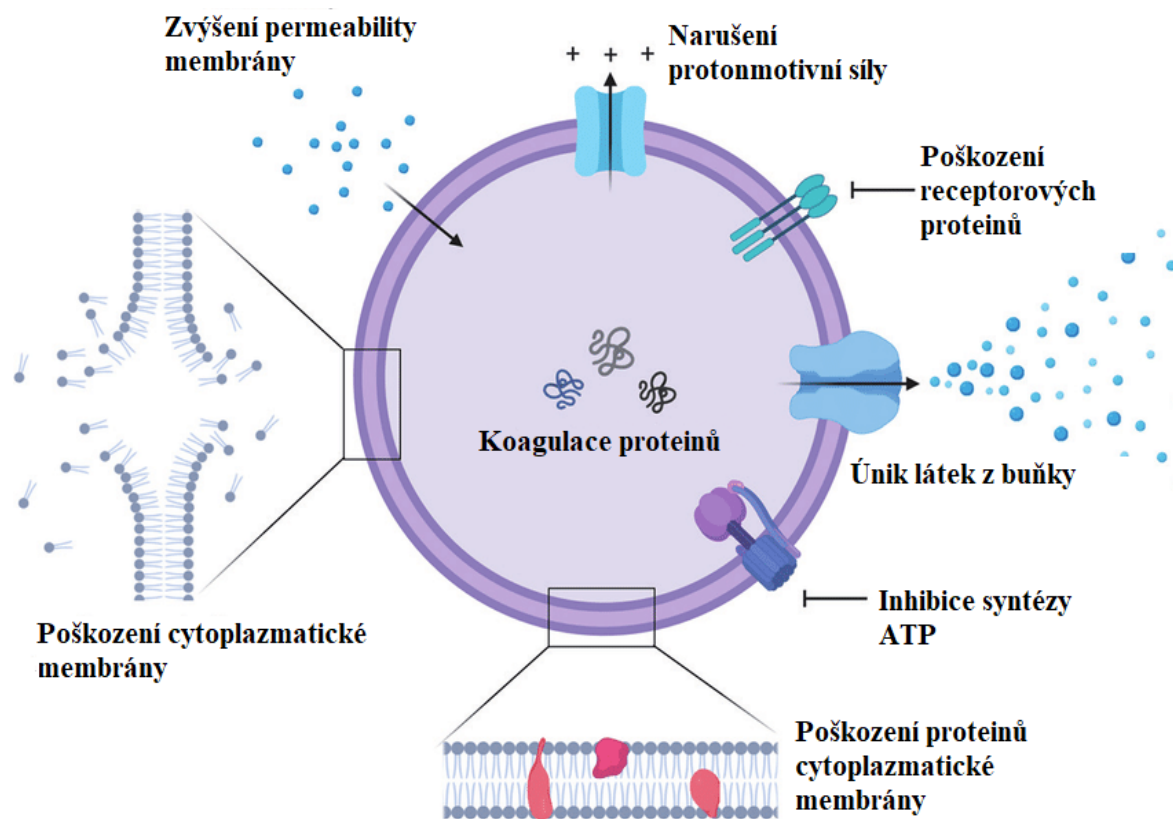
Obr. 3: Znárodnění vzniku póru v buněčné membráně interakcí nisinu s lipidem II (upraveno dle Punyauppa-path a Phumkhachorn, 2015)

#### 1.5.4 Využití rostlinných antimikrobiálních látek ke snížení BA

Rostlinné oleje a výtažky z listů, květů, pupat nebo jiných částí rostlin jsou zdrojem různých látek, které mohou mít antimikrobiální účinek. Podle chemické struktury se tyto sekundární metabolity rostlin mohou dělit na různé skupiny např. alkaloidy, fenoly a polyfenoly, terpeny, chinony, flavonoidy a isoflavonoidy, aldehydy a ketony (Hintz et al., 2015). V současnosti se tyto látky dostávají do popředí zájmu pro jejich možnou aplikaci do potravin jako přírodní konzervační látky. Nejperspektivnější skupinou látek jsou esenciální oleje, někdy též nazývané jako silice. Esenciální oleje jsou složeny ze směsi nestálých, těkavých sloučenin především isoprenové povahy. Jsou nositeli charakteristické vůně a chuti, které se mění v závislosti na chemickém složení esenciálního oleje. Vykazují různou antimikrobiální aktivitu (Obr. 4; Guil-Guerrero et al., 2016).

Obecně se předpokládá, že hydrofobicita esenciálních olejů jim umožňuje interagovat s lipofilní částí lipoteichoové kyseliny a penetrovat dovnitř buňky, kde mohou narušovat funkce enzymů a koagulovat cytoplazmu. Navíc

permeabilizují buněčnou membránu a dochází tak k odtoku esenciálních látek z buňky. Tyto děje pak nakonec vedou k buněčné lýzi (Calo et al., 2015; Falleh et al., 2020). Esenciální oleje bohaté na fenolové sloučeniny, jako jsou thymol, karvakrol nebo eugenol, obecně vykazují vyšší antibakteriální účinky proti potravinovým patogenům (Hintz et al., 2015, Falleh et al., 2020).



Obr. 4: Obecný mechanismus antimikrobiálního působení esenciálních olejů (upraveno dle Alves Carneiro et al., 2020)

V poslední době řada studií poukazuje na možné využití esenciálních olejů k redukci biogenních aminů v potravinách, zejména u produktů rybolovu (Cai et al., 2015; Huang et al., 2017; Křížek et al., 2018). Maso ryb a vodních živočichů se může velmi rychle po ulovení kazit v důsledku namnožení patogenních bakterií, které navíc mohou v těchto produktech produkovat biogenní aminy. Jak již bylo řečeno v kapitole 1.3.1 u produktů rybolovu je vysoké riziko otravy histaminem.

Aplikace éterických olejů z máty peprné, hřebíčku a římského kmínu na filé bubeníku amerického (*Sciaenops ocellatus*) nejenže zachovala organoleptické vlastnosti rybího masa během skladování, ale také snížila mikrobiální počty a obsah histaminu, putrescinu a kadaverinu (Cai et al., 2015). Použití esenciálního oleje ze skořicové kůry na filety z amura bílého (*Ctenopharyngodon idella*) také vedlo ke zlepšení sensorické kvality a snížení akumulace kadaverinu a putrescinu v této surovině během skladování při 4 °C (Huang et al., 2017). Křížek et al. (2018) studovali tvorbu biogenních aminů ve vakuově balených filetech z kapra obecného (*Cyprinus carpio*) ošetřených dvěma éterickými oleji, z tymiánu

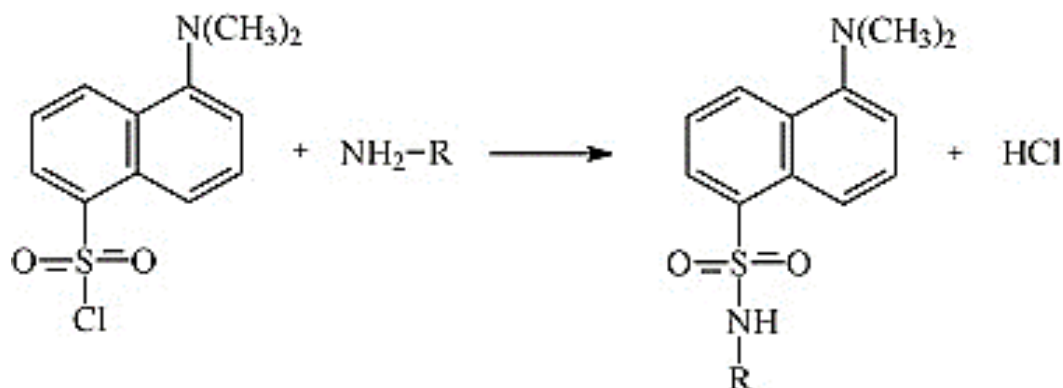
a oregana. Zjistili, že tyto oleje účinně potlačují tvorbu kadaverinu, tyraminu a putrescinu. Použití těchto olejů také prodloužilo trvanlivost filetů o víc než 20 dní. V kontrolních vzorcích byly pozorovány první známky kažení již 9. den skladování při teplotě 4 °C. U filetů ošetřených olejem z tymiánu byly detekovány známky kažení až 35. den skladování a u filetů ošetřených olejem z oregana až 42. den skladování.

Stabilita těchto látek s antimikrobiálními vlastnostmi může být ovlivněna řadou faktorů (teplota, aktivita vody, světlo, složení potravin atd.), a tudíž může snadno docházet k jejich degradaci. Někteří autoři proto doporučují ke zvýšení stability éterických olejů použít technologii mikroenkapsulace. Tato metoda zabraňuje oxidaci esenciálních olejů, nechtěné interakci se složkami potravin a zvyšuje odolnost vůči vyšším teplotám. Dále umožňuje kontrolované uvolňování esenciálního oleje a tím zvyšuje jejich účinnost (Enascuta et al., 2018)

## 1.6 Metody stanovení BA

K detekci BA lze využít řadu analytických metod, především metody chromatografické (vysoce účinná kapalinová chromatografie – HPLC, tenkovrstvá chromatografie – TLC, plynová chromatografie – GC a iontově-výměnná chromatografie – IEC). V praxi nejpoužívanější je metoda HPLC s fluorescenční nebo UV/VIS detekcí (Ordóñez et al., 2016; Ahmad et al., 2020). Stanovení BA v potravinách touto technikou obvykle začíná homogenizací vzorku. Následuje extrakce BA, většinou kyselinou chloristou či trichloroctovou. Po filtraci, respektive centrifugaci, je alikvotní podíl kyselého extraktu zalkalizován. V tomto prostředí BA pak reagují s derivatizačním činidlem. Vzniklé deriváty jsou extrahovány do vhodného organického rozpouštědla a děleny na reverzní fázi HPLC (Křížek a Hlavatá, 1995). Derivatizační krok se provádí z důvodu nedostatku chromoforů v molekule těchto sloučenin. Je možné využít buď předkolonovou nebo postkolonovou derivatizaci za využití vhodných činidel. Při předkolonové derivatizaci probíhají derivatizační reakce před nadávkováním analyzovaných vzorků do přístroje. Při pokolonové derivatizaci je reaktor umístěn mezi kolonu a detektor. Nejčastěji se využívá předkolonová derivatizace dansylchloridem, který reaguje s primární nebo sekundární aminoskupinou (Obr. 5). Za některých experimentálních podmínek může reagovat i s terciární aminoskupinou. Vzniklé dansyl-deriváty biogenních aminů se vyznačují dobrou stabilitou a jsou detekovatelné jak fluorescenčním, tak UV/VIS detektorem. Postkolonová derivatizace se provádí nejčastěji činidlem o-ftaldialdehyd (OPA). V poslední době se jeví jako velmi spolehlivé a vysoce citlivé chromatografické metody s elektrochemickou detekcí nebo detekcí pomocí hmotnostní spektrometrie. Tenkovrstvá chromatografie slouží pro svoji jednoduchost a instrumentální nenáročnost hlavně pro rychlé orientační stanovení

BA (Křížek a Hlavatá, 1995; Smělá et al., 2004; Hernández-Borges et al., 2007; Papageorgiou et al., 2018; Ahmad et al., 2019).

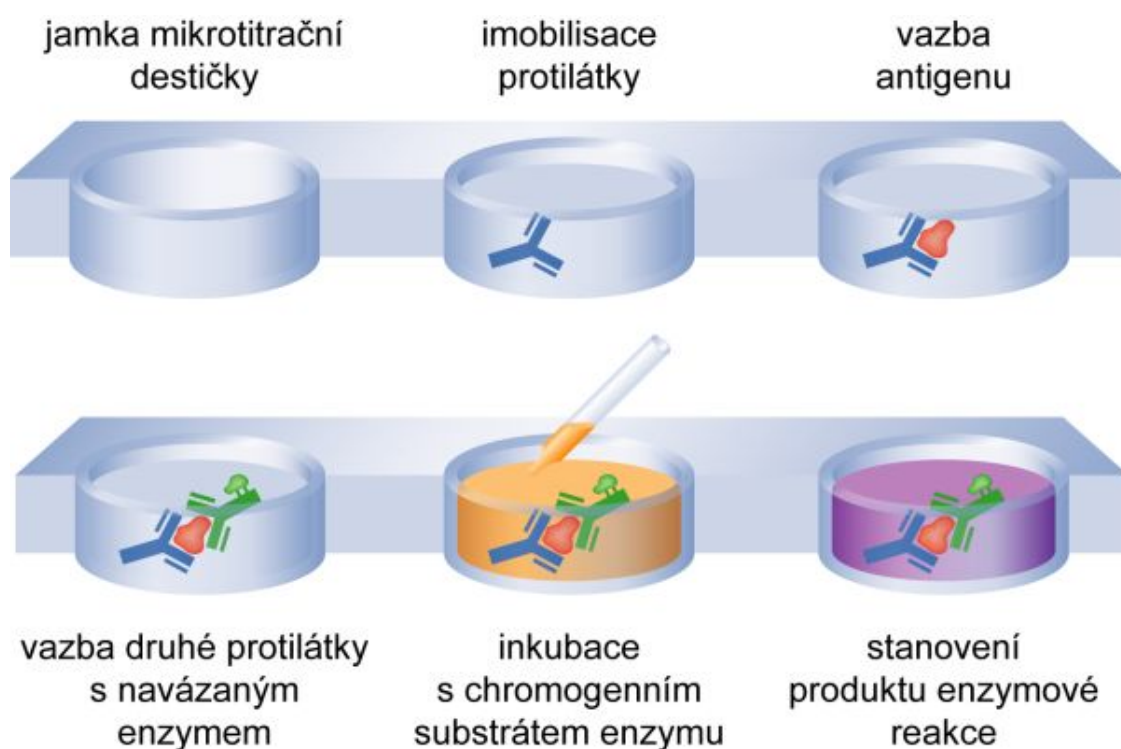


Obr. 5: Vznik dansyl-derivátu (upraveno dle Hernández-Borges et al., 2007)

Mezi další používané analytické metody patří kapilární zónová elektroforéza a ELISA (Vanda et al., 2017; Mantoanelli et al., 2020). Kapilární zónovou elektroforézu (CZE – capillary zone electrophoresis) lze řadit mezi elektromigrační separační metody. Princip této metody je založen na rozdílné migrační rychlosti elektricky nabitých částic v elektrickém poli. Separace probíhá v křemenné kapiláře, jejíž konce jsou ponořeny do elektrodových nádobek naplněných základním elektrolytem, kterým je též naplněna kapilára. Na elektrody je vkládáno napětí z vysokonapěťového stejnosměrného zdroje. Složky vzorku lišící se svými pohyblivostmi se v kapiláře pohybují různými elektroforetickými rychlostmi směrem k detektoru a na tomto principu se od sebe oddělují. Kromě elektroforetického pohybu nabitých částic je celý objem roztoku uvnitř kapiláry uváděn do pohybu elektroosmotickým tokem. V křemenných kapilárách s chemicky nemodifikovaným vnitřním povrchem je tento tok orientován směrem ke katodě a jeho rychlost je většinou vyšší než rychlost elektroforetická, takže výsledná rychlost pohybu kationtů i aniontů má stejný směr. Anionty i kationty mohou být stanovovány současně v průběhu jednoho experimentu. Pohyb zón vzorku v kapiláře je nejčastěji sledován pomocí UV/VIS detektoru. Ze získaného záznamu časového průběhu absorpce, tzv. elektroforegramu, může být získána kvalitativní a kvantitativní informace o složení analyzovaného vzorku. Kvalita daného analytu je dána migračním časem jeho píku a kvantita tohoto analytu je přímo úměrná ploše jeho píku (Kašička, 1997).

ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) je analytická metoda využívaná ke kvantitativnímu stanovení různých antigenů. Metoda má řadu modifikací, avšak všechny jsou založeny na vysoce specifické interakci antigenu a protilátky, přičemž na jednoho z těchto partnerů je kovalentně navázán enzym (Obr. 6). Tento enzym katalyzuje chemickou přeměnu substrátu na produkt, který je barevný (stanovuje se spektrofotometricky) nebo fluoreskující (fluorimetrické stanovení). Koncentrace produktu je úměrná koncentraci antigenu nebo protilátky

ve vzorku (Kodíček, 2004). Tato metoda poskytuje vysokou citlivost a přesnost. Na druhou stranu může být časově náročná a pro stanovení malého počtu vzorků může být finančně nákladná. V současné době jsou dostupné pouze ELISA kity pro stanovení histaminu (Kim et al., 2011; Dole et al., 2017; Vanda et al., 2017).



Obr. 6 – Princip ELISA (převzato z Kodíček, 2004)

Metody mikrobiologické jsou založené na kultivaci mikroorganismu v dekarboxylačním médiu obsahujícím příslušnou aminokyselinu a pH indikátor (většinou bromkresolová purpur). Pokud dojde k dekarboxylaci aminokyseliny za tvorby příslušné BA, dochází k alkalizaci média a změně barvy média ze žluté na fialovou. Naopak při negativní reakci se barva média nemění. Výhodami těchto metod je nenáročnost a rychlost provedení. Nevýhodou pak mohou být falešně pozitivní výsledky z důvodu tvorby jiných produktů s alkalickou reakcí než BA. Za další možnou nevýhodu těchto metod může být považována neschopnost zachytit malé množství produkovaných BA. Proto je doporučováno použití této metody v kombinaci například s chromatografickými metodami (Buňková et al., 2010b; Espinosa-Pesqueira et al., 2018).

K přesnější detekci mikroorganismů schopných tvorby BA lze využít metodu polymerázové řetězové reakce (PCR). Tato molekulárně biologická metoda umožňuje včasné odhalení potenciálních producentů biogenních aminů detekcí genů kódujících příslušný mikrobiální enzym účastní se jejich tvorby (Landete et al., 2011; Wunderlichová et al., 2013). Včasnou detekcí těchto mikroorganismů lze zvolit předcházet tvorbě a akumulaci biogenních aminů v potravinách.

## 2. CÍLE PRÁCE

Cílem disertační práce bylo studium vlivu vybraných protektivních kultur a jejich metabolitů s antimikrobiálními účinky na produkci tyraminu u kmenů izolovaných z potravin s významnou tyrozin-dekarboxylázovou aktivitou.

Dílčí cíle byly stanoveny následovně:

1. Skríníng citlivosti vybraných dekarboxyláza-pozitivních kmenů izolovaných z potravin na metabolity protektivních kultur schopných produkce bakteriocinu.
2. Skríníng citlivosti vybraných dekarboxyláza-pozitivních kmenů izolovaných z potravin na bakteriocin nisin.
3. Monitorování kinetiky tvorby tyraminu vybranými kmeny po přidavku protektivní kultury, jejího supernatantu po kultivaci a také po přidavku čisté antimikrobní látky (nisinu) v kultivačním médiu v závislosti na zvolených faktorech prostředí:
  - kultivační teplota,
  - čas inokulace protektivní kultury,
  - čas přidavku supernatantu protektivní kultury,
  - čas přidavku nisinu.
4. Vyhodnocení výsledků a formulování závěrů.

## 3. MATERIÁL A METODIKA

### 3.1 Materiál

#### 3.1.1 Použité mikroorganismy

##### **Kmeny produkující antimikrobiální látku**

Celkem bylo testováno 22 protektivních kultur (12 kmenů *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*, 2 kmeny *Lactobacillus acidophilus*, 4 kmeny *Lactobacillus gasseri*, 3 kmeny *Lactobacillus helveticus* a 1 kmen *Enterococcus faecium*) bylo získaných ze Sbírký mlékařských mikroorganismů Laktoflora® (Cultures Collection of Dairy Microorganisms; CCDM). Seznam kmenů, podmínky jejich kultivace a antimikrobiální látky, které produkují, podává Tab. 2.

##### **Kmeny s dekarboxylázovou aktivitou**

V rámci disertační práce bylo využito celkem 103 kmenů s významnou dekarboxylázovou aktivitou, které jsou součástí sbírky Ústavu inženýrství ochrany životního prostředí, nebo byly získány od dalších institucí, z toho bylo:

- 16 kmenů enterokoků izolovaných z masa (označeny E),
- 17 kmenů stafylokoků izolovaných z ryb (označeny S),
- 19 kmenů bakterií mléčného kvašení izolovaných ze sýrů (označeny T, AI a AIV; izoláty označné T poskytl Výzkumný ústav mlékárenský, pobočka se sídlem v Táboře),
- 19 kmenů bakterií mléčného kvašení izolovaných z piva (označeny RIBM – izoláty získány ze Sbírký Výzkumného ústavu pivovarského a sladařského),
- 32 bakterií (BMK a grampozitivní koky) izolovaných z masa bažanta obecného (označeny B)

Přehled o jednotlivých kmenech s dekarboxylázovou aktivitou, o jejich původu a kultivačních podmínkách podává Tab. 3.

Tab. 2 – Seznam použitých kmenů schopných produkce antimikrobiální látky

Rod a druh	Označení kmene	Kultivační podmínky	Produkce metabolitů
<i>Enterococcus faecium</i>	CCDM 79	37 ± 1 °C, AE, MRS	BLIS
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	CCDM 79	37 ± 1 °C, AN, MRS	Acidocin C20079
<i>Lb. acidophilus</i>	CCDM 149	37 ± 1 °C, AN, MRS	BLIS
<i>Lb. gasseri</i>	CCDM 214	37 ± 1 °C, AN, MRS	BLIS
<i>Lb. gasseri</i>	CCDM 215	37 ± 1 °C, AN, MRS	BLIS
<i>Lb. gasseri</i>	CCDM 340	37 ± 1 °C, AN, MRS	BLIS
<i>Lb. gasseri</i>	CCDM 377	37 ± 1 °C, AN, MRS	BLIS
<i>Lb. helveticus</i>	CCDM 62	37 ± 1 °C, AN, MRS	BLIS
<i>Lb. helveticus</i>	CCDM 82	37 ± 1 °C, AN, MRS	BLIS
<i>Lb. helveticus</i>	CCDM 125	37 ± 1 °C, AN, MRS	BLIS
<i>Lactococcus lactis ssp. lactis</i>	CCDM 71	30 ± 1 °C, AE, M17	Nisin
<i>Lc. lactis ssp. lactis</i>	CCDM 414	30 ± 1 °C, AE, M17	Nisin
<i>Lc. lactis ssp. lactis</i>	CCDM 416	30 ± 1 °C, AE, M17	Nisin
<i>Lc. lactis ssp. lactis</i>	CCDM 418	30 ± 1 °C, AE, M17	Nisin
<i>Lc. lactis ssp. lactis</i>	CCDM 671	30 ± 1 °C, AE, M17	Nisin
<i>Lc. lactis ssp. lactis</i>	CCDM 702	30 ± 1 °C, AE, M17	Nisin
<i>Lc. lactis ssp. lactis</i>	CCDM 731	30 ± 1 °C, AE, M17	Nisin
<i>Lc. lactis biovar. diacetylactis</i>	CCDM 670	30 ± 1 °C, AE, M17	Nisin
<i>Lc. lactis biovar. diacetylactis</i>	CCDM 686	30 ± 1 °C, AE, M17	Nisin
<i>Lc. lactis biovar. diacetylactis</i>	CCDM 689	30 ± 1 °C, AE, M17	Nisin
<i>Lc. lactis biovar. diacetylactis</i>	CCDM 695	30 ± 1 °C, AE, M17	Nisin
<i>Lc. lactis biovar. diacetylactis</i>	CCDM 698	30 ± 1 °C, AE, M17	Nisin

Kde: AN – anaerobní kultivace, AE – aerobní kultivace;  
MRS – de Man, Rogosa and Sharpe agar nebo bujón;  
BLIS – látky podobné bakteriocinům.



Tab. 3 – Použité dekarboxyláza-pozitivní mikroorganismy

Rod a druh	Označení kmene	Původ	Kultivační podmínky
<i>Levilactobacillus brevis</i>	T24	Sýry	
<i>L. brevis</i>	RIBM: 16, 20, 33, 50, 62, 67, 68, 69, 70, 72, 78, 93, 98, 101, 111	Pivo	
<i>L. brevis</i>	B125	Maso bažanta	
<i>Latilactobacillus curvatus</i>	T: 2, 3, 8, 15, 36, 37, 41, AI-3	Sýry	37 ± 1 °C, AN, MRS
<i>Latilactobacillus sakei</i>	B103	Maso bažanta	
<i>Lacticaseibacillus casei/paracasei</i>	AIV-11, AIV-13	Sýry	
<i>Lc. casei/paracasei</i>	RIBM 113	Pivo	
<i>Lc. paracasei</i>	T: 50, 51, 52	Sýry	
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	AI-7	Sýry	37 ± 1 °C, AN, MRS
<i>Lac. plantarum</i>	RIBM: 89, 94, 96	Pivo	
<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>	T63	Sýry	30 ± 1 °C, AE, M17
<i>Leuc. mesenteroides</i>	B:170, 171	Maso bažanta	
<i>Streptococcus salivarius</i>	B:149, 150	Maso bažanta	37 ± 1 °C, AE, M17
<i>Enterococcus sp.</i>	T: 19, 20	Sýry	
<i>Enterococcus sp.</i>	E: 15, 16, 18, 21, 26, 28, 30	Maso králíka	
<i>E. durans</i>	B:151–154,160, 169	Maso bažanta	
<i>E. faecalis</i>	T43	Sýry	
<i>E. faecalis</i>	B:131, 142	Maso bažanta	30 ± 1 °C, AE, M17
<i>E. faecium</i>	B:129, 133, 143–145	Maso bažanta	
<i>E. faecium</i>	E: 2, 5, 8, 11, 13, 14,17, 25, 27	Maso králíka	
<i>E. hirae</i>	B:76, 122, 124, 147	Maso bažanta	
<i>Staphylococcus epidermis</i>	B: 40,136, 137	Maso bažanta	
<i>Staph. epidermidis</i>	S8	Pstruh potoční	
<i>Staph. haemolyticus</i>	S: 9, 10, 11, 12	Pstruh potoční	
<i>Staph. hominis</i>	B138	Maso bažanta	37 ± 1 °C, AE, MPB, MHA
<i>Staph. hominis</i>	S: 5, 6, 7	Pstruh potoční	
<i>Staph. pasteurii</i>	S: 4, 14	Pstruh potoční	
<i>Staph. succinus</i>	B: 47, 77, 80, 89	Maso bažanta	
<i>Staph. warneri</i>	S: 1, 2, 3, 13, 15,16,17	Pstruh potoční	
<i>Staph. warneri</i>	B125	Maso bažanta	

Kde: AN – anaerobní kultivace, AE – aerobní kultivace; MRS – de Man, Rogosa and Sharpe agar nebo bujón; MPB – maso-peptonový bujón, MHA – Mueller-Hinton agar.

### 3.1.2 Použité kultivační média a roztoky

#### Masopeptonový bujón (MPB)

Nutrient broth (HiMedia, Indie) ..... 13 g

Destilovaná voda ..... 1000 ml

pH = 7,4 ± 0,2 při teplotě 25 °C

Příslušné množství média bylo rozpuštěno v požadovaném objemu destilované vody. Poté byl bujón rozplněn do alikvotů a sterilizován v autoklávu (121 °C, 20 minut).

#### MRS bujón (De Man, Rogosa and Sharpe)

MRS broth (Merck, Německo) ..... 52,2 g

Destilovaná voda ..... 1000 ml

pH = 5,7 ± 0,2 při teplotě 25 °C

Příslušné množství média bylo rozpuštěno v požadovaném objemu destilované vody. Poté byl bujón rozplněn do alikvotů a sterilizován v autoklávu (121 °C, 20 minut).

#### Modifikovaný MRS bujón (MRS+)

MRS broth (Merck, Německo) ..... 52,2 g

L-tyrozin (Merck, Německo) ..... 3 g

Destilovaná voda ..... 1000 ml

pH = 5,7 ± 0,2 při teplotě 25 °C

Příslušné množství média a L-tyrozinu bylo rozpuštěno v požadovaném objemu destilované vody. Poté byl bujón rozplněn do alikvotů a sterilizován v autoklávu (121 °C, 20 minut).

#### MRS agar

MRS broth (Merck, Německo) ..... 52,2 g

Agar (HiMedia, Indie) ..... 20 g

Destilovaná voda ..... 1000 ml

Příslušné množství média a agaru bylo rozpuštěno v požadovaném objemu destilované vody a následně bylo živné médium sterilizováno v autoklávu (121 °C, 20 minut).

### **M17 bujón**

M17 broth (Merck, Německo) ..... 42,5 g

Destilovaná voda ..... 1000 ml

pH= 7,2 ± 0,2 při teplotě 25 °C

Příslušné množství média bylo rozpuštěno v požadovaném objemu destilované vody. Poté byl bujón rozplněn do alikvotů a sterilizován v autoklávu (121 °C, 20 minut).

### **M17 agar**

M17 broth (Merck, Německo) ..... 52,2 g

Agar (HiMedia) ..... 20 g

Destilovaná voda ..... 1000 ml

Příslušné množství média a agaru bylo rozpuštěno v požadovaném objemu destilované vody a následně bylo živné médium sterilizováno v autoklávu (121 °C, 20 minut).

### **Müller-Hinton agar (MHA)**

Müller-Hinton broth (HiMedia, Indie) ..... 21 g

Agar (HiMedia, Indie) ..... 20 g

Destilovaná voda ..... 1000 ml

Příslušné množství média a agaru bylo rozpuštěno v požadovaném objemu destilované vody a následně bylo živné médium sterilizováno v autoklávu (121 °C, 20 minut).

### **Fyziologický roztok (0,85% NaCl)**

NaCl (Lach-Ner, ČR) ..... 8,5 g

Destilovaná voda..... 1000 ml

Příslušné množství NaCl bylo rozpuštěno v 1000 ml destilované vody. Poté byl roztok rozplněn do alikvotů a sterilizován v autoklávu (121 °C, 20 minut).

### **Karbonátový pufr (pH 11,0 – 11,1)**

Karbonátový pufr byl připraven tak, že k 50 ml pufru A bylo přidáno takové množství pufru B, aby výsledná směs pufru měla hodnotu pH 9,2. Poté k tomuto roztoku bylo přidáno 16,65 g uhličitanu draselného (0,333 g/ml pufru, Merck, Německo), aby výsledný pufr měl hodnotu pH 11,0–11,1.

- *pufř A (0,5 M NaHCO<sub>3</sub>):*

NaHCO<sub>3</sub> (Merck, Německo) .....21 g  
 Destilovaná voda.....500 ml

Pufř A byl připraven rozpuřtěním příslušného množství hydrogenuhličitanu sodného v 500 ml destilované vody.

- *pufř B (0,5 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>):*

Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (Merck, Německo) .....13,25 g  
 destilovaná voda.....250 ml

Pufř B byl připraven rozpuřtěním příslušného množství hydrogenuhličitanu sodného v 250 ml destilované vody.

### 3.1.3 Laboratorní zařízení a pomůcky

Analytické váhy Denver Instrument SI - 64A (USA)

Aseptický laminární box Telstar Bio II - A (Španělsko)

Automatické mikropipety Eppendorf Research (Německo)

Běžné laboratorní sklo a pomůcky

Bio Vortex V1 Biotech (Česká republika)

Centrifuga Jouan MR23i (USA)

Centrifuga Hettich Rotanta 460 R (Německo)

Filtry Millex GS Filter Unit 0,22 µm (Merck, Německo)

Chromatografický systém Dionex HPLC UltiMate 3000, Thermo Fischer Scientific, (Massachusetts, USA)

Kombinovaná chladnička Beko (Turecko)

Laboratorní sterilizátor Wolf SANOclav (Německo)

Laboratorní váhy 440-47N KERN (Německo)

Mikroskop Olympus CX 41 (Japonsko)

pH metr inoLab pH/ION 735 se skleněnou elektrodou SenTix 81(Německo)

Počítačka kolonií Schüttkabortechnik Schütt count plus (Německo)

Termostat BT 120 – Laboratorní přístroje Praha (Česká republika)

## 3.2 Metodika Experimentů I a II

V rámci Experimentu I byl proveden počáteční skrínig citlivosti vybraných dekarboxyláza-pozitivních kmenů izolovaných z potravin (Tab. 3) na metabolity protektivních kultur (Tab. 2). Dále v Experimentu II, který navazoval na Experiment I, byla zkoumána antimikrobiální aktivita komerčního nisinu na vybrané kmeny bakterií mléčného kvašení. Antimikrobiální aktivita supernatantů z testovaných protektivních kmenů a nisinu byla testována pomocí jamkové difúzní metody (Tagg a McGiven, 1971).

### 3.2.1 Příprava supernatantů protektivních kultur (CFS)

Sto mikrolitrů 24hodinové kultury testovaného protektivního kmene bylo zaočkováno do 20 ml bujónu MRS nebo M17 a kultivováno po dobu 48 hodin za kultivačních podmínek uvedených v Tab. 2. Kultivační podmínky byly sestaveny na základě doporučení poskytovatele kultur a výsledků z přípravné fáze (pro větší přehlednost nejsou uvedeny v této práci).

Po 48hodinové kultivaci byly buňky odstraněny centrifugací při 10 000 ot/min po dobu 15 minut a při teplotě  $15 \pm 1$  °C. U získaných supernatantů byla podle Hu et al. (2017) upravena hodnota pH na  $6,0 \pm 0,1$  pomocí 10% (w/v) NaOH (PENTA, ČR), aby se eliminoval inhibiční účinek způsobený organickými kyselinami. Následně byly supernatanty sterilizovány filtrací přes 0,22  $\mu\text{m}$  stříkačkový filtr (Merck, Německo) a okamžitě použity v experimentech.

### 3.2.2 Příprava zásobního roztoku nisinu

Zásobní roztok nisinu o koncentraci 1000 mg/l byl připraven rozpuštěním 10 mg komerčního nisinu (nisin z *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*, deklarována účinnost  $\geq 1\ 000$  IU/mg; Merck, Německo) ve 10 ml sterilní vody. Takto připravený roztok byl zfiltrován pomocí sterilního stříkačkového filtru o porozitě 0,22  $\mu\text{m}$  a rozplněn do sterilních zkumavek a zamražen při teplotě -18 °C pro pozdější využití.

### 3.2.3 Jamková difúzní metoda

Při skrínigu antimikrobiální aktivity supernatantů z protektivních kultur byly testované dekarboxyláza-pozitivní kmeny kultivovány za optimálních podmínek uvedených v Tab. 3. Po 24hodinové kultivaci byla bakteriální suspenze naředěna desítkovým ředěním ( $10^{-1}$ – $10^{-4}$ ) a 1 ml příslušného ředění byl naočkován přelivem na 2 Petriho misky. Následně byly do ztuhlého agaru vykrojeny sterilním nástrojem jamky o průměru 6,5 mm. Do takto připravených jamek bylo nadávkováno 100  $\mu\text{l}$  připraveného supernatantu. Po 24h až 48h kultivaci za podmínek vhodných pro dekarboxyláza-pozitivní mikroorganismus byl sledován vznik inhibičních zón. Test byl proveden třikrát. Inhibice byla zaznamenána jako

negativní, pokud kolem agarové jamky nebyla pozorována čirá jasná zóna o velikosti alespoň 1 mm.

Při testování antimikrobiální aktivity nisinu byla z 24hodinové kultury odebrána bakteriální suspenze do sterilního fyziologického roztoku a připraven zákal odpovídající hodnotě 0,5 McFarlandova zákalového standardu. Sto mikrolitrů takto připravené suspenze bylo naočkováno přelivem na 2 Petriho misku. Následně byly do ztuhlého agaru vykrojeny sterilním nástrojem jamky o průměru 6,5 mm. Do připravených jamek bylo nadávkováno 100  $\mu$ l nisinu o příslušné koncentraci. Bylo testováno 5 koncentrací komerčního nisinu: 62,5 mg/l, 125 mg/l, 250 mg/l, 500 mg/l a 1000 mg/l. Po 24h až 48h kultivaci za podmínek vhodných pro dekarboxyláza-pozitivní mikroorganismus byl sledován vznik inhibičních zón. Test byl proveden třikrát. Inhibice byla zaznamenána jako negativní, pokud kolem agarové jamky nebyla pozorována čirá jasná zóna o velikosti alespoň 1 mm.

### 3.3 Metodika Experimentu III

Na základě získaných dat z Experimentů I a II byly vybrány 2 kmeny s významnou tyrozin-dekarboxylázovou aktivitou (*Latilactobacillus curvatus* T3 a *Lactiplantibacillus plantarum* RIBM 89) a 2 protektivní kmeny (*Lactococcus lactis* biovar. *diacetylactis* CCDM 686 a CCDM 689). Vliv těchto protektivních kmenů a jejich supernatantů (CFS) na produkci tyraminu testovanými kmeny T3 a RIBM 89 byl sledován v závislosti na teplotě kultivace. Byly zvoleny dvě teploty kultivace:  $30 \pm 1$  °C a  $12 \pm 1$  °C. Rovněž byl zkoumán vliv přídavku protektivních kultur a jejich supernatantů k producentům tyraminu v různých časových intervalech kultivace. Během kultivace při teplotě  $30 \pm 1$  °C bylo dávkování uskutečněno v čase 0 hodin (začátek experimentu), dále pak po 2, 5, 9, 12 a 24 hodinách kultivace tyramin-produkujících kmenů. Při teplotě  $12 \pm 1$  °C bylo dávkování uskutečněno 0. den (začátek experimentu), dále 2., 4., 7., 9. a 11. den kultivace.

Kinetika produkce tyraminu kmeny T3 a RIBM 89 byla sledována v MRS bujónu obohaceného o L-tyrozin v koncentraci 0,3 % (w/v, MRS+). Na začátku experimentu (čas 0) byly všechny zkumavky se 7 ml MRS+ zaočkovány 100  $\mu$ l 24hodinové kultury s tyrozin-dekarboxylázovou aktivitou. První série zkumavek pouze s naočkováním tyramin-produkujícím kmenem (bez protektivní kultury, resp. CFS) sloužila jako kontrolní vzorky. K další sérii zkumavek se zaočkováním tyramin-produkujícím kmenem byla přidávána v jednotlivých časech 24hodinová protektivní kultura v objemu 100  $\mu$ l. K třetí sérii zkumavek se zaočkováním tyramin-produkujícím kmenem byl přidáván v jednotlivých časech supernatant protektivní kultury v objemu 500  $\mu$ l. Všechny faktory ve vzájemné kombinaci byly testovány v trojím provedení. Kultivace vzorků při teplotě  $30 \pm 1$  °C probíhala 72 hodin a při teplotě  $12 \pm 1$  °C 16 dní. Odběry vzorků pro stanovení koncentrace tyraminu a stanovení počtu mikroorganismů byly

realizovány při  $30 \pm 1$  °C 0. (hned po zaočkování), 2., 5., 9., 12., 24., 48. a 72. hodinu kultivace. Při teplotě  $12 \pm 1$  °C byly vzorky odebírány 0. (hned po zaočkování), 2., 4., 7., 9., 11., 14. a 16. den kultivace. Metodika stanovení koncentrace tyraminu je dále popsána v kapitole 3.5 a stanovení počtu mikroorganismů v kapitole 3.6.

### 3.4 Metodika Experimentu IV

V Experimentu IV byl sledován vliv nisinu na kinetiku produkce tyraminu u kmenů citlivých na tento bakteriocin – *Latilactobacillus curvatus* T3 a *Lactiplantibacillus plantarum* RIBM 89. Na základě výsledků z Experimentu II a z přípravné fáze byly zvoleny 3 koncentrace nisinu (14,3 µg/ml; 35,7 µg/ml a 71,5 µg/ml). Testované koncentrace nisinu byly navrženy tak, aby došlo k částečné, nikoliv k úplné inhibici růstu kmenů s dekarboxylázovou aktivitou. Vliv jednotlivých koncentrací nisinu na produkci tyraminu byl sledován rovněž v závislosti na teplotě kultivace ( $12 \pm 1$  a  $30 \pm 1$  °C) a přídavku nisinu v různých časových intervalech kultivace. Při kultivaci v teplotě  $30 \pm 1$  °C bylo dávkování uskutečněno v čase 0 hodin (začátek experimentu), dále pak po 2, 5, 9, 12 a 24 hodinách kultivace tyramin-produkujících kmenů. Při teplotě  $12 \pm 1$  °C bylo dávkování uskutečněno 0. den (začátek experimentu), dále 2., 4., 7., 9. a 11. den kultivace.

Kinetika produkce tyraminu kmeny T3 a RIBM 89 byla sledována, stejně jako v Experimentu III, v MRS+ médiu. Na začátku experimentu (čas 0) byly všechny zkumavky se 7 ml MRS+ zaočkovány 100 µl 24hodinové kultury s tyrozin-dekarboxylázovou aktivitou. Zkumavky s kultivačním médiem, kde byly naočkovány pouze kmeny T3 a RIBM 89, sloužily jako kontrolní vzorky. Do dalších sérií zkumavek byl přidáván v jednotlivých časech roztok nisinu (1000 mg/l) tak, aby jeho výsledná koncentrace v médiu činila 14,3 µg/ml, 35,7 µg/ml a 71,5 µg/ml. Všechny faktory ve vzájemné kombinaci byly testovány v trojím provedení. Kultivace vzorků při teplotě  $30 \pm 1$  °C probíhala 72 hodin a při teplotě  $12 \pm 1$  °C 16 dní. Odběry vzorků pro stanovení koncentrace tyraminu a stanovení počtu mikroorganismů byly realizovány při  $30 \pm 1$  °C 0., 2., 5., 9., 12., 24., 48. a 72. hodinu kultivace. Při teplotě  $12 \pm 1$  °C byly vzorky odebírány 0., 2., 4., 7., 9., 11., 14. a 16. den kultivace. Metodika stanovení koncentrace tyraminu je dále popsána v kapitole 3.5 a stanovení počtu mikroorganismů v kapitole 3.6.

### **3.5 Stanovení množství tyraminu v Experimentech III – IV pomocí HPLC/UV**

#### **3.5.1 Příprava vzorků a předkolonová derivatizace**

Médium po kultivaci testovaných bakteriálních kmenů bylo zcentrifugováno při otáčkách 4600/min po dobu 10 minut. Získaný supernatant byl rozdělen do tří eppendorfkových zkumavek a zředěn v poměru 1:1 (v/v) kyselinou chloristou ( $c = 1,2 \text{ mol/l}$ , Merck, Německo). Derivatizace vzorků probíhala podle Dadáková et al. (2009), a to následujícím způsobem:

1. Ke vzorkům bylo přidáno 100  $\mu\text{l}$  1,7-heptandiaminu (Merck, Německo) v koncentraci 500 mg/l jako vnitřního standardu. Z této směsi byl odpipetován 1 ml do derivatizační nádobky.
2. Do vzorků v derivatizačních nádobkách bylo přidáno 1,5 ml karbonátového pufru o pH  $11,0 \pm 0,1$  a 2 ml čerstvě připraveného roztoku dansylchloridu o koncentraci 5 g/l v acetonu (Merck, Německo). Derivatizační nádobky byly dobře uzavřeny a dány třepat 20 hodin v temnu.
3. Následně bylo do každého vzorku přidáno 200  $\mu\text{l}$  roztoku prolinu (Merck, Německo) a vzorky byly třepány další hodinu. K takto upravené směsi bylo přidáno 3 ml heptanu (Merck, Německo) a vzorky byly opět třepány 3 minuty ručně.
4. Poté bylo z derivatizačních nádobek odpipetováno 1 ml heptanové vrstvy do vialek.
5. Vialky byly dány odpařit do sucha při teplotě  $60 \text{ }^\circ\text{C}$  pod proudem dusíku.
6. Suchý odparek byl zředěn 1,5 ml acetonitrilu (Merck, Německo) a vzorky byly uchovávány do doby analýzy v mrazícím zařízení při teplotách pod  $-18 \text{ }^\circ\text{C}$ .

#### **3.5.2 Vlastní chromatografické stanovení**

Bezprostředně před analýzou byly derivatizované vzorky přefiltrovány přes stříkačkový filtr s porozitou  $0,22 \mu\text{m}$  a nanесeny na kolonu (Agilent Eclipse Plus C18 RRHD,  $50 \times 3,0 \text{ mm}$ , velikost částic  $1,8 \mu\text{m}$ ) chromatografického systému (termostat kolon Agilent 1260 Infinity; autosampler LabAlliance, USA; binární pumpa LabAlliance, USA; UV/VIS DAD detektor Agilent Technologies).

Separace dansylderivátů biogenních aminů probíhala gradientovou elucí (Tab. 4) a jejich detekce probíhala spektrofotometricky UV při vlnové délce 254 nm. Podmínky separace a detekce sledovaného biogenního aminu (tyraminu) byly nastaveny podle práce Smělá et al. (2004).



Tab. 4 – Lineární gradientový elučňi program

Čas [min]	10% acetonitril [%]	100% acetonitril [%]
0,0	39	61
0,1	39	61
1,4	30	70
2,5	17	83
4,0	0	100
9,5	0	100
11,5	39	61
15,5	39	61

### 3.6 Stanovení počtu mikroorganismů v Experimentech III – IV

Odběr vzorků pro stanovení počtu mikroorganismů probíhal paralelně s odběrem vzorků pro stanovení množství tyraminu. V příslušných časových intervalech byly celkové počty mikroorganismů stanoveny plotnovou metodou. Odebraná bakteriální suspenze byla zředěna desítkovým ředěním a příslušné ředění bylo naočkováno paralelně na 2 Petriho misky s MRS nebo M17 agarem (Merck, Německo). Naočkované misky byly dány kultivovat při optimálních podmínkách po dobu 24 až 48 hodin. Po této inkubaci byly spočítány narostlé kolonie a výsledek byl vyjádřen jako CFU/ml.

### 3.7 Statistické hodnocení získaných dat

Výsledky skrínungu antimikrobiálního působení protektivních kmenů na růst testovaných producentů biogenních aminů a taktěž výsledky z kultivačních experimentů byly statisticky vyhodnoceny pomocí neparametrických testů, konkrétně Kruskal-Wallisova testu a Wilcoxonova testu na hladině významnosti 5 % ( $P < 0,05$ ).

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

Ke statistickému vyhodnocení výsledků byl použit software UNISTAT®, verze 6.5.04 (Unistat, Ltd., Londýn, Velká Británie).

## 4. VÝSLEDKY

### 4.1 Výsledky Experimentu I

V této experimentální části byl zkoumán antimikrobiální účinek supernatantů z 22 kmenů (12 kmenů *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*, 2 kmeny *Lactobacillus acidophilus*, 4 kmeny *Lb. gasseri*, 3 kmeny *Lb. helveticus* a 1 kmen *Enterococcus faecium*) produkujících bakteriocin nebo látky podobné bakteriocinům (BLIS). Antimikrobiální aktivita testovaných supernatantů byla sledována vůči 103 kmenům (z toho 77 kmenů BMK, včetně 36 kmenů rodu *Enterococcus*, které budou níže diskutovány odděleně od skupiny BMK, a 26 kmenů rodu *Staphylococcus*) s významnou dekarboxylázovou aktivitou, které byly izolovány z různých potravinových matric a nápojů. Antimikrobiální aktivita zneutralizovaných supernatantů (dále jen CFS) byla zjišťována pomocí jamkové difúzní metody. Test byl proveden třikrát. Inhibice byla zaznamenána jako negativní, pokud kolem agarové jamky nebyla pozorována čirá jasná zóna o velikosti alespoň 1 mm. Získané výsledky jsou shrnuty v Příloze I v Tab. I až Tab. VI.

#### 4.1.1 Inhibiční působení supernatantů protektivních kultur na testované BMK s dekarboxylázovou aktivitou

Supernatanty ze čtyř kmenů *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* (CCDM 71, CCDM 671, CCDM 702 a CCDM 731) a z pěti kmenů *Lc. lactis* ssp. *lactis* biovar *diacetylactis* (CCDM 670, CCDM 686, CCDM 689, CCDM 695 a CCDM 698) vykazovaly inhibiční účinek nejméně na 78 % všech testovaných bakterií mléčného kvašení. Průměry inhibičních zón se pohybovaly v rozmezí  $8,5 \pm 0,7$  až  $18 \pm 0,0$  mm (včetně průměru jamky o velikosti 6,5 mm). Všechny kmeny *Levilactobacillus (L.) brevis* byly různou měrou citlivé vůči působení supernatantů výše uvedených laktokoků. Nejméně citlivý byl kmen *L. brevis* B125 (izolát z masa bažanta) a dále kmen *L. brevis* T24 (izolát ze sýru). Ostatní kmeny (15/17, izoláty z piva) vykazovaly podobnou citlivost vůči výše zmíněným supernatantům z laktokoků ( $P > 0,05$ ). Největší inhibiční účinek na tyto kmeny byl sledován u supernatantů z *Lc. lactis* ssp. *lactis* CCDM 686 a *Lc. lactis* ssp. *lactis* CCDM 689. Průměry inhibičních zón detekovaných u těchto supernatantů jsou uvedeny v Tab. 5. Pokud bychom srovnávali citlivost testovaných kmenů *L. brevis* na tyto supernatanty, pouze u 3 kmenů (RIBM 16, RIBM 20 a B125) byl zaznamenán statisticky významný rozdíl ( $P < 0,05$ ) ve velikosti inhibičních zón. U těchto kmenů byly detekovány větší inhibiční zóny po působení supernatantu z kultury CCDM 689. Tudíž lze předpokládat, že jsou citlivější vůči působení tohoto supernatantu.

Tab. 5 – Inhibiční účinek supernatantů z kmenů *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* CCDM 686 a CCDM 689 na dekarboxyláza-pozitivní kmeny BMK [údaje jsou vyjádřeny jako průměry inhibičních zón v mm ze dvou měření ± SD včetně velikosti jamky o průměru 6,5 mm]

Producenti BA	CCDM 686	CCDM 689	Producenti BA	CCDM 686	CCDM 689
<i>Levilactobacillus brevis</i> T24	13,5±0,7	14,0±0,0	<i>Lc. casei/paracasei</i> AIV-11	13,5±0,7	14,0±0,0
<i>L. brevis</i> B125	11,0±0,0	13,5±0,7	<i>Lc. casei/paracasei</i> AIV-13	14,5±0,0	14,5±0,0
<i>L. brevis</i> RIBM 16	13,0±0,0	14,5±0,7	<i>Lc. casei/paracasei</i> RIBM 113	14,5±0,7	15,3±0,4
<i>L. brevis</i> RIBM 20	13,0±0,0	14,3±0,4	<i>Lc. paracasei</i> T50	–	–
<i>L. brevis</i> RIBM 33	15,0±0,0	15,5±0,7	<i>Lc. paracasei</i> T51	–	–
<i>L. brevis</i> RIBM 50	15,0±0,0	15,0±0,0	<i>Lc. paracasei</i> T52	–	–
<i>L. brevis</i> RIBM 62	15,3±0,4	15,3±0,4	<i>Lat. sakei</i> B103	11,5±0,7	14,0±0,0
<i>L. brevis</i> RIBM 67	15,3±0,4	15,0±0,0	<i>Lac. plantarum</i> AI-7	14,0±0,0	13,5±0,7
<i>L. brevis</i> RIBM 68	15,0±0,0	15,3±0,4	<i>Lac. plantarum</i> RIBM 89	17,3±0,4	16,5±0,7
<i>L. brevis</i> RIBM 69	15,3±0,4	15,0±0,0	<i>Lac. plantarum</i> RIBM 94	10,5±0,7	10,0±0,0
<i>L. brevis</i> RIBM 70	15,3±0,4	15,0±0,0	<i>Lac. plantarum</i> RIBM 96	15,0±0,0	15,3±0,4
<i>L. brevis</i> RIBM 72	15,0±0,0	15,3±0,4	<i>Leu. mesenteroides</i> B170	–	–
<i>L. brevis</i> RIBM 78	15,0±0,0	15,0±0,0	<i>Leu. mesenteroides</i> B171	–	–
<i>L. brevis</i> RIBM 93	15,0±0,0	15,0±0,0	<i>Leu. pseudomes.</i> T63	–	–
<i>L. brevis</i> RIBM 98	15,3±0,4	15,3±0,4	<i>S. salivarius</i> B149	–	–
<i>L. brevis</i> RIBM 101	15,3±0,4	15,0±0,0	<i>S. salivarius</i> B150	–	–
<i>L. brevis</i> RIBM 111	14,5±0,7	15,0±0,0			
<i>Lat. curvatus</i> T2	15,0±0,0	15,5±0,7			
<i>Lat. curvatus</i> T3	18,0±0,0	17,5±0,7			
<i>Lat. curvatus</i> T8	14,3±0,4	14,0±0,0			
<i>Lat. curvatus</i> T15	15,0±0,0	13,5±0,7			
<i>Lat. curvatus</i> T36	15,0±0,0	15,0±0,0			
<i>Lat. curvatus</i> T37	13,0±0,0	14,3±0,4			
<i>Lat. curvatus</i> T41	13,5±0,7	14,0±0,0			
<i>Lat. curvatus</i> AI-3	13,0±0,0	13,0±0,0			

\*L. – *Levilactobacillus*, Lac. – *Lactiplantibacillus*, Lat. – *Latilactobacillus*, Lc. – *Lacticaseibacillus*, Leu. – *Leuconostoc*, pseudomes. – *pseudomesenteroides*, S. – *Streptococcus*.

Obdobně všechny kmeny *Latilactobacillus (Lat.) curvatus* (8/8, izoláty ze sýrů) vykazovaly citlivost vůči stejným supernatantům jako kultury *L. brevis*, tj. CFS z kmenů CCDM 71, CCDM 671, CCDM 702, CCDM 731, CCDM 670, CCDM 686, CCDM 689, CCDM 695 a CCDM 698, nejvíce pak na již zmíněné supernatanty z kmenů CCDM 686 (13,0–18,0 mm) a CCDM 689 (13,0–17,5 mm). Průměry inhibičních zón  $18 \pm 0,0$  mm a  $17,5 \pm 0,7$  mm (největší detekované) byly pozorovány u stejného kmene *Latilactobacillus curvatus* T3. Tento kmen rovněž prokázal vyšší citlivost ( $P < 0,05$ ) vůči působení dalších CFS z kmenů CCDM 71, CCDM 670, CCDM 671, CCDM 698 a CCDM 731. Naopak kmeny *Lat. curvatus* T37, T41 a AI-3 vykazovaly menší citlivost vůči pěti z devíti zmíněných supernatantů ( $P < 0,05$ ). Konkrétně se jednalo o supernatanty z kmenů CCDM 71, CCDM 671, CCDM 702, CCDM 731 a CCDM 695. Všechny kmeny pak kromě kmene T3 byly nejméně citlivé na antimikrobiální působení CFS z kmene CCDM 671 ( $P < 0,05$ ).

Dále byly zaznamenány inhibiční účinky CFS z laktokoků na kmeny *Lactiplantibacillus plantarum (Lac., 4/4)*, *Lacticaseibacillus casei/paracasei (Lc., 3/3)* a *Latilactobacillus sakei (Lat. 1/1)*. Z testovaných kmenů *Lac. plantarum* jako nejvíce citlivé se prokázaly kmeny RIBM 89 (12,3–17,3 mm) a RIBM 96 (12,0–15,3 mm). U těchto kmenů byla pozorována vyšší citlivost ( $P < 0,05$ ) vůči všem 9 již zmíněným CFS. Vznik inhibiční zóny o průměru  $17,3 \pm 0,4$  mm byl detekován u kmene *Lac. plantarum* RIBM 89 (izolát z piva) po působení CFS z kmene CCDM 686. U stejného kmene po působení CFS z kmene 689 byla pozorována zóna o velikosti  $16,5 \pm 0,7$  mm. Mezi průměry inhibičních zón nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl ( $P > 0,05$ ). Proto lze soudit, že daný kmen je stejně citlivý vůči působení obou CFS. Obdobně ostatní kmeny *Lac. plantarum*, až na kmen RIBM 94, prokázaly vyšší citlivost na tyto supernatanty. Kmen RIBM 94, na rozdíl od ostatních kmenů, byl rezistentní vůči působení CFS z kmenů CCDM 670 a CCDM 695 a navíc vůči ostatním CFS vykazoval minimální citlivost. Kmen *Lat. sakei* B103 (izolát z masa bažanta) byl citlivý zejména vůči CFS z kmenů CCDM 689 a CCDM 731 ( $P < 0,05$ ). Po působení CFS z kmene CCDM 689 byla detekována inhibiční zóna o velikosti  $14,0 \pm 0,0$  mm a po působení CFS z kmene CCDM 731 inhibiční zóna o velikosti  $12,3 \pm 0,4$  mm. U průměrů inhibičních zón (9,0–10,5 mm) detekovaných po působení ostatních CFS nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl ( $P > 0,05$ ).

Různou citlivost vůči supernatantům z laktokoků projevíly i kmeny *Lc. casei/paracasei*. Průměry inhibičních zón se pohybovaly v rozmezí od 10,0 mm do 15,3 mm. Izoláty ze sýru (AIV-11 a AIV-13) vykazovaly menší citlivost na CFS z kmenů CCDM 702 a CCDM 731 ( $P < 0,05$ ). Všechny kmeny byly nejméně citlivé na antimikrobiální působení supernatantu z kmene CCDM 695. Naopak všechny kmeny vykazovaly vyšší citlivost vůči působení CFS z kmenů CCDM 686 a CCDM 689 ( $P < 0,05$ ). Zejména pak u kmene RIBM 113 (izolát z piva) byly detekovány po působení těchto CFS největší inhibiční zóny ( $15,0 \pm 0,0$  a  $15,3 \pm 0,4$  mm). Oproti tomu kmeny *Lc. paracasei* (T50–T52) byly rezistentní

vůči působení supernatantů z laktokoků. Dále také nebyla pozorována antimikrobiální aktivita testovaných CFS na kmeny *Leuconostoc mesenteroides* (B170 a B171), *Leuc. pseudomesenteroides* (T63) a *Streptococcus salivarius* (B150).

Výsledky inhibičního působení supernatantů ze 2 kmenů *Lactobacillus acidophilus* (CCDM 79 a CCDM 149), ze 4 kmenů *Lb. gasseri* (CCDM 214, CCDM 215, CCDM 340 a CCDM 377), ze 3 kmenů *Lb. helveticus* (CCDM 62, CCDM 82 a CCDM 125) a kmene *Enterococcus faecium* CCDM 945 jsou uvedeny v Tab. II (Příloha I). V případě testovaných CFS z protektivních kultur rodu *Lactobacillus* (producenti BLIS) antimikrobiální aktivitu prokázaly pouze kmeny *Lb. gasseri* CCDM 377 a *Lb. helveticus* CCDM 125. Spektrum účinku CFS z kmene CCDM 377 bylo obdobné jako u již zmíněných supernatantů z kmenů laktokoků, kdy byla pozorována inhibice u 80 % (33/41) testovaných BMK. Inhibiční účinek tohoto CFS byl pozorován na 17/17 kmenů *L. brevis*, 8/8 kmenů *Lat. curvatus*, 3/3 kmenů *Lc. casei/paracasei*, 4/4 *Lac. plantarum* a 1/1 *Lat. sakei*. Nicméně u kmenů BMK byla sledována minimální citlivost vůči tomuto supernatantu. U devatenácti z 33 kmenů (58 %) byl pozorován vznik inhibiční zóny o průměru do 10 mm a u zbylých třinácti kmenů v rozmezí 10,0–11,0 mm. Pouze 1 kmen (*L. brevis* RIBM 111) prokázal vyšší citlivost ( $P < 0,05$ ) na antimikrobiální látku v tomto supernatantu. Oproti tomu u CFS z kmene CCDM 125 bylo pozorováno úzké spektrum účinku. Byla zaznamenána inhibice 5 kmenů *Lat. curvatus* (T2, T3, T15, T36 a T37), 1 kmene *L. brevis* T24 a 1 kmene *Lc. paracasei* T50. Průměry inhibičních zón u kmenů *Lat. curvatus* se pohybovaly v rozmezí 10,3–12,0 mm. Pokud bychom srovnávali citlivost těchto kmenů na supernatanty obou laktobacilů, u dvou kmenů (T15 a T36), byl zaznamenán statisticky významný rozdíl ve velikosti inhibičních zón ( $P < 0,05$ ). U těchto kmenů byly detekovány větší inhibiční zóny ( $12,0 \pm 0,0$  mm) po působení CFS z kultury CCDM 125. Tudíž lze předpokládat, že jsou citlivější vůči působení tohoto supernatantu. Obdobně kmen *L. brevis* T24 byl citlivější vůči CFS z kmene CCDM 125 ( $P < 0,05$ ). Inhibice kmene *Lc. paracasei* T50 byla zaznamenána pouze po působení CFS z kmene CCDM 125. Byla detekována inhibiční zóna o velikosti  $9,0 \pm 0,0$  mm.

Co se týká antimikrobiální aktivity supernatantu z kmene *Enterococcus faecium* CCDM 945 (producent BLIS), inhibiční účinek tohoto CFS byl pozorován na 16/17 kmenů *L. brevis*, 8/8 kmenů *Lat. curvatus*, 3/3 kmenů *Lc. casei/paracasei*, 3/3 *Lc. paracasei*, 4/4 *Lac. plantarum* a 1/1 *Lat. sakei*. V případě kmenů *L. brevis*, deset kmenů (T24, RIBM 50, RIBM 62, RIBM 67, RIBM 69, RIBM 70, RIBM 72, RIBM 78, RIBM 93 a RIBM 101) prokázalo obdobnou citlivost ( $P > 0,05$ ). Průměry inhibičních zón se u těchto kmenů pohybovaly od 12,0 do 12,5 mm. Zbylých 5 kmenů vykazovalo nižší citlivost ( $P < 0,05$ ), kdy byly detekovány průměry inhibičních zón do 11,0 mm. Obdobně také u kmenů *Lc. casei/paracasei* (2/3) a *Lc. paracasei* (3/3) byly zaznamenány inhibiční zóny do 10,3 mm. Naopak u kmenů *Lat. curvatus* (T3, T8, T36, T37

a T41), *Lat. sakei* B103 a *Lac. plantarum* (RIBM 89 a RIBM 96) byly pozorovány inhibiční zóny o velikosti 12,0–14,0 mm. Z těchto kmenů největší citlivost pak vykazoval kmen *Lat. curvatus* T41, kdy po působení daného supernatantu byla detekována inhibiční zóna o velikosti  $14 \pm 0,0$  mm ( $P < 0,05$ ).

Kmeny *Streptococcus salivarius* (B149 a B150), *Leuconostoc mesenteroides* (B170 a B171) a *Leuconostoc pseudomesenteroides* (T63) byly rezistentní vůči působení testovaných supernatantů z laktobacilů a enterokoka.

#### **4.1.2 Antimikrobiální aktivita supernatantů protektivních kultur na testované dekarboxyláza-pozitivní kmeny z rodu *Enterococcus* a *Staphylococcus***

Antimikrobiální působení supernatantů protektivních kultur na dekarboxyláza-pozitivní kmeny rodů *Enterococcus* a *Staphylococcus* je uvedeno v Tab. III a Tab. VI (Příloha I). Bylo testováno celkem 36 kmenů rodu *Enterococcus* (9 kmenů *Enterococcus* sp., 6 kmenů *E. durans*, 3 kmeny *E. faecalis*, 14 kmenů *E. faecium* a 4 kmeny *E. hirae*) a 26 kmenů rodu *Staphylococcus* (4 kmeny *S. epidermidis*, 4 kmeny *S. haemolyticus*, 4 kmeny *S. hominis*, 2 kmeny *S. pasteurii*, 4 kmeny *S. succinus* a 8 kmenů *S. warneri*).

Co se týká antimikrobiální aktivity zkoumaných CFS z laktokoků, devět z dvanácti testovaných supernatantů (CFS z kmene CCDM 71, CCDM 414, CCDM 418, CCDM 670, CCDM 686, CCDM 689, CCDM 695, CCDM 698 a CCDM 731) projevilo inhibiční účinek na alespoň 1 indikátorový kmen z rodu *Enterococcus* nebo *Staphylococcus*. V případě kmenů enterokoků inhibiční účinek prokázaly supernatanty z kmenů CCDM 71, CCDM 670, CCDM 686, CCDM 689, CCDM 695, CCDM 698 a CCDM 731. Spektrum účinku CFS na kmeny enterokoků bylo obdobné. Největší inhibiční účinek byl však zjištěn na kmeny *Enterococcus* sp., kdy sedm z devíti testovaných kmenů (E15, E16, E18, E21, E26, E28 a E30) bylo inhibováno nejméně 3 supernatanty z laktokoků. Průměry inhibičních zón se pohybovaly mezi 9,3–13,3 mm. Tyto kmeny vykazovaly relativně menší citlivost vůči působení CFS z kmenů CCDM 695 a CCDM 698 (10,0–10,5 mm). Naopak, kromě 2 kmenů (E26 a E30), byly tyto kmeny enterokoků více citlivé vůči působení CFS z kmene CCDM 686 a CCDM 731 ( $P < 0,05$ ). Nejméně citlivý vůči zmíněným supernatantům byl kmen E30 (izolát z masa králíka). U tohoto kmene byl pozorován vznik minimálních inhibičních zón (do 10,0 mm) po působení pouze 3 ze 7 uvedených CFS. Z dalších testovaných enterokoků, výrazný inhibiční účinek byl sledován u kmenů *E. faecium*. Devět ze čtrnácti kmenů *E. faecium* (B129, E2, E5, E8, E11, E13, E14, E17 a E25) projevilo citlivost vůči působení nejméně 2 supernatantů z laktokoků. Kmeny vykazovaly různou citlivost vůči testovaným supernatantům. Nicméně podle počtu inhibovaných kmenů lze usuzovat, že kmeny *E. faecium* izolované z masa králíka (8/9, E2–E25) jsou citlivější na působení zkoumaných CFS než kmeny izolované z masa bažanta (1/5, B129). Obzvláště u kmene

*E. faecium* E5 byla pozorována vyšší citlivost vůči všem 7 supernatantům ( $P < 0,05$ ). Velikosti inhibičních zón se pohybovaly v rozmezí 12,0–13,0 mm.

Dále byla pozorována inhibice *E. durans* B160 (1/6, izolát z masa bažanta), *E. faecalis* B131 (1/3, izolát z masa bažanta) a *E. hirae* B122 (1/4, izolát z masa bažanta). Kmen *E. durans* B160 byl citlivý na 5 ze 7 uvedených CFS, konkrétně z kmenů CCDM 670, CCDM 686, CCDM 695, CCDM 698 a CCDM 731. Průměry inhibičních zón se pohybovaly mezi 10,5–11,0 mm. Nebyl zaznamenán statisticky významný rozdíl ve velikosti inhibičních zón ( $P > 0,05$ ). Obdobné rozměry inhibičních zón byly detekovány i u kmene *E. faecalis* B131 a *E. hirae* B122 (10,3–11,0 mm) po působení CFS z kmenů CCDM 670, CCDM 686, CCDM 689, CCDM 695 a CCDM 731. Vyšší citlivost prokázal pouze kmen *E. hirae* B122 na supernatant z kmene CCDM 71 ( $P < 0,05$ ).

Obecně testované kmeny enterokoků byly citlivější vůči působení daných CFS než kmeny stafylokoků, kdy 53 % (19/36) zkoumaných enterokoků bylo inhibováno nejméně 2 z 9 již zmíněných supernatantů. Oproti tomu 88 % testovaných kmenů stafylokoků bylo rezistentních vůči supernatantům zmíněných laktokoků. Pouze 3 kmeny prokázaly citlivost vůči alespoň 1 z testovaných CFS, konkrétně vůči CFS z kmene CCDM 414 a z kmene CCDM 418. Oba supernatanty působily inhibičně na 2 kmeny *S. haemolyticus* (S9 a S12, izoláty z pstruha potočního), přičemž supernatant z kmene CCDM 414 inhiboval i růst kmene *S. hominis* S7 (izolát z pstruha potočního). Průměry inhibičních zón se pohybovaly v rozmezí 9,5–10,5 mm. Pokud bychom srovnávali antimikrobiální působení CFS z kmene CCDM 414 na uvedené kmeny stafylokoků, nebyl zjištěn signifikantní rozdíl ( $P > 0,05$ ). Obdobně tomu je i u supernatantu z kmene CCDM 418. Naopak testované kmeny enterokoků neprojevíly citlivost vůči těmto supernatantům.

Co se týká antimikrobiální aktivity CFS ze zkoumaných kmenů laktobacilů a *E. faecium* CCDM 945, žádný z testovaných kmenů rodu *Enterococcus* a *Staphylococcus* neprokázal citlivost vůči těmto supernatantům.

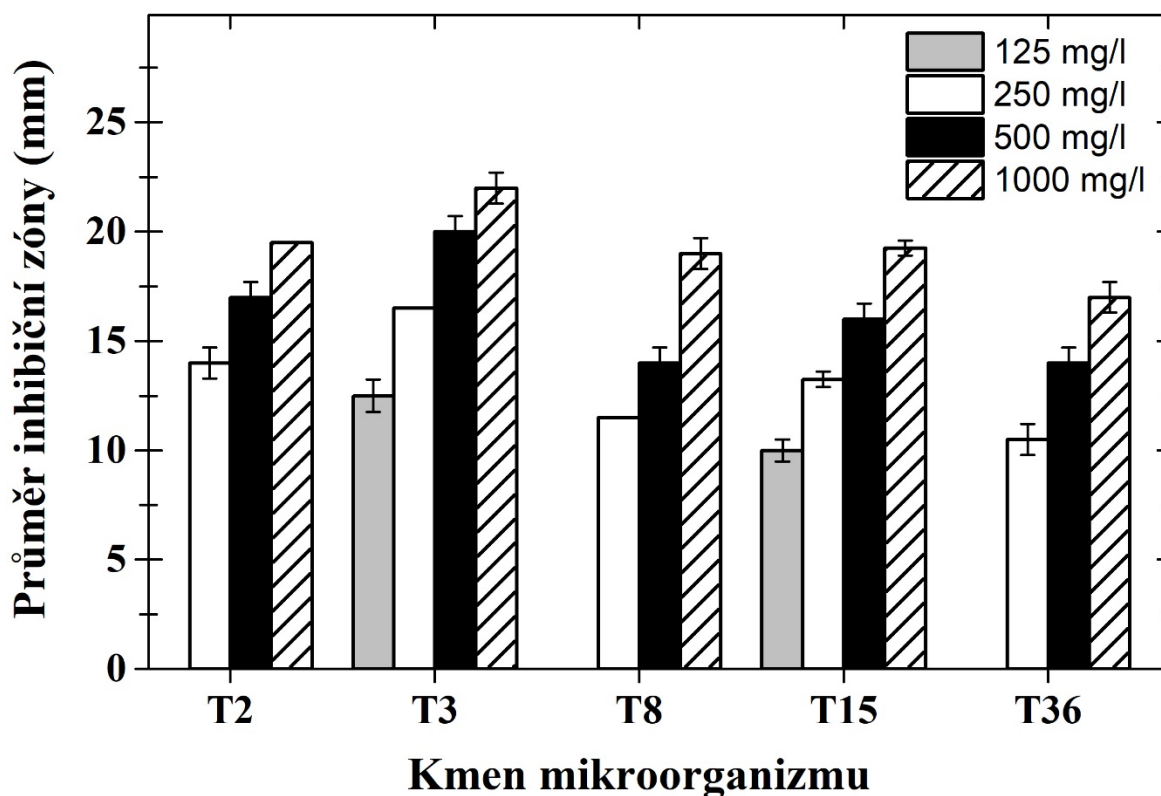
## 4.2 Výsledky Experimentu II

Na základě získaných výsledků z Experimentu I bylo vybráno 21 kmenů bakterií mléčného kvašení s významnou tyrozin-dekarboxylázovou aktivitou (13 kmenů *Levilactobacillus brevis*, 5 kmenů *Latilactobacillus curvatus*, 2 kmeny *Lactiplantibacillus plantarum* a 1 kmen *Lacticaseibacillus casei/paracasei*), které vykazovaly významnou citlivost vůči supernatantům z testovaných kmenů *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* (producenti nisinu). Na tyto kmeny byla zjišťována antimikrobiální aktivita komerčního přípravku nisinu pomocí jamkové difúzní metody. Bylo testováno 5 koncentrací přípravku nisinu: 62,5 mg/l, 250 mg/l, 500 mg/l a 1000 mg/l. Výsledky jsou shrnuty v grafech zobrazených na Obr. 7–Obr. 10. Velikosti inhibičních zón uvedené v grafech odpovídají průměrům stanovení ze tří měření a zobrazené chybové úsečky se rovnají směrodatným odchylkám. Inhibice byla zaznamenána jako negativní, pokud kolem agarové jamky nebyla pozorována čirá jasná zóna o velikosti alespoň 1 mm.

Ze získaných výsledků je patrné, že přípravek nisinu v nejnižší testované koncentraci (62,5 mg/l) neinhiboval žádný z vyšetřovaných kmenů BMK, proto tato koncentrace není ani uváděna na následujících grafech (Obr. 7–Obr. 10).

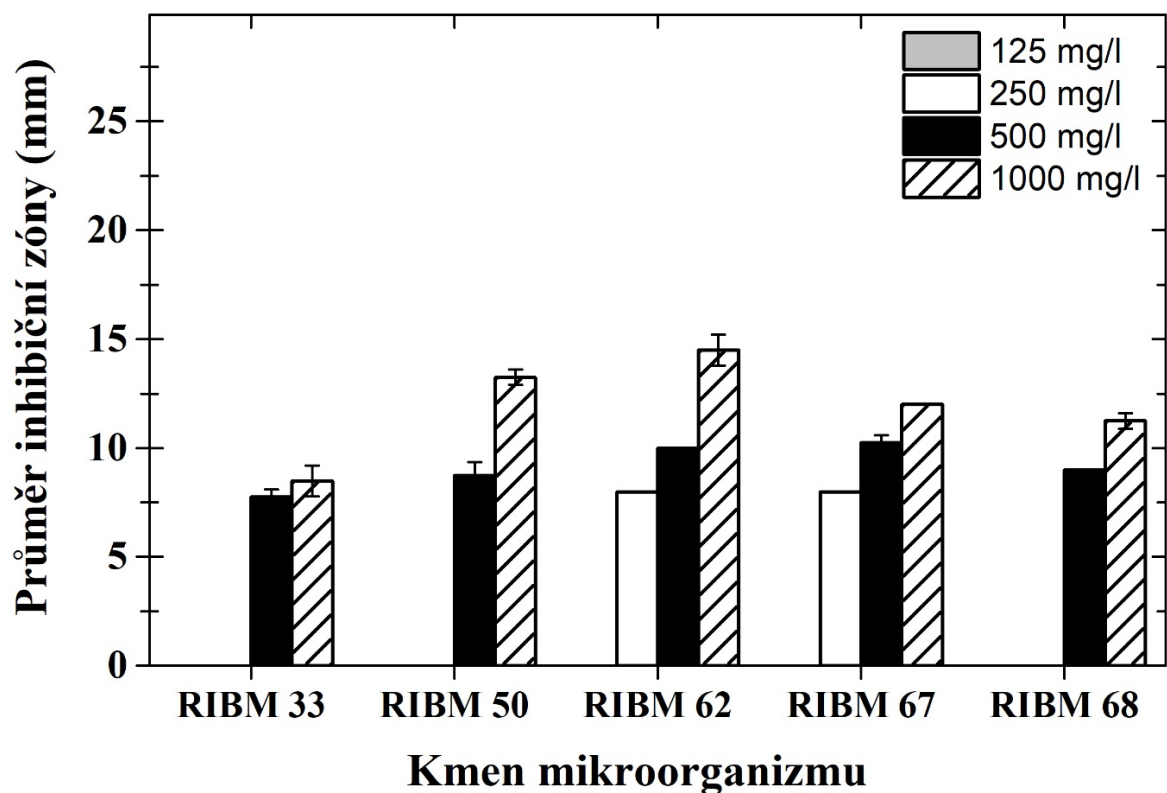
Na Obr. 7 lze pozorovat, že v případě vyšetřovaných kmenů *Latilactobacillus curvatus* (izoláty ze sýru) byla pouze u 2 kmenů zaznamenána minimální inhibiční koncentrace (MIC) po aplikaci přípravku nisinu v koncentraci 125 mg/l (2. nejnižší testovaná koncentrace). Jednalo se o kmeny *Lat. curvatus* T3 a *Lat. curvatus* T15. U kultury T3 byly naměřeny inhibiční zóny o průměrech 12,5–22,0 mm a u kultury T15 inhibiční zóny o průměrech 10,0–19,3 mm. Pokud bychom srovnávali velikosti inhibičních zón detekovaných u těchto 2 kmenů, u kultury *Lat. curvatus* T3 byl pozorován vznik signifikantně větších zón po působení všech 4 inhibičních koncentrací nisinu než u kultury *Lat. curvatus* T15 ( $P < 0,05$ ). Proto lze předpokládat, že kmen *Lat. curvatus* T3 je citlivější vůči působení nisinu než kmen *Lat. curvatus* T15. U ostatních kmenů *Lat. curvatus* (T2, T8 a T36) byly pozorovány inhibiční zóny o průměru 10,5–14,0 mm až při aplikaci přípravku nisinu v koncentraci 250 mg/l. Relativně nejnižší citlivost pak prokázal kmen *Lat. curvatus* T36, u kterého byly detekovány signifikantně menší zóny u 2 ze 3 testovaných koncentrací nisinu než u ostatních kmenů ( $P < 0,05$ ).



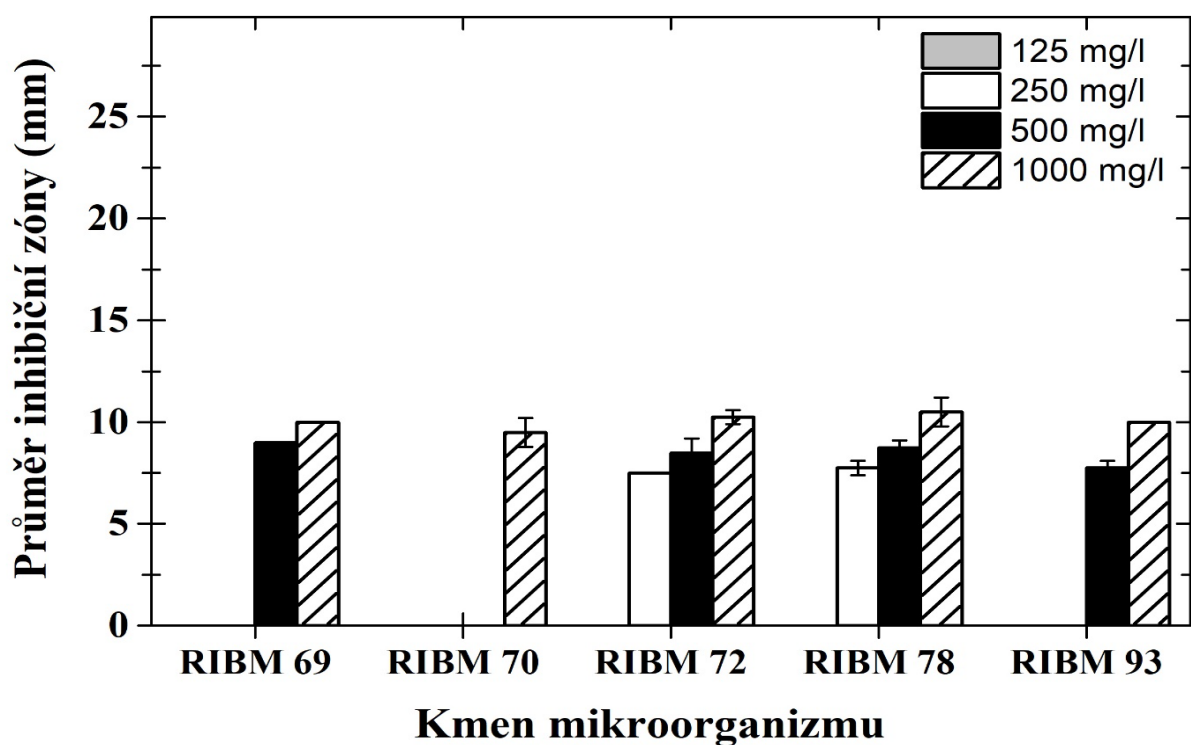


Obr. 7: Antimikrobiální působení komerčního přípravku nisinu na kmeny *Lactobacillus curvatus* T2, T3, T8, T15 a T36.

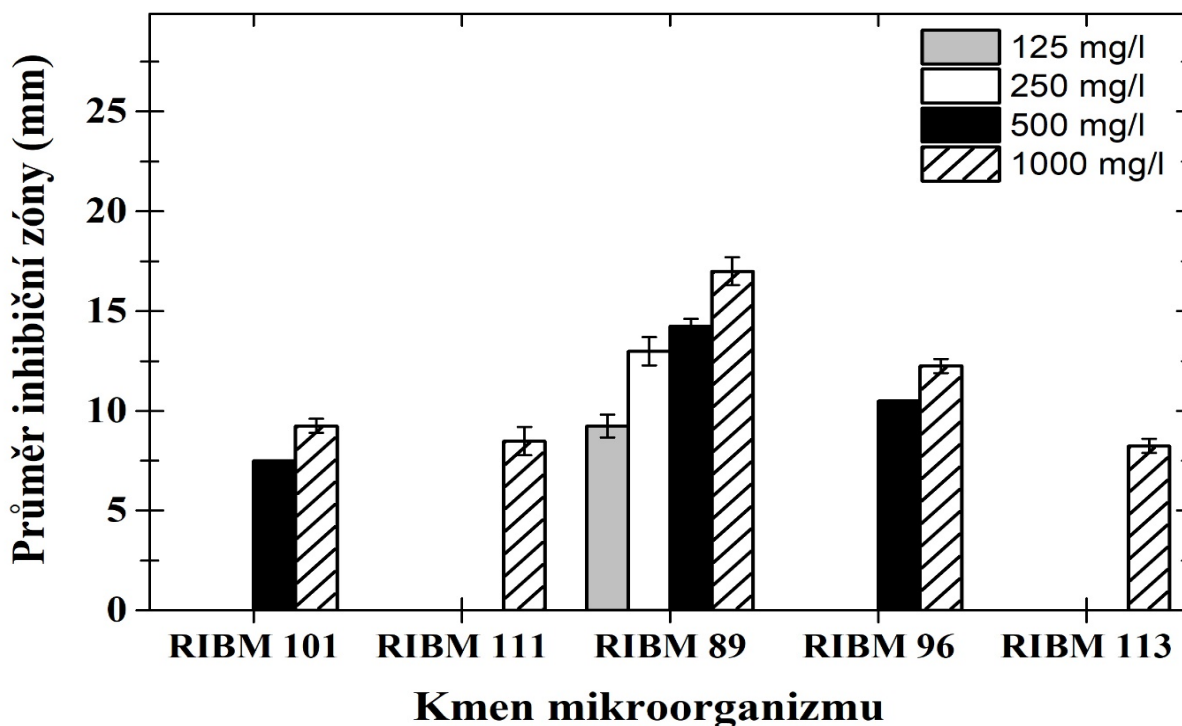
Obdobně jako kmeny *Lat. curvatus* prokázaly testované kmeny *Levilactobacillus brevis* (izoláty z piva) různou citlivost vůči působení nisinu, jak je patrné z Obr. 8–Obr. 10. Inhibiční účinek přípravku nisinu byl pozorován u dvanácti ze třinácti kmenů *L. brevis*. U čtyř kmenů *L. brevis* (RIBM 62, RIBM 67, RIBM 72 a RIBM 78) byla zjištěna inhibice při zkoumané koncentraci 250 mg/l a u šesti kmenů *L. brevis* (RIBM 33, RIBM 50, RIBM 68, RIBM 69, RIBM 93 a RIBM 101) až při aplikaci koncentrace 500 mg/l. U kmenů *L. brevis* RIBM 70 a *L. brevis* RIBM 111 byly pozorovány inhibiční zóny až působením přípravku nisinu v nejvyšší testované koncentraci (1000 mg/l). Na základě velikosti detekovaných inhibičních zón lze předpokládat, že kmeny *Levilactobacillus brevis* jsou méně citlivé vůči působení nisinu než kmeny *Lactobacillus curvatus*. U kmenů *L. brevis* byly zjištěny signifikantně menší zóny ( $P < 0,05$ ) po působení přípravku nisinu v koncentraci 250 mg/l, 500 mg/l a 1000 mg/l než u kmenů *Lat. curvatus*. Navíc jeden kmen (RIBM 98) byl rezistentní vůči všem zkoumaným koncentracím nisinu.



Obr. 8: Antimikrobiální působení komerčního přípravku nisinu na kmeny *Levilactobacillus brevis* RIBM 33, RIBM 50, RIBM 62, RIBM 67 a RIBM 68.



Obr. 9: Antimikrobiální působení komerčního přípravku nisinu na kmeny *Levilactobacillus brevis* RIBM 69, RIBM 70, RIBM 72, RIBM 78 a RIBM 93.



Obr. 10: Antimikrobiální působení komerčního přípravku nisinu na kmeny *Levilactobacillus brevis* (RIBM 101 a RIBM 111) a *Lactiplantibacillus plantarum* (RIBM 89 a RIBM 96) a *Lacticaseibacillus casei/paracasei* (RIBM 113).

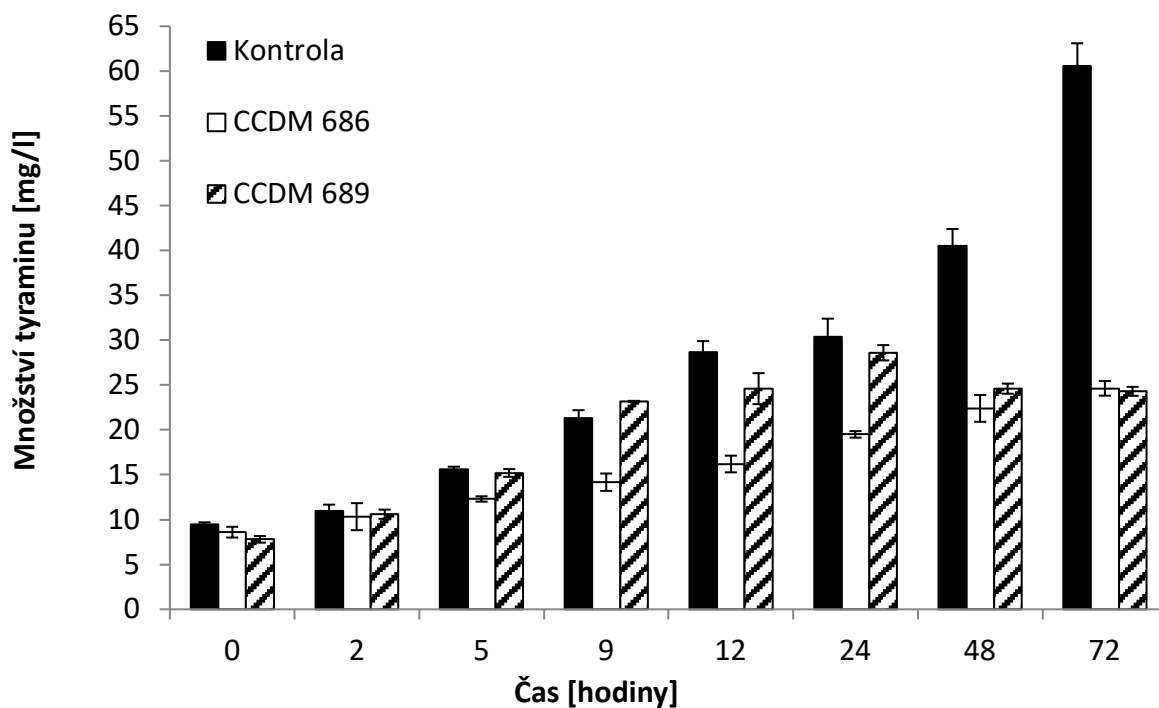
V případě vyšetřovaných kmenů *Lactiplantibacillus plantarum* (izoláty z piva) byla zaznamenána inhibiční aktivita u kmene RIBM 89 již při koncentraci 125 mg/l. Byla detekována inhibiční zóna o průměru  $9,3 \pm 0,4$  mm. Při dalších testovaných koncentracích se průměry inhičních zón pohybovaly v rozmezí od 13,0 do 17,0 mm. Naopak u 2. testovaného kmene *Lac. plantarum* RIBM 96 byla pozorována inhibice až při působení nisinového přípravku v koncentraci 500 mg/l. Navíc u tohoto kmene byly zjištěny signifikantně menší průměry inhičních zón oproti kmenu *Lac. plantarum* RIBM 89 ( $P < 0,05$ ). Konkrétně u kmene *Lac. plantarum* RIBM 96 byla detekována inhibiční zóna o průměru  $10,5 \pm 0,0$  mm při koncentraci 500 mg/l a při koncentraci 1000 mg/l inhiční zóna o průměru  $12,3 \pm 0,4$  mm. Poslední zkoumaný kmen *Lacticaseibacillus casei/paracasei* RIBM 113 vykazoval citlivost až při nejvyšší testované koncentraci (1000 mg/l) přípravku nisinu. Byla pozorována tvorba minimální inhibiční zóny o průměru  $8,3 \pm 0,4$  mm. Z uvedených výsledků vyplývá, že citlivost testovaných dekarboxyláza-pozitivních BMK na nisin je značně variabilní nejen v rámci rodu, ale i druhu. Kmeny téhož druhu reagují rozdílně na působení nisinu.

### 4.3 Výsledky Experimentu III

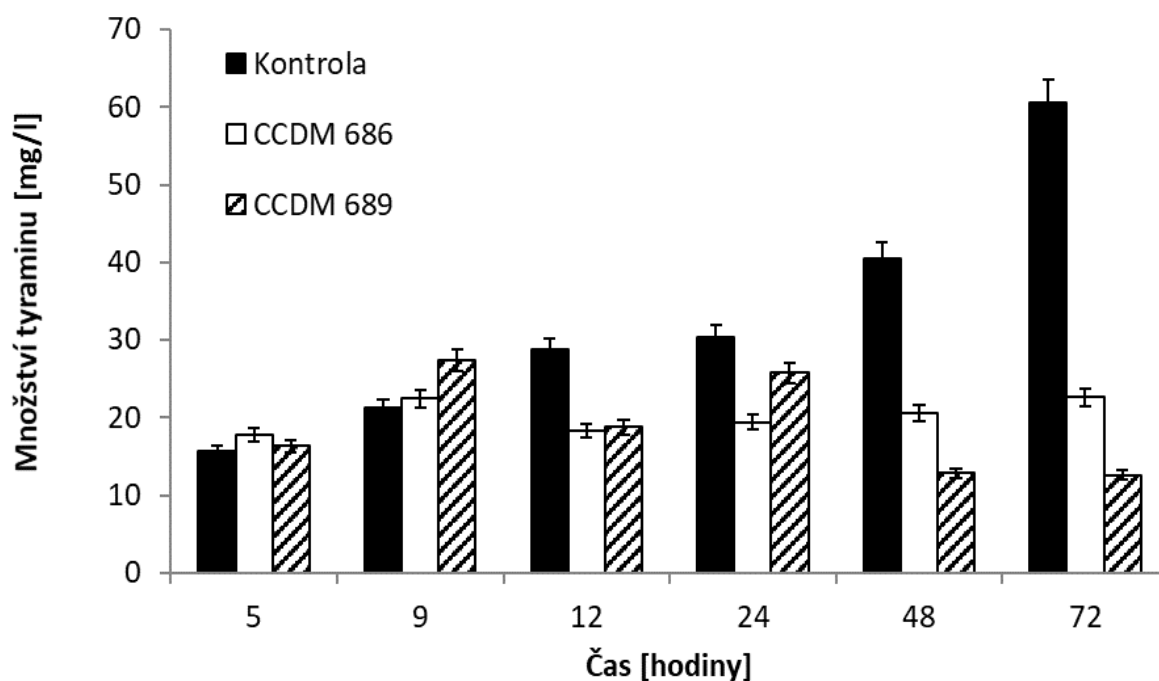
Na základě získaných dat z Experimentu I byly vybrány 2 protektivní kmeny *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* biovar. *diacetylactis* CCDM 686 a CCDM 689, které vykazovaly významný inhibiční účinek na testované BMK. Vliv těchto protektivních kmenů a jejich supernatantů (CFS) na produkci tyraminu (TYM) byl sledován u 2 kmenů s významnou tyrozin-dekarboxylázovou aktivitou, které prokázaly signifikantní citlivost vůči testovaným supernatantům z laktokoků a na nisin. Konkrétně se jednalo o kmen *Lactilactobacillus curvatus* T3 a *Lactiplantibacillus plantarum* RIBM 89. Vliv protektivních kmenů CCDM 686 a CCDM 689 a jejich supernatantů (CFS 686 a CFS 689) na produkci tyraminu kmeny T3 a RIBM 89 byl sledován v závislosti na teplotě kultivace. Byly zvoleny dvě teploty kultivace:  $30 \pm 1$  °C a  $12 \pm 1$  °C. Rovněž byl zkoumán vliv přídavku protektivních kultur a jejich supernatantů k producentům tyraminu v různých časových intervalech kultivace. Při kultivaci v teplotě  $30 \pm 1$  °C bylo dávkování uskutečněno v čase 0 hodin (začátek experimentu), dále pak po 2, 5, 9, 12 a 24 hodinách kultivace tyramin-produkujících kmenů. Při teplotě  $12 \pm 1$  °C bylo dávkování uskutečněno v 0. den (začátek experimentu), dále pak ve 2., 4., 7., 9. a 11. den kultivace. Kontrolní vzorky byly kultivovány bez přítomnosti protektivních kultur a jejich CFS. Kombinace všech faktorů byla testována v trojím opakování. Počty buněk byly stanoveny nepřímou plotnovou metodou.

#### 4.3.1 Vliv protektivních kultur a jejich CFS na produkci tyraminu u kmene *Lactiplantibacillus plantarum* RIBM 89 při teplotě 30 °C

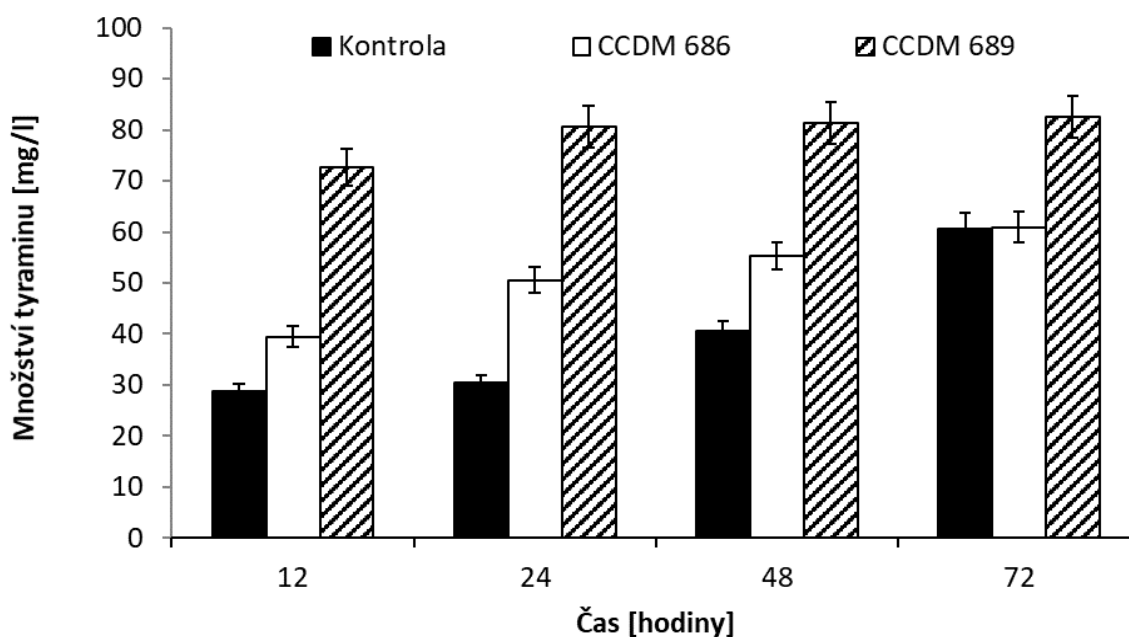
Z výsledků graficky znázorněných na Obr. 11 je možné sledovat vývoj produkce tyraminu u kmene *Lac. plantarum* RIBM 89 v přítomnosti protektivních kmenů *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* CCDM 686 a CCDM 689, které byly zaočkovány spolu s produkčním kmenem v čase 0 h (začátek experimentu). Z grafu lze pozorovat, že dekarboxylázová aktivita kmene *Lac. plantarum* RIBM 89 v přítomnosti kmene *Lc. lactis* ssp. *lactis* CCDM 689 nebyla výrazně ovlivněna až do 24. hodiny kultivace. Detekovaná množství tyraminu v těchto vzorcích (7,8–28,6 mg/l) byla srovnatelná ( $P > 0,05$ ) jako v kontrole (od 9,5 do 30,4 mg/l). V kontrolním vzorku (samotná kultura RIBM 89) pak na konci 72hodinové kultivace byl detekován TYM v množství  $60,6 \pm 2,5$  mg/l. Avšak produkce TYM se v přítomnosti protektivního kmene CCDM 689 v dalších hodinách kultivace nezvyšovala a na konci doby kultivace byl zjištěn v množství  $24,3 \pm 0,5$  mg/l (snížení o 60 % oproti kontrole). Srovnatelné snížení množství TYM ( $24,6 \pm 0,8$  mg/l) bylo detekováno i ve vzorcích, kde byl zaočkován k BA-produkčnímu kmenu druhý protektivní kmen – *Lc. lactis* ssp. *lactis* CCDM 686. Na rozdíl od kultury CCDM 689 ve vzorcích, kde byl naočkován kmen CCDM 686, byla pozorována nižší produkce TYM již od 5. hodiny až do konce 72hodinové kultivace oproti kontrolnímu vzorku ( $P < 0,05$ ).



Obr. 11: Vývoj produkce tyraminu kmenem *Lactiplantibacillus plantarum* RIBM 89 v přítomnosti *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* CCDM 686 a CCDM 689 při teplotě 30 °C (čas inokulace 0 h).



Obr. 12: Vývoj produkce tyraminu kmenem *Lactiplantibacillus plantarum* RIBM 89 v přítomnosti *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* CCDM 686 a CCDM 689 při teplotě 30 °C (čas inokulace 5 h).



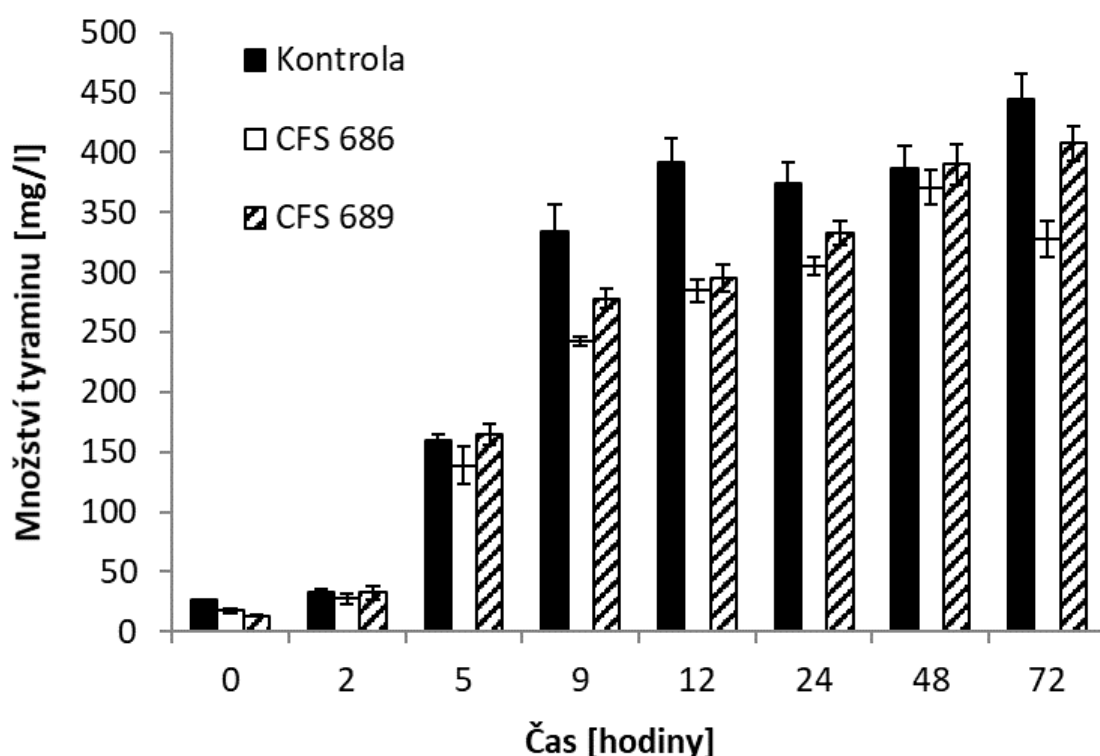
Obr. 13: Vývoj produkce tyraminu kmenem *Lactiplantibacillus plantarum* RIBM 89 v přítomnosti *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* CCDM 686 a CCDM 689 při teplotě 30 °C (čas inokulace 12 h).

Inokulace protektivní kultury CCDM 686 ke kmeni RIBM 89 po 2 a 5 hodinách kultivace tohoto kmene vedla k obdobné produkci, respektive redukci, tyraminu, jako v předchozím času inokulace protektivního kmene (Obr. 12 a Obr. 1A v Příloze II). Byl zaznamenán o 60 % nižší obsah TYM ( $24,5 \pm 0,6$  mg/l) a 63 % ( $22,6 \pm 0,4$  mg/l) oproti kontrole. Naopak po zaočkování 2. protektivního kmene CCDM 689 v čase 2 h bylo detekováno ve vzorcích na konci doby kultivace mírně vyšší obsah TYM ( $28,5 \pm 1,0$  mg/l) oproti zjištěnému obsahu TYM v předchozím čase inokulace. Nicméně se jedná o 53 % nižší vyprodukované množství TYM oproti kontrolnímu vzorku. Protektivní kmen CCDM 689 signifikantně snížil obsah TYM po zaočkování k BA-produkčnímu kmeni po 5. hodině kultivace ( $P < 0,05$ ). Na konci doby kultivace bylo detekováno snížení o 79 % porovnáním s kontrolou. V případě inokulace protektivních kultur v pozdější fázi růstu kmene BA-produkčního kmene RIBM 89 (tedy v 9., 12. a 24. hodině kultivace) nebyl zaznamenán vliv na tyrozin-dekarboxylázovou aktivitu kmene RIBM 89 (Obr. 13, Obr. 1B-C v Příloze II).

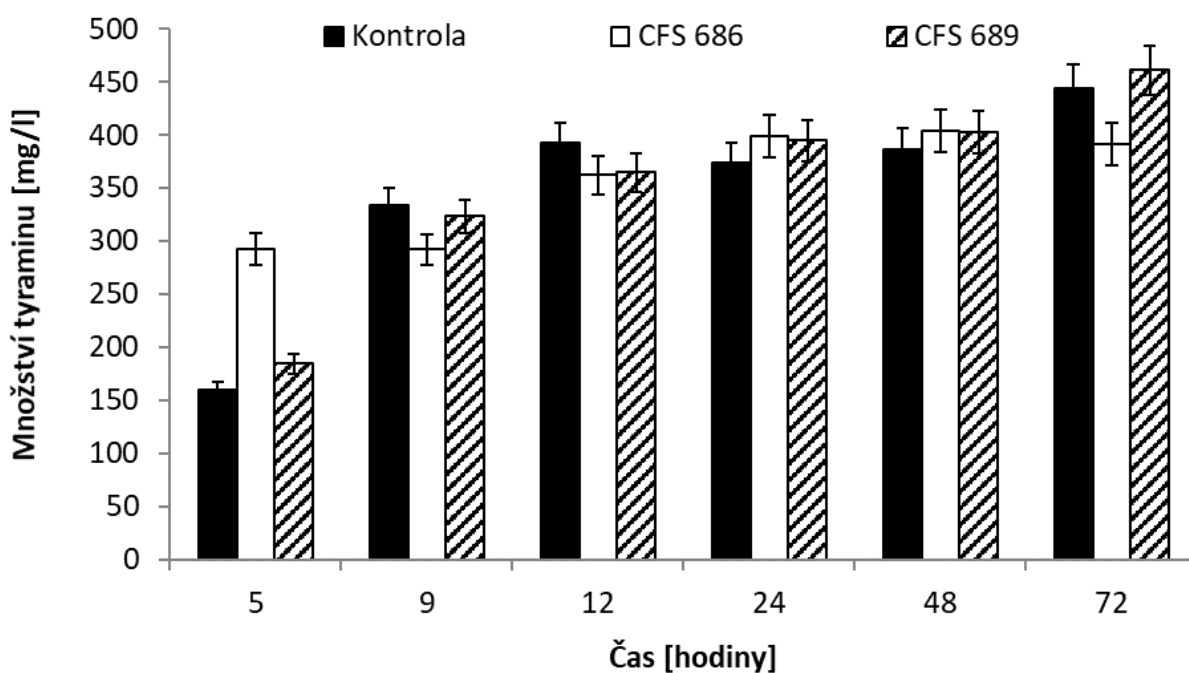
Vývoj produkce tyraminu v přítomnosti supernatantů kultury *Lc. lactis* ssp. *lactis* CCDM 686 (CFS 686) a *Lc. lactis* ssp. *lactis* CCDM 689 (CFS 689) lze pozorovat na Obr. 14–Obr. 16 (čas aplikace 0 h, 5 h a 12 h). Na Obr. 17 lze pak sledovat růst kmene RIBM 89 v přítomnosti zkoumaných supernatantů (CFS 686 a CFS 689). Z výsledků je patrné, že růst kmene RIBM 89 nebyl výrazně ovlivněn po přidání CFS 686 a CFS 689 až do 12. hodiny kultivace ( $P > 0,05$ ). Od 12. hodiny až do konce 72h kultivace lze pak sledovat mírně nižší hodnoty CFU/ml

v těchto vzorcích (8,9–9,1 log CFU/ml) než v kontrole (RIBM I: 9,4 – 9,3 log CFU/ml).

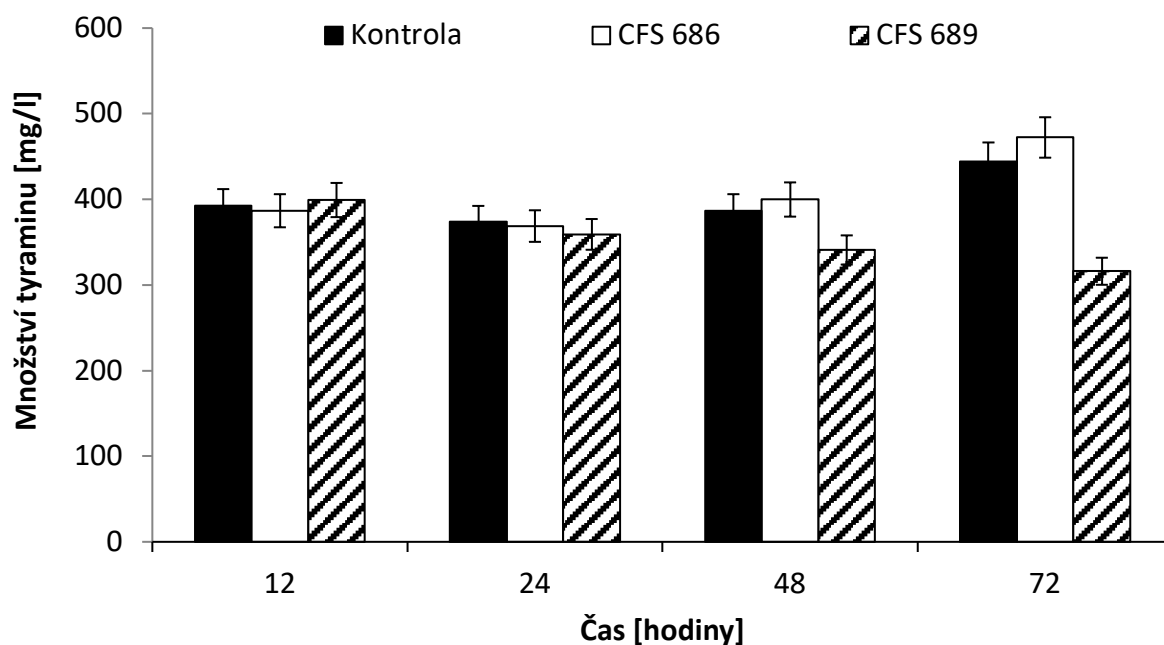
Po přidavku CFS 686 na začátku kultivace kmene RIBM 89 (čas 0 h) byla zjištěná množství TYM ve všech časech odběru nižší než v kontrolním vzorku. Koncentrace tyraminu se ve vzorcích s přidavkem CFS 686 pohybovala v rozmezí 17,4–327,8 mg/l a v rozmezí 26,4–444,2 mg/l pak v kontrolních vzorcích. Jedná se o 26% redukci obsahu TYM. V dalších časech přidavku CFS 686 s výjimkou času 5 hodin nebyl zaznamenán vliv na produkci tyraminu ( $P > 0,05$ ). Po aplikaci CFS 686 v čase 5 hodin bylo detekováno na konci 72h kultivace o 12 % nižší množství TYM než v kontrole. Co se týká účinku CFS 689, po přidání tohoto supernatantu na začátku kultivace (čas 0 h) bylo zjištěno signifikantně vyšší množství TYM ( $407,6 \pm 14,9$  mg/l) po 72 h oproti vzorkům s přidavkem CFS 686 ( $P < 0,05$ ). Obdobné množství tyraminu bylo vyprodukováno i ve vzorcích, kde byl přidán CFS 689 po 2. hodinách kultivace kmene RIBM 89 ( $405,5 \pm 14,9$  mg/l; Obr. 2A v Příloze II). V porovnání s kontrolou se jedná o 8 % a 9 % nižší obsah TYM. Signifikantnější snížení množství TYM bylo detekováno až po aplikaci CFS 689 po 12. hodině kultivace buněk kmene RIBM 89 ( $P < 0,05$ ). Na konci 72hodinové kultivace bylo sledováno snížení o 29 % srovnáním s kontrolou. V ostatních časech aplikace CFS 689 nebyl zaznamenán vliv na snížení produkce TYM (Obr. 2B-C v Příloze II).



Obr. 14: Vývoj produkce tyraminu kmenem *Lactiplantibacillus plantarum* RIBM 89 po přidavku supernatantu *Lc. lactis* ssp. *lactis* CCDM 686 (CFS 686) a supernatantu *Lc. lactis* ssp. *lactis* CCDM 689 (CFS 689) při teplotě 30 °C (čas inokulace 0 h).

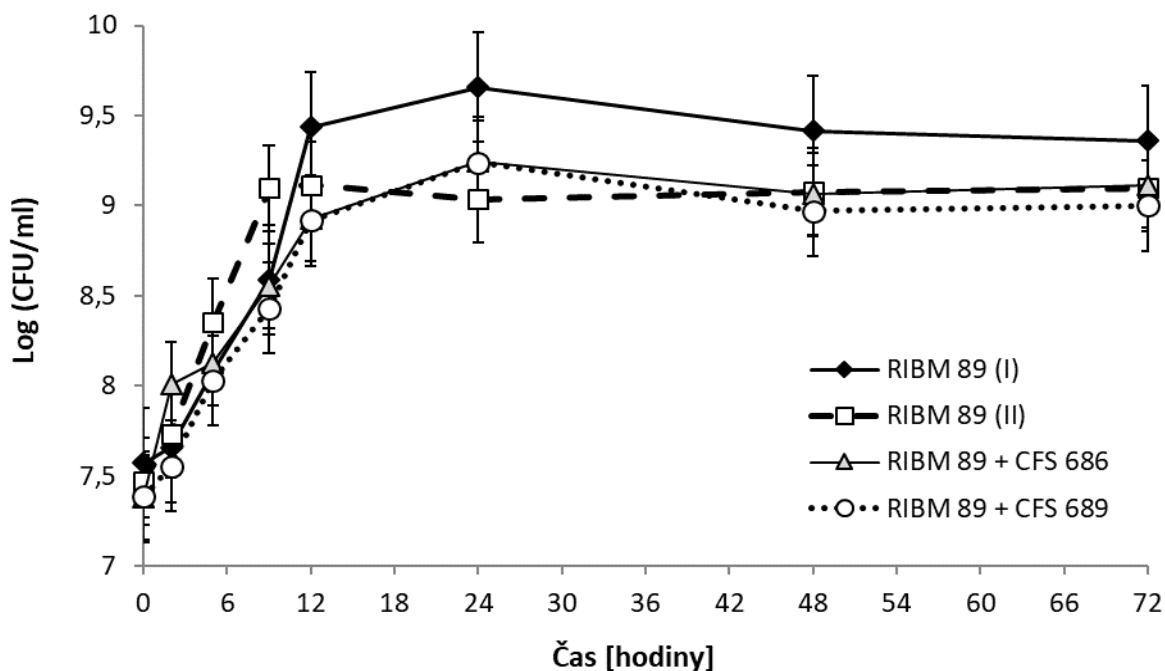


Obr. 15: Vývoj produkce tyraminu kmenem *Lactiplantibacillus plantarum* RIBM 89 po přidavku supernatantu *Lc. lactis* ssp. *lactis* CCDM 686 (CFS 686) a supernatantu *Lc. lactis* ssp. *lactis* CCDM 689 (CFS 689) při teplotě 30 °C (čas inokulace 5 h).



Obr. 16: Vývoj produkce tyraminu kmenem *Lactiplantibacillus plantarum* RIBM 89 po přidavku supernatantu *Lc. lactis* ssp. *lactis* CCDM 686 (CFS 686) a supernatantu *Lc. lactis* ssp. *lactis* CCDM 689 (CFS 689) při teplotě 30 °C (čas inokulace 12 h).



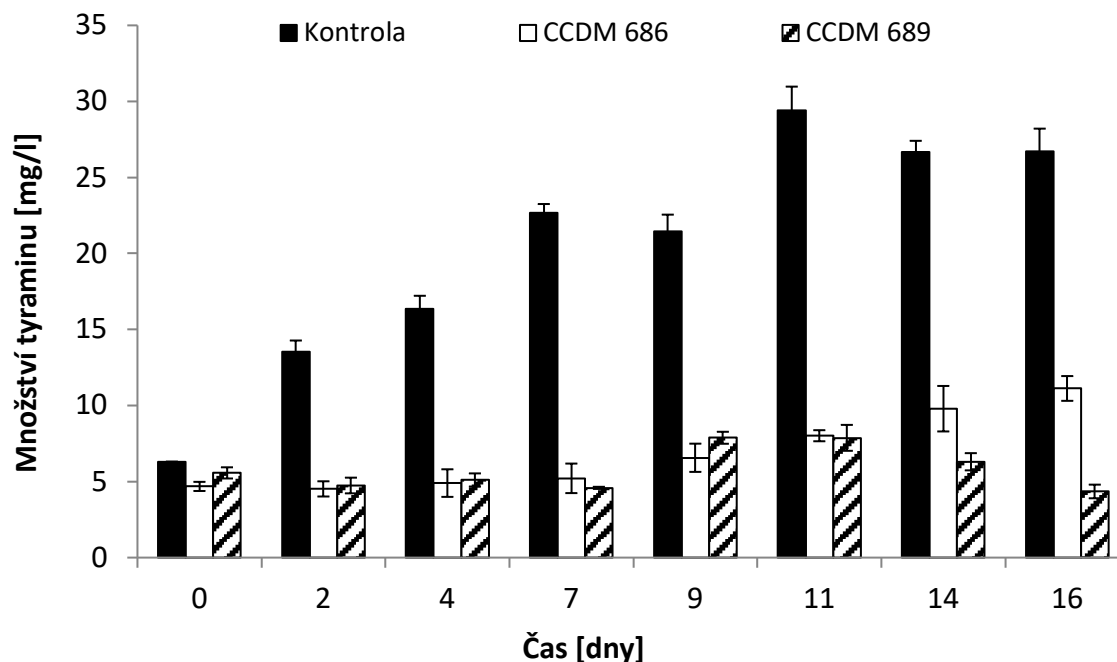


Obr. 17: Růst kultury *Lactiplantibacillus plantarum* RIBM 89 v kultivačním médiu po aplikaci supernatantů kultury CCDM 686 a CCDM 689 v čase 0 h (teplota kultivace 30 °C).

#### 4.3.2 Vliv protektivních kultur a jejich CFS na produkci tyraminu u kmene *Lactiplantibacillus plantarum* RIBM 89 při teplotě 12 °C

Vliv protektivních kultur a jejich CFS na produkci tyraminu kmenem *Lac. plantarum* RIBM 89 při teplotě 12 °C je zobrazen na Obr. 18–Obr. 23. Porovnáme-li množství vyprodukovaného TYM v kontrolních vzorcích při teplotě 30 °C a při teplotě 12 °C, lze pozorovat signifikantní snížení produkce tyraminu kmenem RIBM 89 při teplotě 12 °C ( $P < 0,05$ ). Již po 72 h při kultivaci v 30 °C byl v kontrolním vzorku pro protektivní kultury detekován TYM v množství  $60,6 \pm 2,5$  mg/l a v kontrolním vzorku pro CFS v množství  $444,2 \pm 22,2$  mg/l. Naproti tomu po 16 dnech kultivace při 12 °C bylo vyprodukované množství TYM v kontrolních vzorcích pro protektivní kultury 2x nižší ( $26,7 \pm 1,5$  mg/l) a v kontrolních vzorcích pro CFS 3x nižší ( $130,7 \pm 3,9$  mg/l). Z výsledků uvedených na Obr. 18 je evidentní i vliv zkoumaných protektivních kmenů CCDM 686 a CCDM 689 na produkci TYM kmenem *Lac. plantarum* RIBM 89. V těchto vzorcích byl pozorován od 2. dne až do konce 16denní kultivace nižší obsah TYM oproti kontrolnímu vzorku ( $P < 0,05$ ). Po inokulaci kmene *Lc. lactis* ssp. *lactis* CCDM 686 byl zjištěn obsah tyraminu ve vzorcích v koncentraci  $4,7 \pm 0,3$  mg/l a s délkou doby kultivace se jeho obsah mírně navýšil až na hodnotu  $11,1 \pm 0,1$  mg/l, avšak jednalo se o pokles 58 % oproti kontrole. Signifikantnější účinek byl pozorován po inokulaci kmene

*Lc. lactis* ssp. *lactis* CCDM 689. Na konci kultivace byl detekován o 84 % nižší obsah TYM ( $4,3 \pm 0,1$  mg/l) než v kontrolním vzorku.

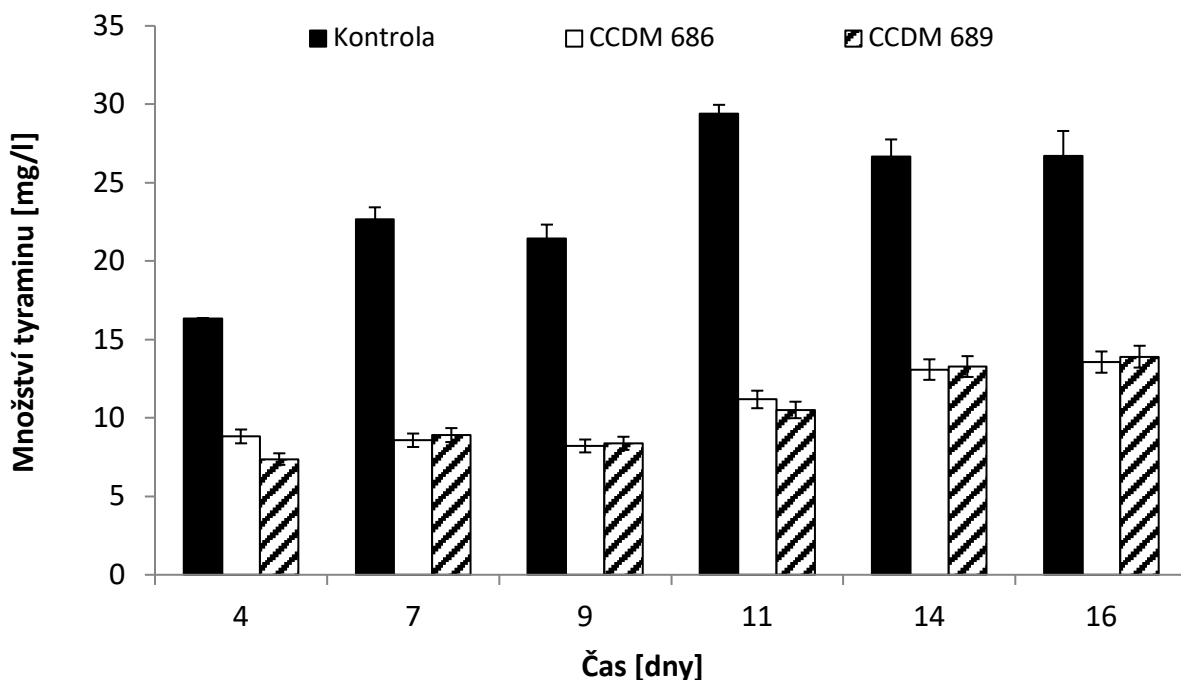


Obr. 18: Vývoj produkce tyraminu kmenem *Lactiplantibacillus plantarum* RIBM 89 v přítomnosti *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* CCDM 686 a CCDM 689 při teplotě 12 °C (čas inokulace 0. den).

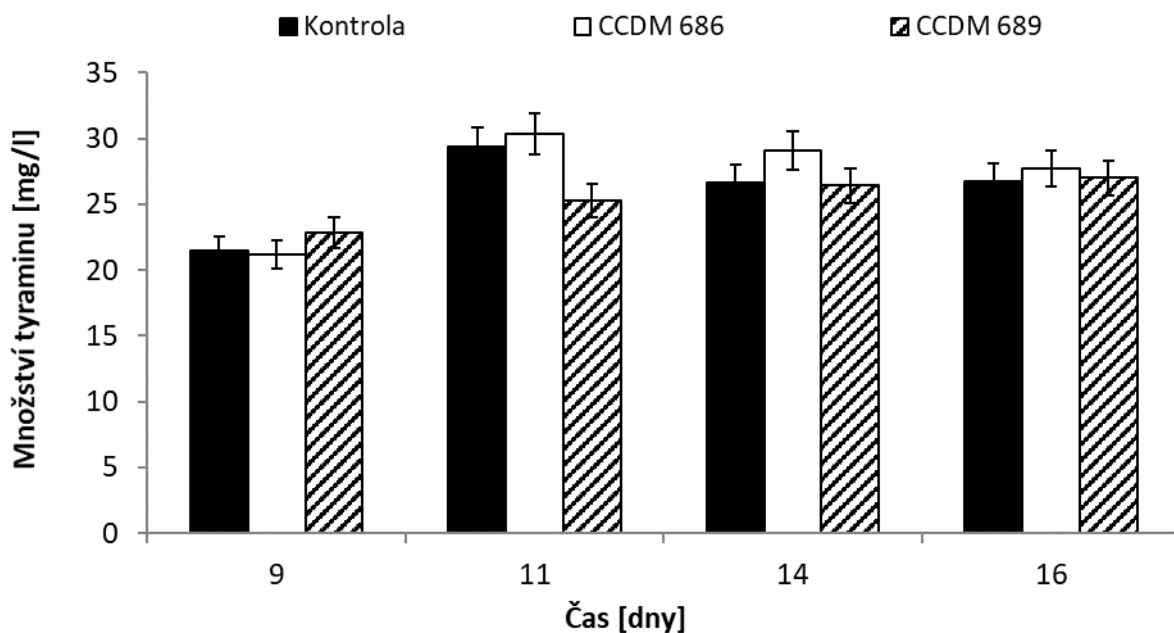
Přidavek kultury CCDM 686 a CCDM 689 po 2 dnech kultivace kmene RIBM 89 (Obr. 3A v Příloze II) vedl k poklesu účinku těchto protektivních kultur na produkci TYM ( $P < 0,05$ ). Přičemž ve vzorcích, kde byl naočkovaný kmen CCDM 689, byl pozorován dynamičtější přírůstek obsahu TYM oproti předchozímu času inokulace. Na konci 16denní kultivace byl tyramin detekován v množství  $21,6 \pm 1,0$  mg/l. Ve vzorcích, kde byl naočkovaný protektivní kmen CCDM 689, jeho koncentrace činila  $16,5 \pm 0,8$  mg/l. Nicméně detekovaná množství TYM byla o 19 %, respektive 38 % nižší než v kontrole. Inokulace kmenů CCDM 686 a CCDM 689 po 4 dnech kultivace (Obr. 19) vedla k vyšší inhibici produkce tyraminu, kdy byla pozorována během celé doby kultivace nižší produkce TYM oproti kontrolnímu vzorku ( $P < 0,05$ ). V případě přidavku kultury CCDM 686 se jednalo o snížení produkce TYM o 49 % a v případě kultury CCDM 689 o snížení o 48 %. V dalším čase inokulace (7. den kultivace) se účinek protektivních kmenů značně lišil (Obr. 3B v Příloze II). Přidavek kmene CCDM 686 vedl k poklesu produkce TYM, kdy na konci doby kultivace bylo detekováno o 34 % nižší množství TYM ( $17,6 \pm 0,9$  mg/l) než v kontrole. Naopak ve vzorcích, kde byl naočkovaný kmen CCDM 689, obsah tyraminu byl nepatrně vyšší ( $33,6 \pm 1,7$  mg/l) než v kontrolním vzorku.

Stejně jako při teplotě kultivace 30 °C inokulace protektivních kultur v pozdější fázi růstu BA-produkčního kmene RIBM 89 (tedy 9., a 11. den kultivace) neměla vliv na jeho dekarboxylázovou aktivitu (Obr. 20 a Obr. 3C v Příloze II). Po

inokulaci protektivních kmenů 9. den kultivace nebyl zaznamenán statisticky významný rozdíl v obsahu TYM ( $P > 0,05$ ) a po inokulaci 11. den byla detekována mírně vyšší množství vyprodukovaného TYM (32,6 a 33,3 mg/l) oproti kontrole (26,7 mg/l).

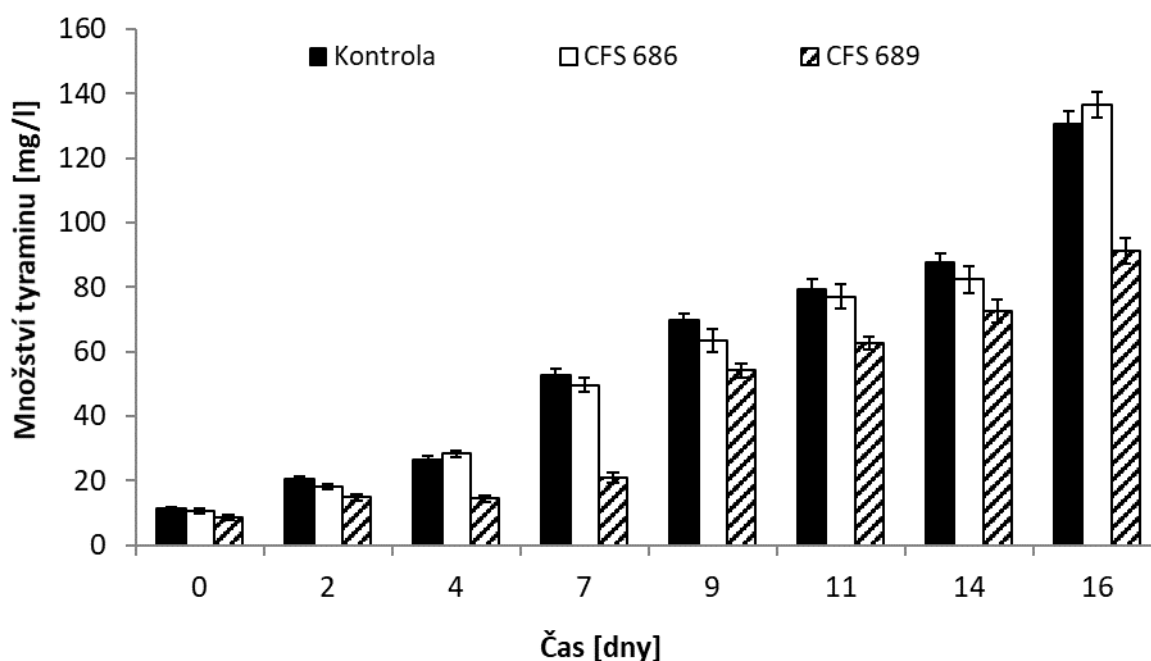


Obr. 19: Vývoj produkce tyraminu kmenem *Lactiplantibacillus plantarum* RIBM 89 v přítomnosti *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* CCDM 686 a CCDM 689 při teplotě 12 °C (čas inokulace 4. den).



Obr. 20: Vývoj produkce tyraminu kmenem *Lactiplantibacillus plantarum* RIBM 89 v přítomnosti *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* CCDM 686 a CCDM 689 při teplotě 12 °C (čas inokulace 9. den).

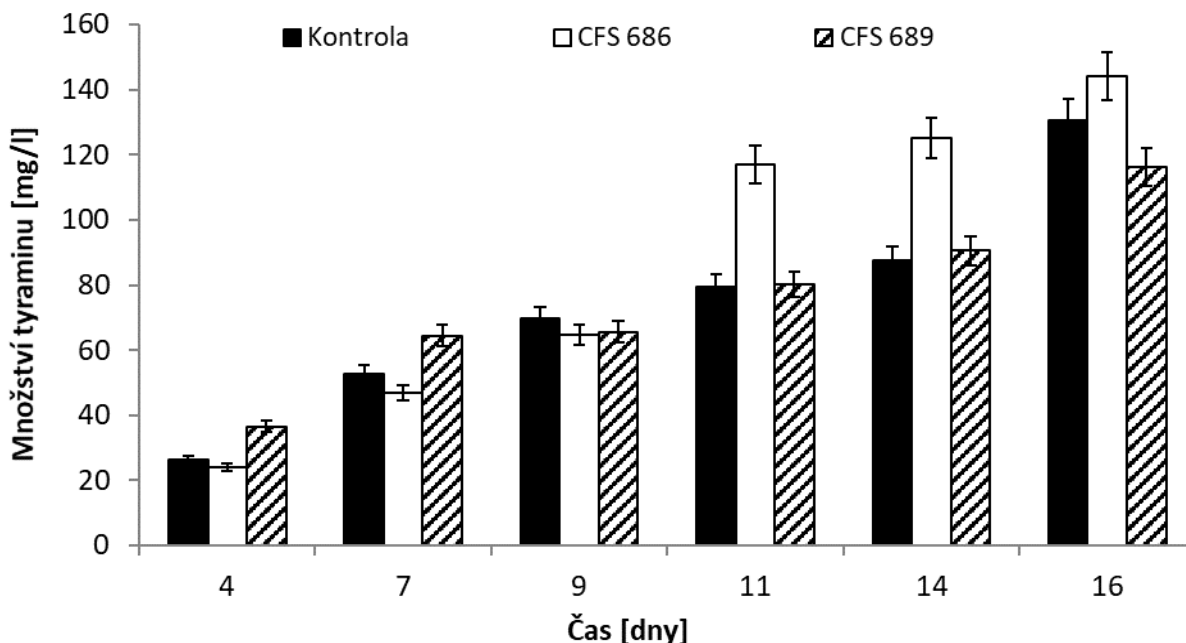
Vliv přidavku CFS 686 a CFS 689 na začátku kultivace na produkci TYM kmenem RIBM 89 je zobrazen na Obr. 21. V obou sériích lze pozorovat, že obsah sledovaného biogenního aminu se úměrně navyšoval s dobou kultivace. Avšak v případě vzorků s přidavkem CFS 689 byl pozorován od začátku až do konce 16denní kultivace nižší obsah TYM (8,5–91,3 mg/l) oproti kontrolnímu vzorku (11,5–130,7 mg/l). V případě vzorků s přidavkem CFS 686 byly během celé doby kultivace zjištěny srovnatelné hodnoty tyraminu jako u kontrolních vzorků ( $P > 0,05$ ). Tyto výsledky tak korelují s výsledky stanovení CFU/ml, kdy větší inhibiční účinek na růst buněk kmene RIBM 89 při teplotě 12 °C byl pozorován po přidavku CFS 689 (Obr. 24). Pokles produkce sledovaného BA byl detekován až po aplikaci tohoto supernatantu po 2 dnech kultivace kmene RIBM 89 (Obr. 4A v Příloze II). Produkce tyraminu byla o 22 % nižší ( $101,9 \pm 4,2$  mg/l) než v kontrolním vzorku po 16 dnech kultivace.



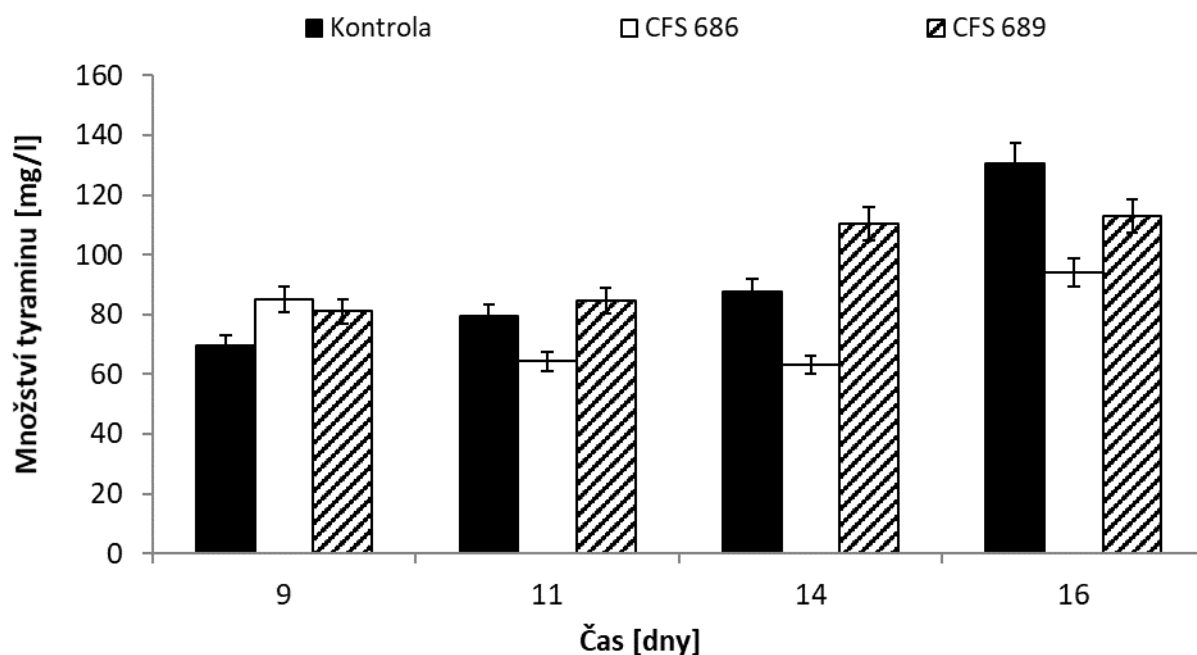
Obr. 21: Vývoj produkce tyraminu kmenem *Lactiplantibacillus plantarum* RIBM 89 po přidavku supernatantu kultury CCDM 686 (CFS 686) a supernatantu kultury CCDM 689 (CFS 689) při teplotě 12 °C (čas inokulace 0. den).

Z dalších časů aplikace CFS 686 (4., 7., 9. a 11. den kultivace kmene RIBM 89) byl pozorován inhibiční účinek na produkci TYM pouze v čase přidavku tohoto CFS 9. den kultivace (Obr. 22 a 23), kdy na konci doby kultivace koncentrace TYM činila  $94,1 \pm 2,9$  mg/l (snížení o 28 % oproti kontrole). Na rozdíl od tohoto supernatantu úbytek produkce TYM byl sledován po aplikaci CFS 689 ve všech testovaných sériích (tedy ve všech zkoumaných časech přidavku CFS). Nicméně k největšímu poklesu produkce TYM došlo ve vzorku, kde byl tento supernatant přidán po 2 dnech kultivace kmene RIBM 89. Bylo zaznamenáno nižší množství TYM o 39 % ( $80,0 \pm 3,7$  mg/l) než u kontroly. CFS 689 aplikovaný 7. a 11. den kultivace měl srovnatelný vliv na produkci TYM ( $P > 0,05$ ; Obr. 4B–C).

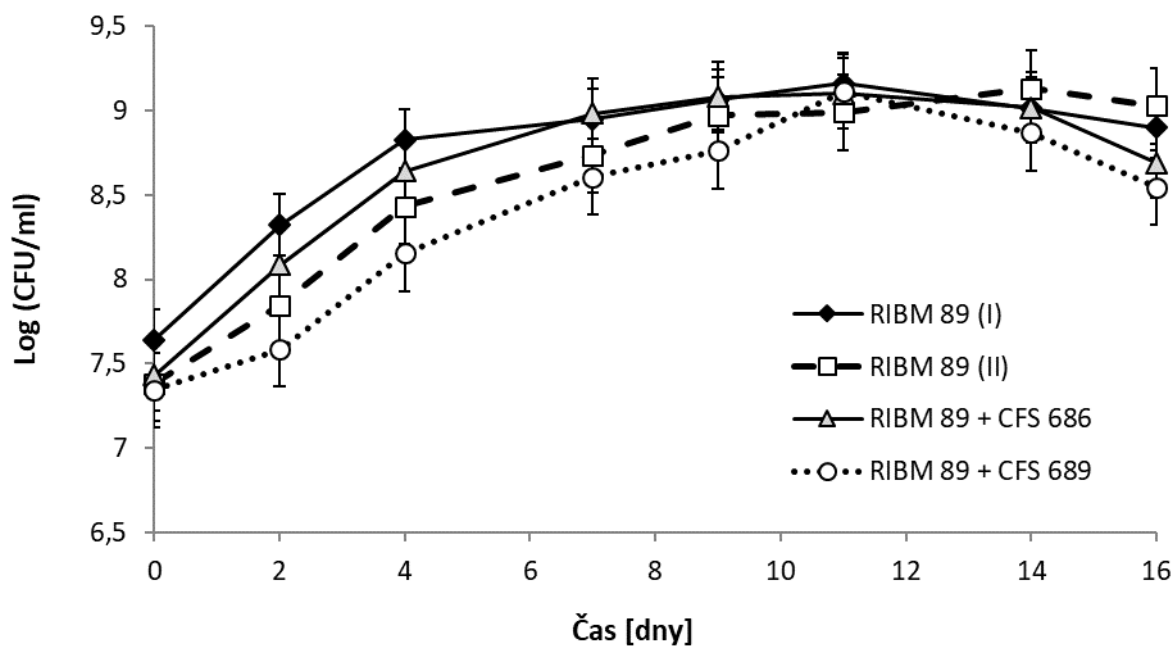
v Příloze II). V obou případech bylo detekováno snížení produkce tyraminu o 25 % oproti kontrolnímu vzorku. Nejnižší redukce obsahu TYM byla pak zjištěna po přidavku CFS 689 4. den kultivace BA-produkčního kmene. Na konci 16denní kultivace obsah tyraminu činil  $116,2 \pm 2,3$  mg/l, snížení tedy o 11 % porovnáním s kontrolou.



Obr. 22: Vývoj produkce tyraminu kmenem *Lactiplantibacillus plantarum* RIBM 89 po přidavku supernatantu kultury CCDM 686 (CFS 686) a supernatantu kultury CCDM 689 (CFS 689) při teplotě 12 °C (čas inokulace 4. den).



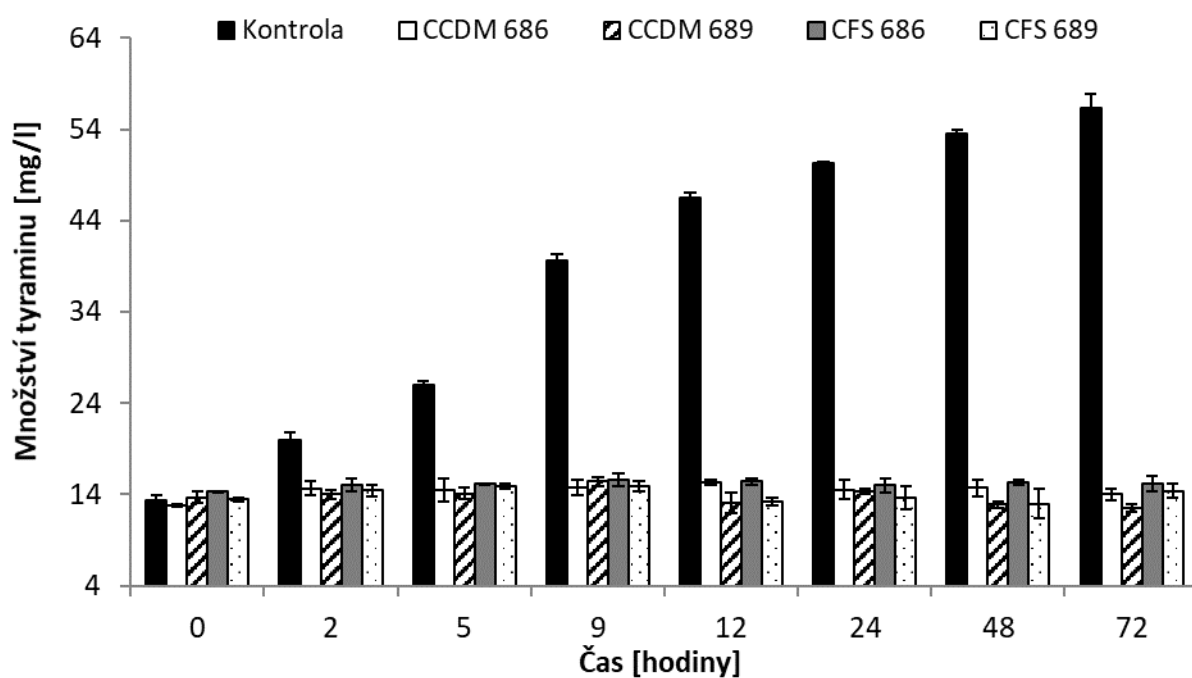
Obr. 23: Vývoj produkce tyraminu kmenem *Lactiplantibacillus plantarum* RIBM 89 po přidavku supernatantu kultury CCDM 686 (CFS 686) a supernatantu kultury CCDM 689 (CFS 689) při teplotě 12 °C (čas inokulace 9. den).



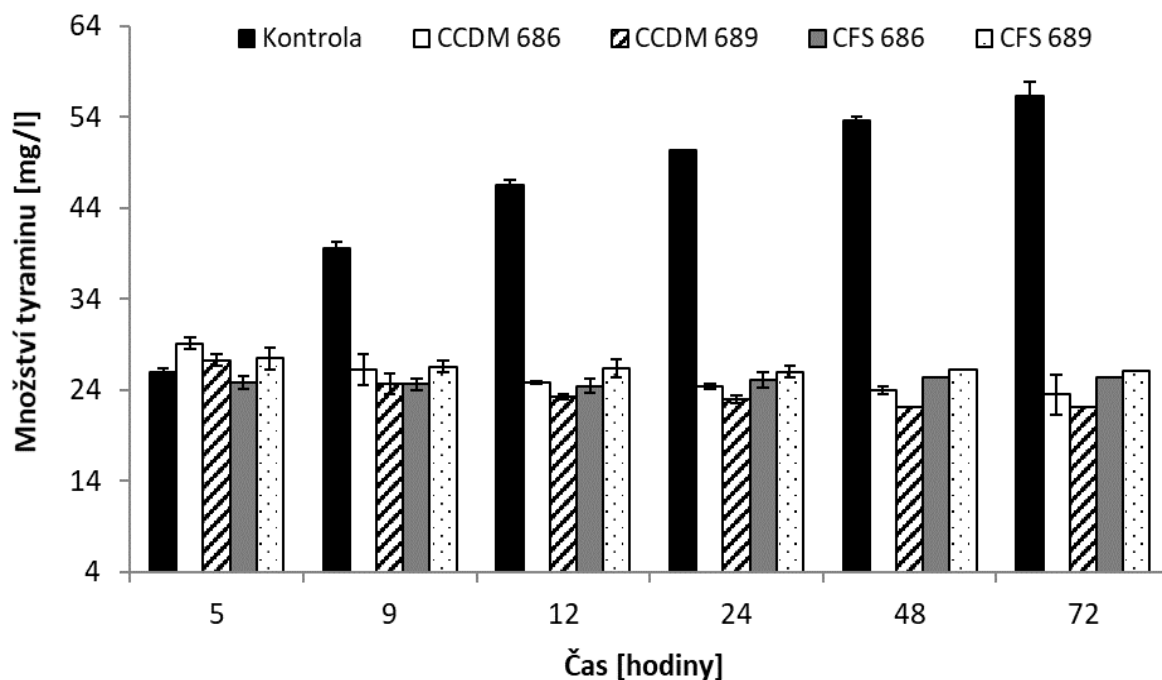
Obr. 24: Růst kultury *Lactiplantibacillus plantarum* RIBM 89 v kultivačním médiu po aplikaci supernatantů kultury CCDM 686 a CCDM 689 v čase 0 h (teplota kultivace 12 °C).

#### 4.3.3 Vliv protektivních kultur a jejich CFS na produkci tyraminu u kmene *Latilactobacillus curvatus* T3 při teplotě 30 °C

Z výsledků graficky znázorněných na Obr. 25 je možné sledovat vývoj produkce tyraminu u kmene *Latilactobacillus curvatus* T3 v přítomnosti protektivních kmenů *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* CCDM 686 a CCDM 689, které byly zaočkovány spolu s produkčním kmenem v čase 0 h (začátek experimentu). Obsah sledovaného biogenního aminu se v kontrolních vzorcích úměrně navyšoval s dobou kultivace, kdy po 72 h kultivace jeho hodnota činila  $56,3 \pm 1,6$  mg/l. V přítomnosti protektivní kultury CCDM 686 největší produkce tyraminu kmenem T3 nastala po 12 hodinách kultivace, kdy byl detekován v množství  $15,3 \pm 0,3$  mg/l. Stejné množství TYM ( $15,4 \pm 0,5$  mg/l) bylo kmenem T3 vyprodukováno již po 9. hodinách kultivace v přítomnosti kultury CCDM 689. V obou sériích vzorků se obsah tyraminu v dalších hodinách kultivace nezvyšoval, ale byl zjištěn mírný pokles vytvořeného množství TYM. Na konci doby kultivace byla detekována ve vzorcích s přídatkem kultury CCDM 686 o 75 % nižší koncentrace TYM ( $14,0 \pm 0,6$  mg/l) oproti kontrole a ve vzorcích s kulturou CCDM 689 dokonce o 78 % nižší koncentrace TYM ( $12,5 \pm 0,4$  mg/l) porovnáním s kontrolou. Po inokulaci zkoumaných protektivních kmenů po 2 hodinách (Obr. 5A v Příloze II) kultivace kmene T3 nebyl zaznamenán statisticky významný rozdíl v produkci biogenního aminu od předchozí série vzorků, kde byly kmeny zaočkovány v čase 0 h ( $P > 0,05$ ).

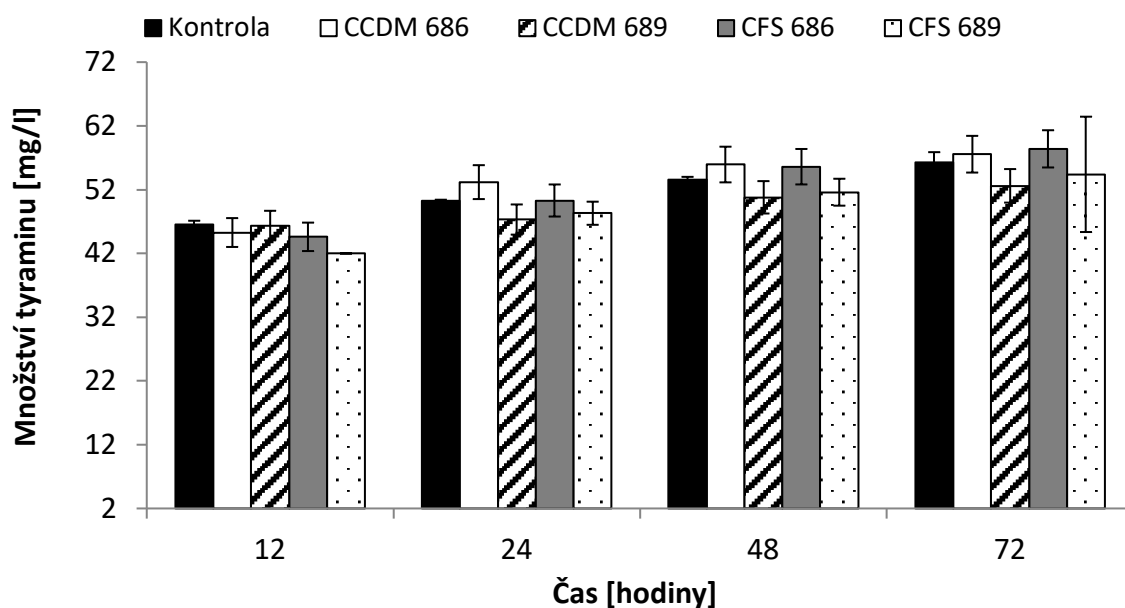


Obr. 25: Vývoj produkce tyraminu kmenem *Latilactobacillus curvatus* T3 v přítomnosti *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* CCDM 686 a CCDM 689 a jejich supernatantů (CFS 686 a CFS 689) při teplotě 30 °C (čas inokulace 0 h).



Obr. 26: Vývoj produkce tyraminu kmenem *Latilactobacillus curvatus* T3 v přítomnosti *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* CCDM 686 a CCDM 689 a jejich supernatantů (CFS 686 a CFS 689) při teplotě 30 °C (čas inokulace 5 h).

Inokulace protektivní kultury CCDM 686 k BA-produkčnímu kmeni po 5 hodinách kultivace vedla k poklesu produkce TYM o 58 % v porovnání s kontrolou a o 61 % v případě kultivace kmene T3 s kulturou CCDM 689 (Obr. 26). V pozdějších časech inokulace (9., 12. a 24. hodinu kultivace) byla pozorována signifikantně nižší schopnost protektivních kultur zabránit kumulaci tyraminu (Obr. 27 a Obr. 5B–C v Příloze II). Po zaočkování kultury CCDM 686 po 9 hodinách kultivace BA-produkčního kmene byl zaznamenán pokles produkce TYM pouze o 18 % a po inokulaci kultury CCDM 689 pouze o 13 % porovnáním s kontrolou. V případě přidavků protektivních kultur v posledních dvou sledovaných časech nebyla produkce sledovaného biogenního aminu ovlivněna ( $P > 0,05$ ).

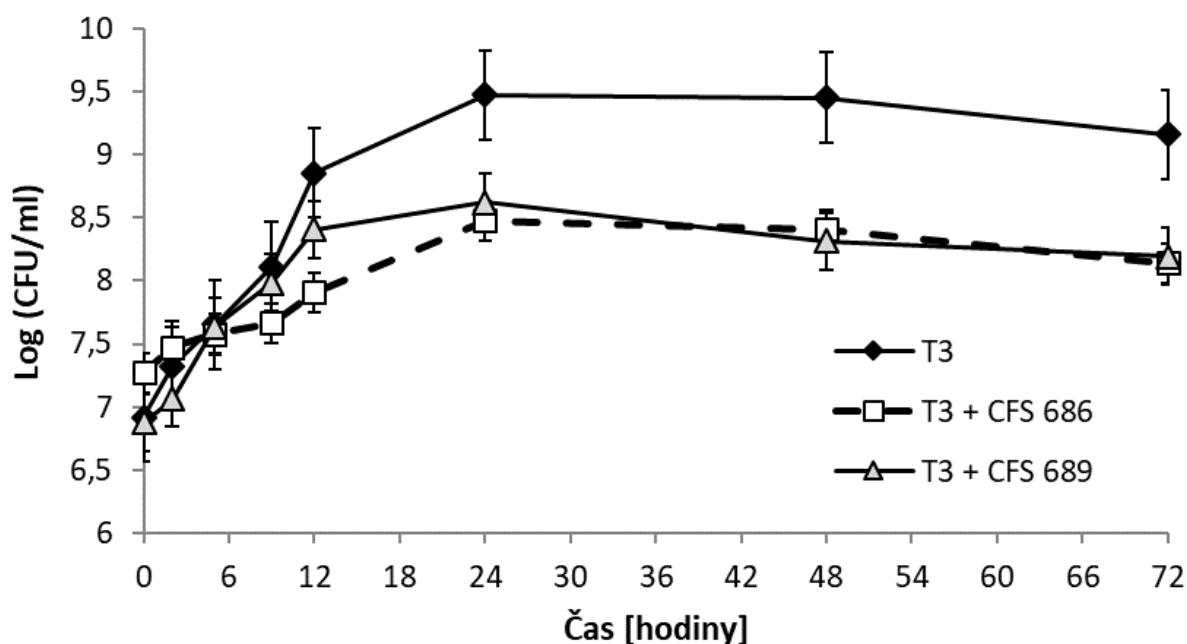


Obr. 27: Vývoj produkce tyraminu kmenem *Latilactobacillus curvatus* T3 v přítomnosti *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* CCDM 686 a CCDM 689 a jejich supernatantů (CFS 686 a CFS 689) při teplotě 30 °C (čas inokulace 12 h).

V grafu na Obr. 25 je zobrazena produkce tyraminu u kmene *Lat. curvatus* T3 v kultivačních médiích s přidavky CFS 686 a CFS 689, které byly zaočkovány spolu s produkčním kmenem v čase 0 h. Z výsledků je patrné, že vyprodukovaná množství TYM kmenem T3 v přítomnosti supernatantů protektivních kultur jsou signifikantně nižší již od 2. hodiny kultivace až do konce experimentu oproti kontrole ( $P < 0,05$ ). Obsah tyraminu po 72 hodinách kultivace kmene T3 v přítomnosti CFS 686 byl o 73 % nižší ( $15,2 \pm 0,8$  mg/l) a v přítomnosti CFS 689 o 74 % nižší ( $14,4 \pm 0,7$  mg/l) porovnáním s kontrolou. Z výsledků uvedených na Obr. 28 je možné sledovat, že v přítomnosti obou testovaných CFS byl růst kmene T3 inhibován. V kontrolních vzorcích se počty laktobacilů pohybovaly v rozmezí 6,9–9,1 log CFU/ml. Naproti tomu ve vzorcích s přidavky CFS byl kmen T3 detekován v počtech 7,0–8,1 log CFU/ml.



Statisticky významný rozdíl v produkci biogenního aminu kmenem T3 v dalším čase aplikace CFS nebyl zaznamenán ( $P > 0,05$ ). Snížení účinků supernatantů se projevil až po aplikaci v čase 5 hodin, kdy měl produkční kmen více času na akumulaci tyraminu. Přesto byla zjištěna redukce obsahu TYM ve vzorcích s přidavkem CFS 686 o 55 % ( $25,3 \pm 0,9$  mg/l) a ve vzorcích s přidavkem CFS 689 o 54 % ( $26,1 \pm 0,6$  mg/l) porovnáním s kontrolou. V případě přidavků supernatantů v pozdější fázi růstu BA-produkčního kmene T3 (tedy po 9., 12. a 24. hodinách kultivace) nebyl zaznamenán vliv na tyrozin-dekarboxylázovou aktivitu tohoto kmene.

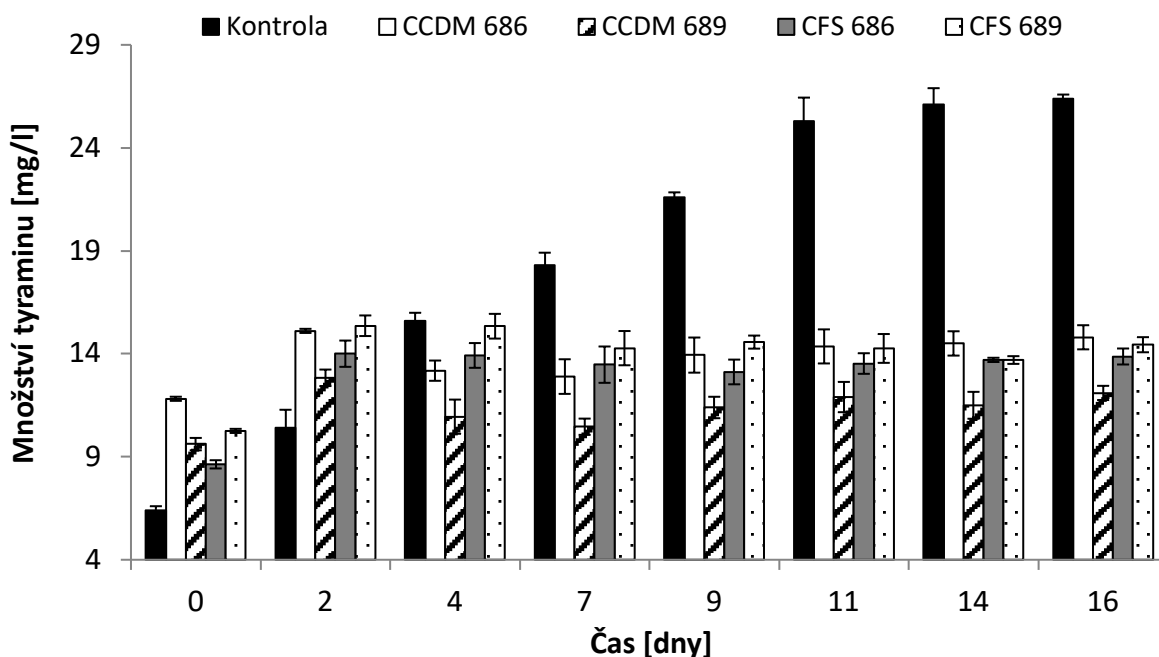


Obr. 28: Růst kultury *Latilactobacillus curvatus* T3 v kultivačním médiu po aplikaci supernatantů kultury CCDM 686 a CCDM 689 v čase 0 h (teplota kultivace 30 °C).

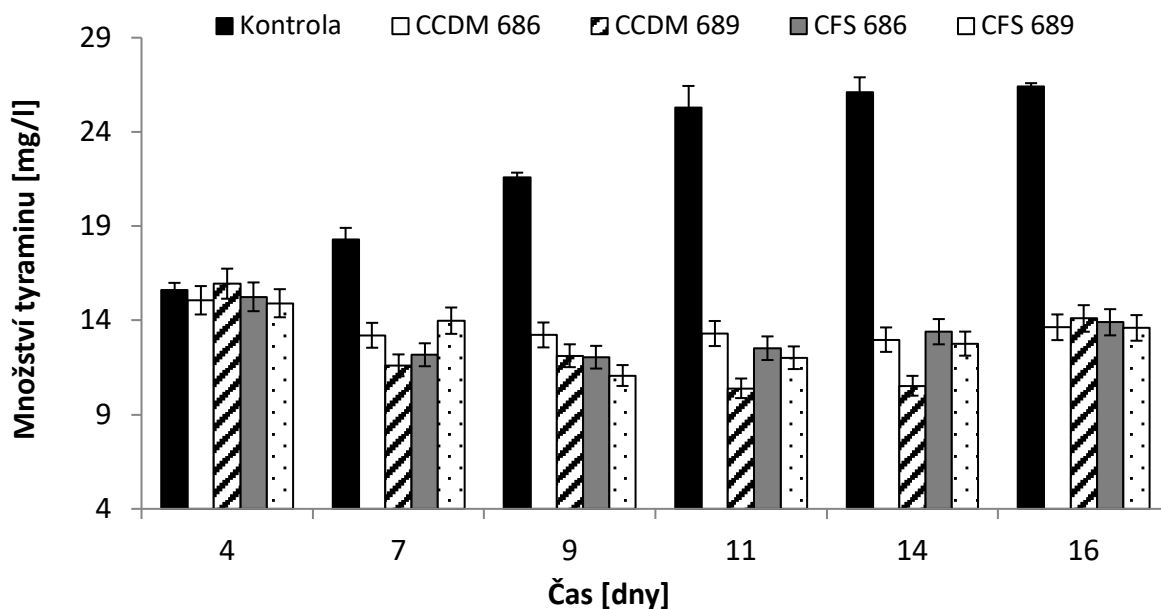
#### 4.3.4 Vliv protektivních kultur a jejich CFS na produkci tyraminu u kmene *Latilactobacillus curvatus* T3 při teplotě 12 °C

Na začátku kultivace kmene *Lat. curvatus* T3 (0. den) v kontrolních vzorcích byl tyramin detekován v množství  $6,4 \pm 0,2$  mg/l. Jeho obsah se mírně navyšoval až do 14. dne, kdy byl detekován v koncentraci 26 mg/l a do konce 16. denní kultivace stagnovala na tomto množství (Obr. 29). Ve vzorcích s přidavkem kultury CCDM 686 byl TYM na začátku experimentu zjištěn v množství  $11,8 \pm 0,1$  mg/l. Po 2 dnech kultivace se jeho obsah zvýšil na hodnotu  $15,1 \pm 0,1$  mg/l a od této doby se jeho obsah nezvyšoval a na konci doby kultivace byl detekován v množství  $14,8 \pm 0,6$  mg/l (o 44 % nižší obsah TYM než v kontrole). Obdobný trend produkce tyraminu kmenem T3 byl sledován i v přítomnosti kultury CCDM 689. Největší produkce TYM ( $12,8 \pm 0,4$  mg/l) byla zaznamenána po 2 dnech kultivace kmene T3 v přítomnosti protektivní

kultury CCDM 689. Od této doby se produkce TYM nezvyšovala a po 16 dnech obsah TYM činil  $12,1 \pm 0,3$  mg/l (o 54 % nižší obsah TYM než v kontrole).



Obr. 29: Vývoj produkce tyraminu kmenem *Latilactobacillus curvatus* T3 v přítomnosti *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* CCDM 686 a CCDM 689 a jejich supernatantů (CFS 686 a CFS 689) při teplotě 12 °C (čas inokulace 0. den).

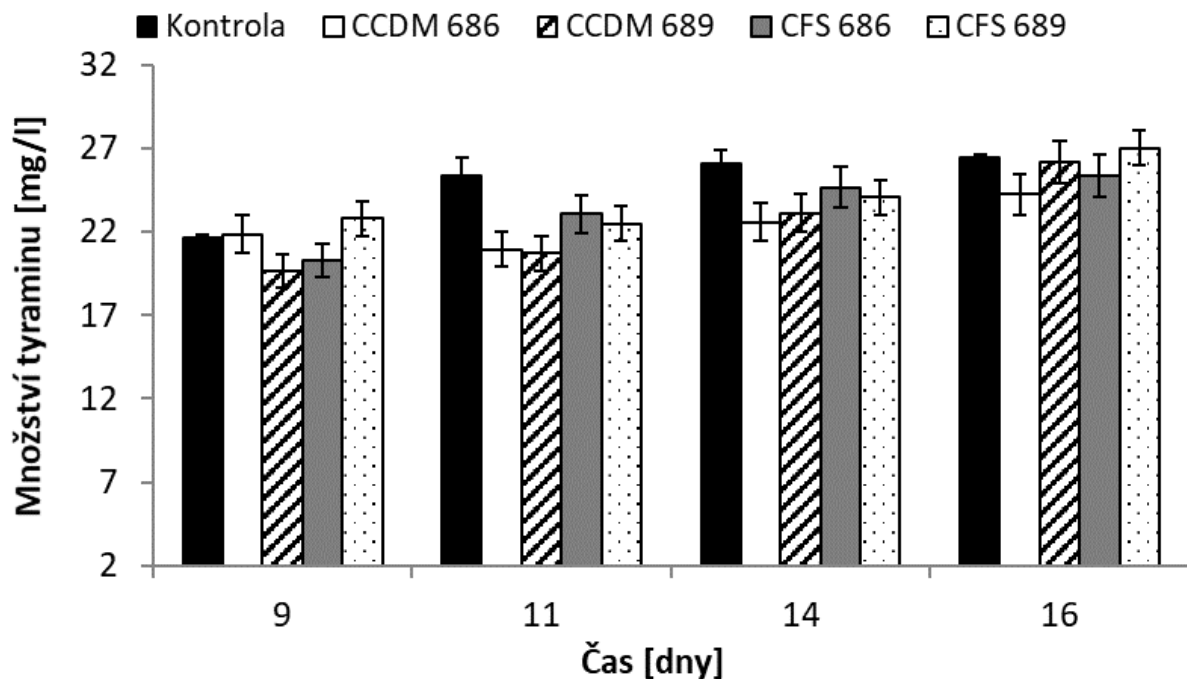


Obr. 30: Vývoj produkce tyraminu kmenem *Latilactobacillus curvatus* T3 v přítomnosti *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* CCDM 686 a CCDM 689 a jejich supernatantů (CFS 686 a CFS 689) při teplotě 12 °C (čas inokulace 4. den).

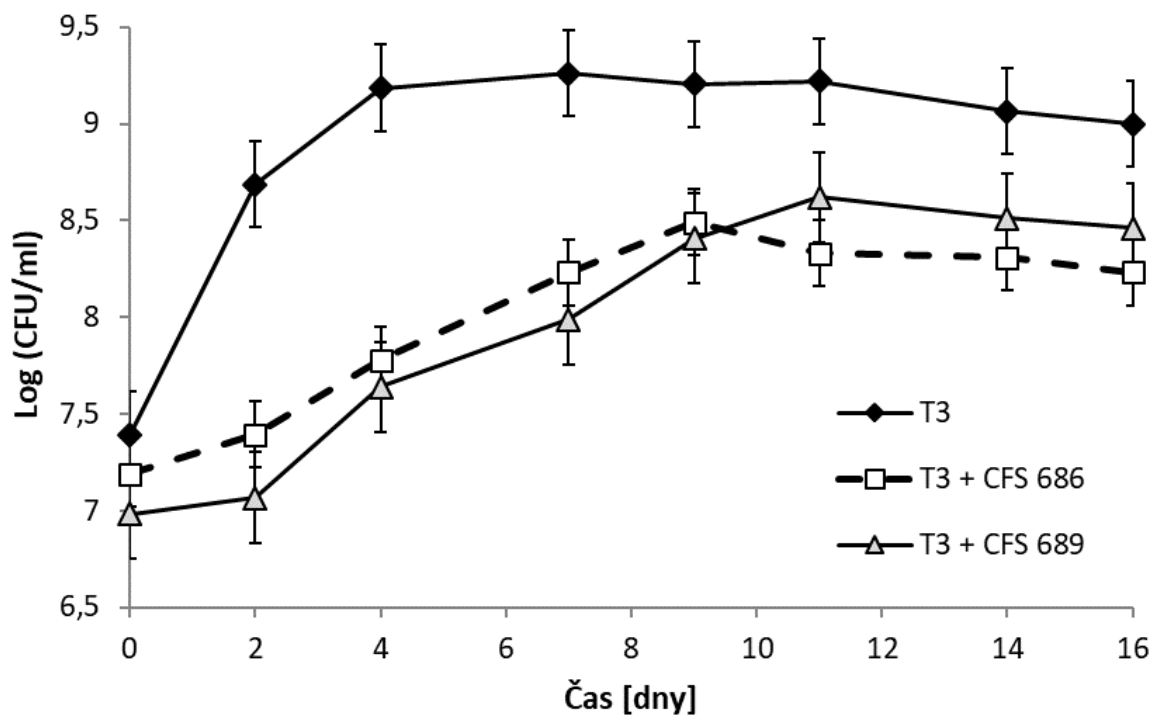
Kinetika produkce sledovaného biogenního aminu byla srovnatelná i po inokulaci protektivních kmenů po 2 a 4 dnech kultivace kmene T3 ( $P > 0,05$ ). V případě inokulace laktokoků po 2 dnech byl TYM na konci doby kultivace zjištěn v koncentraci o 46 % (T3 a CCDM 686) a o 54 % (T3 a CCDM 689) nižší než u kontroly (Obr. 6A v Příloze II). Po inokulaci protektivního kmene CCDM 686 v 4. den od začátku experimentu byl TYM detekován po 16 dnech v množství  $13,6 \pm 0,4$  mg/l (snížení o 48 %) a po inokulaci kmene CCDM 689 jeho obsah činil  $14,1 \pm 0,6$  mg/l (snížení o 47 %, Obr. 30).

Rovněž přidavek supernatantů protektivních kultur měl u tohoto dekarboxyláza-pozitivního kmene nezanedbatelný vliv na snížení produkce TYM, pokud byly CFS aplikovány do 7. dne kultivace (začátek stacionární fáze růstu, Obr. 32). Po aplikaci CFS 686 a CFS 689 na začátku kultivace (0. den), největší vyprodukovaná množství TYM (14,0 mg/l a 15,4 mg/l) byla pozorována po 2 dnech kultivace kmene T3. Od této doby se jeho obsah nezvyšoval a na konci 16denní kultivace byl zjištěn ve vzorcích s přidavkem CFS 686 v množství  $13,9 \pm 0,4$  mg/l a ve vzorcích s přidavkem CFS 689 v množství  $14,4 \pm 0,4$  mg/l. V prvním případě se jedná o redukci tyraminu o 47 % oproti kontrole a v druhém případě o 45% snížení produkce tyraminu porovnáním s kontrolou. Z Obr. 32 je patrné, že i růstové chování kmene T3 v přítomnosti obou supernatantů bylo obdobné. Srovnatelné výsledky produkce TYM, respektive redukce TYM, byly zjištěny i po přidavcích supernatantů po 2 a 4 dnech kultivace kmene *Lat. curvatus* T3.

V dalších časech inokulace (7., 9. a 11. den od začátku experimentu) produkce tyraminu kmenem T3 nebyla ovlivněna ani v přítomnosti protektivních kmenů *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* CCDM 686 a CCDM 689, ani jejich supernatantů ( $P > 0,05$ ; Obr. 31 a Obr. 6B–C v Příloze II).



Obr. 31: Vývoj produkce tyraminu kmenem *Latilactobacillus curvatus* T3 v přítomnosti *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* CCDM 686 a CCDM 689 a jejich supernatantů (CFS 686 a CFS 689) při teplotě 12 °C (čas inokulace 9. den).



Obr. 32: Růst kultury *Latilactobacillus curvatus* T3 v kultivačním médiu po aplikaci supernatantů kultury CCDM 686 a CCDM 689 v čase 0 h (teplota kultivace 12 °C).

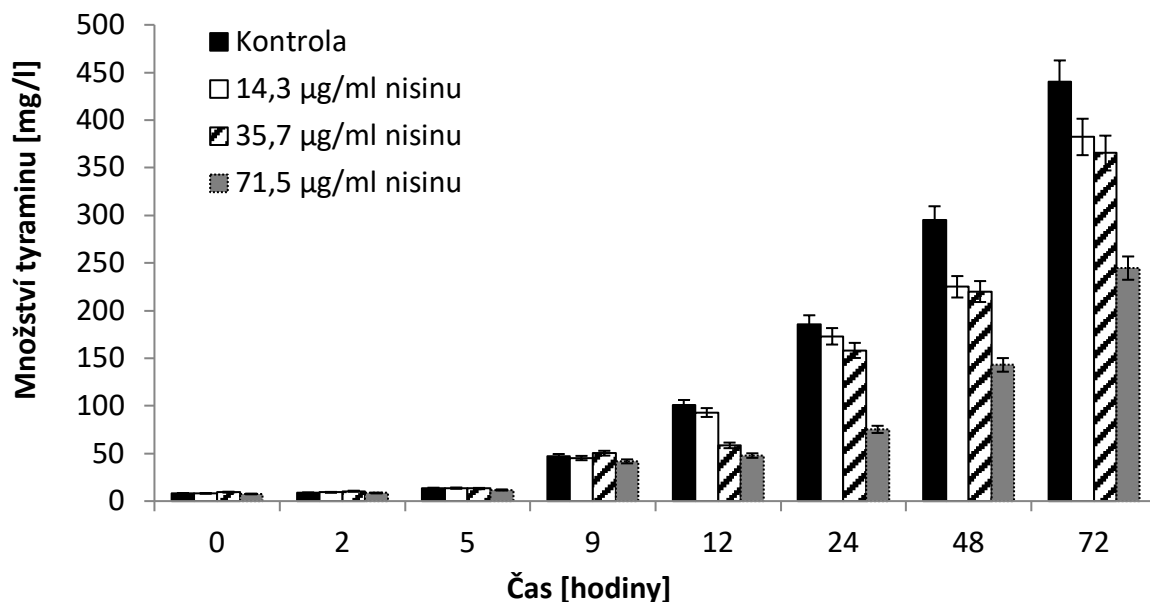
## 4.4 Výsledky Experimentu IV

V rámci Experimentu IV byl sledován vliv nisinu na kinetiku produkce tyraminu u kmenů citlivých na tento bakteriocin. Na základě získaných výsledků z Experimentu I a Experimentu II byly vybrány kmeny *Lactilactobacillus curvatus* T3 a *Lactiplantibacillus plantarum* RIBM 89. Byly zvoleny 3 koncentrace nisinového přípravku: 14,3 µg/ml; 35,7 µg/ml a 71,5 µg/ml. Testované koncentrace byly navrženy tak, aby došlo k částečné, nikoliv k úplné inhibici růstu kmenů s dekarboxylázovou aktivitou. Vliv jednotlivých koncentrací nisinu na produkci tyraminu byl sledován rovněž v závislosti na teplotě kultivace ( $12 \pm 1$  °C a  $30 \pm 1$  °C) a přidavku nisinu v různých časových intervalech kultivace kmenů T3 a RIBM 89. Během kultivace při teplotě  $30 \pm 1$  °C bylo dávkování uskutečněno v čase 0 hodin (začátek experimentu), dále pak po 2, 5, 9, 12 a 24 hodinách kultivace tyramin-produkujících kmenů. Při teplotě  $12 \pm 1$  °C bylo dávkování uskutečněno 0. den (začátek experimentu), dále pak ve 2., 4., 7., 9. a 11. den kultivace. Při těchto časech byly paralelně odebírány vzorky pro stanovení obsahu TYM. Kontrolní vzorky byly kultivovány bez přidavku nisinu. Kombinace všech faktorů byla testována v trojím opakování. Počty buněk byly stanoveny nepřímou plotnovou metodou. Výsledné počty CFU/ml jsou ve formě logaritmu graficky znázorněny na Obr. 34 a Obr. 38.

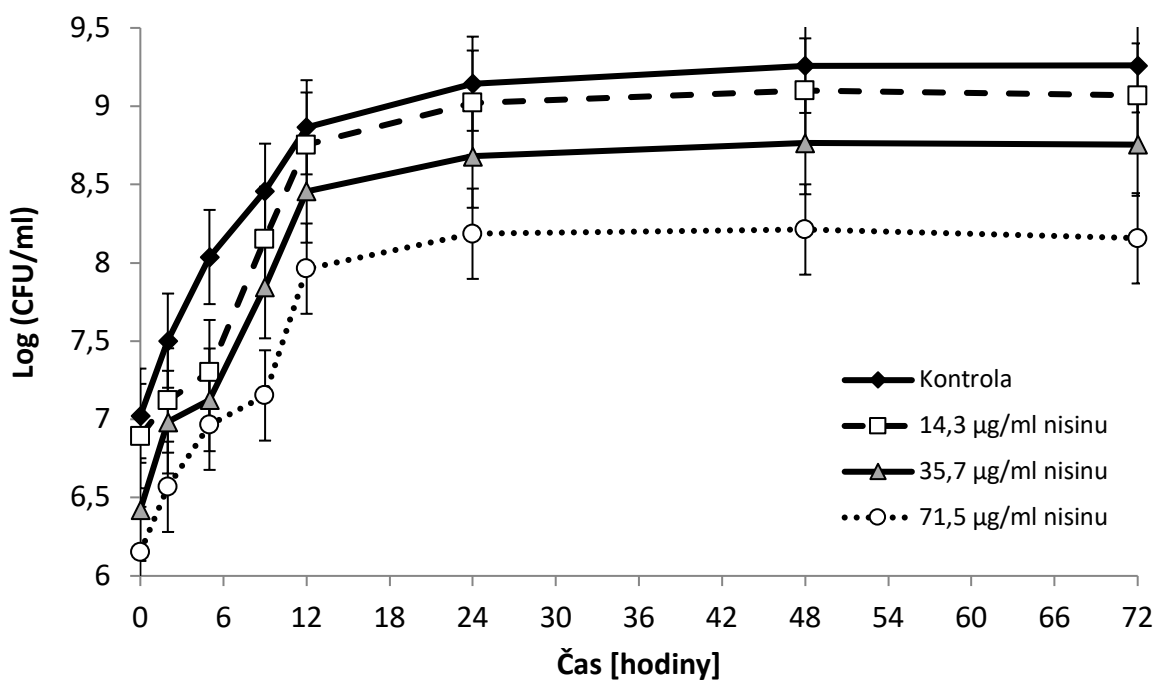
### 4.4.1 Vliv nisinu na produkci tyraminu u kmene *Lactiplantibacillus plantarum* RIBM 89 při teplotě 30 °C

V grafu na Obr. 33 je možné sledovat vývoj produkce tyraminu u kmene *Lac. plantarum* RIBM 89 v kultivačních médiích s přidavky nisinu ve 3 zkoumaných koncentracích, které byly zaočkovány spolu s produkčním kmenem v čase 0 h (začátek experimentu). Z výsledků je patrné, že nisin ani v 1 testované koncentraci neměl výrazný vliv na produkci TYM ( $P > 0,05$ ) až do 12. hodiny kultivace. Množství TYM se v těchto vzorcích pohybovalo v rozmezí od 41,7 mg/l do 50,3 mg/l. Obdobná množství tyraminu byla sledována i v kontrolním vzorku ( $47,1 \pm 3,7$  mg/l). Od 12. hodiny kultivace lze ve všech vzorcích s přidavkem nisinu pozorovat nižší obsah TYM, avšak pouze u vzorků s přidavkem nisinu ve 2 nejvyšších koncentracích bylo zaznamenáno statisticky významné snížení obsahu TYM oproti kontrole ( $P < 0,05$ ). Ve vzorcích s přidavkem nisinu o koncentraci 35,7 mg/l byl zjištěn o 42 % nižší obsah TYM a ve vzorcích s přidavkem nisinu o koncentraci 71,5 mg/l o 53 % nižší obsah TYM oproti kontrole. Nicméně s dobou kultivace se ve všech vzorcích zvyšoval obsah tyraminu. Tento trend lze vysvětlit faktem, že aplikované koncentrace nisinu byly subletální. Tudíž nedošlo k usmrcení všech buněk kmene RIBM 89, a to ani v nevyšší testované koncentraci nisinu (Obr. 34), ale dochází pouze ke snížení počtu buněk schopných dekarboxylace tyrozinu. S tímto korespondují i nižší detekovaná množství tyraminu v těchto vzorcích na konci 72hodinové kultivace. Účinek nisinu ve dvou nejnižších koncentracích na produkci TYM

kmenem RIBM 89 byl obdobný ( $P>0,05$ ). Nisin v nejnižší testované koncentraci snížil produkci TYM o 13 % a v další zkoumané koncentraci (35,7  $\mu\text{g/ml}$ ) došlo ke snížení produkce TYM o 17 %. Výraznější snížení bylo pak zaznamenáno ve vzorcích s nejvyšší koncentrací nisinu (71,5  $\mu\text{g/ml}$ ), a to snížení o 44 % porovnáním s kontrolou ( $P<0,05$ ).

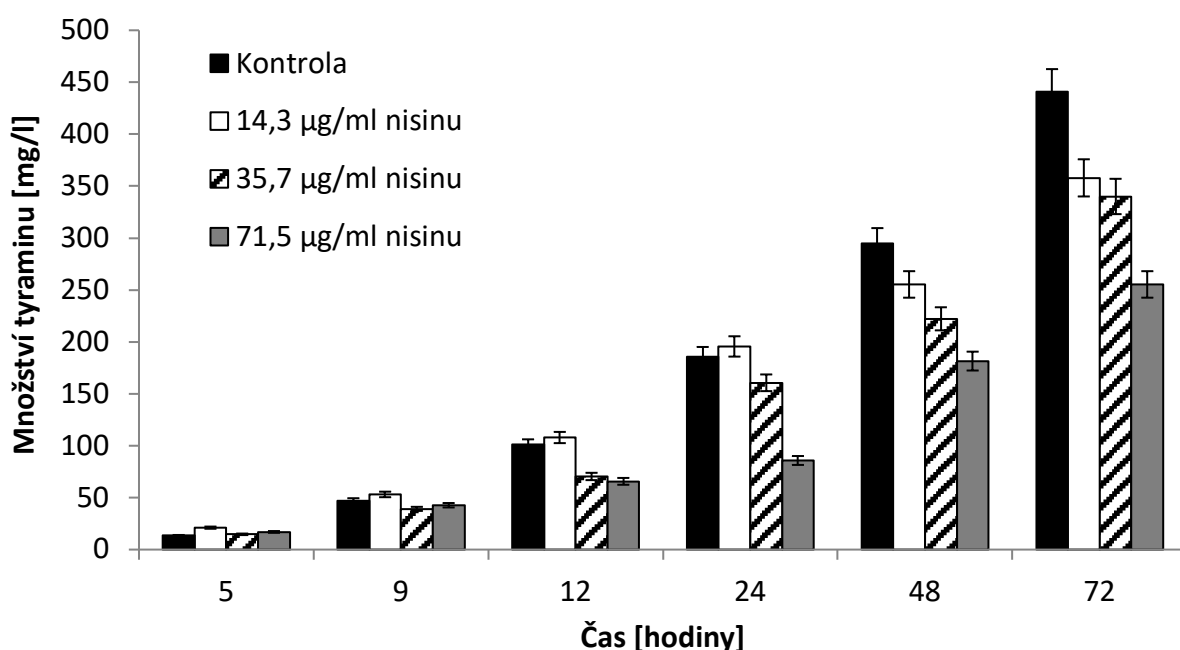


Obr. 33: Vliv nisinu na produkci tyraminu kmenem *Lactiplantibacillus plantarum* RIBM 89 při teplotě 30 °C (čas aplikace 0 h).



Obr. 34: Vliv nisinu na růst kmene *Lactiplantibacillus plantarum* RIBM 89 při teplotě 30 °C (čas aplikace 0 h).

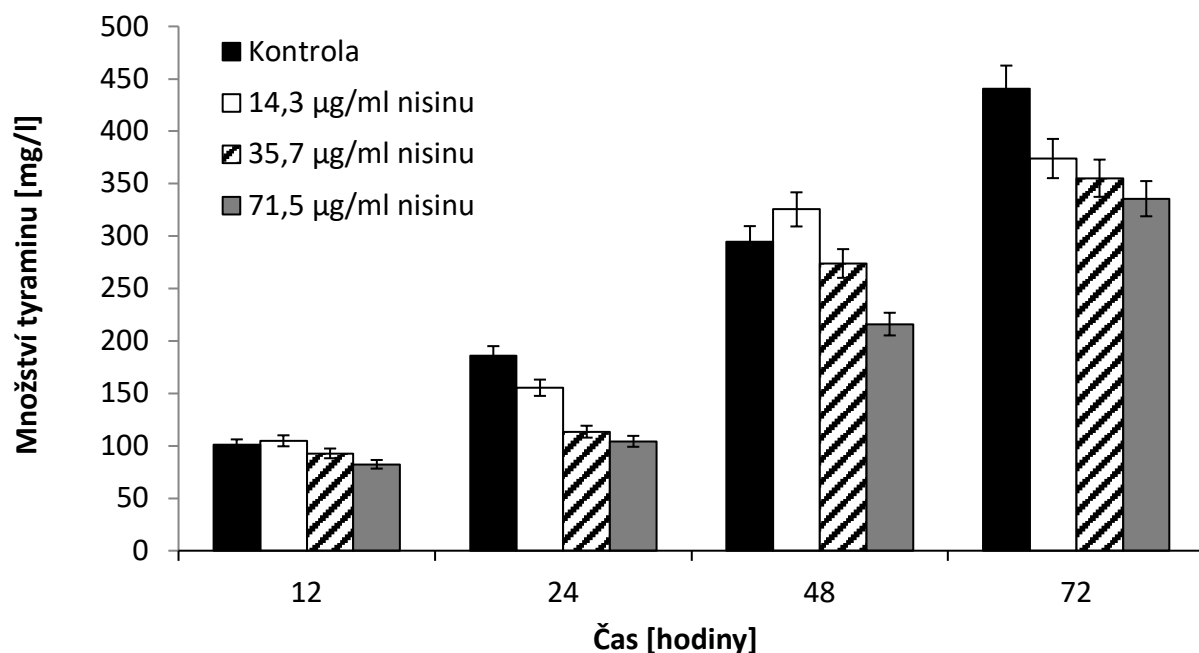
Stejně jako v předchozí sérii vzorků (ve vzorcích, kde byl nisin aplikován po 2 hodinách kultivace buněk kmene RIBM 89), bylo pozorováno postupné zvyšování obsahu TYM s dobou kultivace (Obr. 7A v Příloze II). Zajímavým jevem pozorovaným po aplikaci nisinu v nejnižší koncentraci byla detekce vyššího obsahu TYM ( $313,1 \pm 7,8$  mg/l) oproti kontrolnímu vzorku ( $274,8 \pm 7,1$  mg/l) v čase odběru 48 hodin. Nicméně na konci doby kultivace (po 72 hodinách) byl detekován ve všech vzorcích s přidavkem nisinu nižší obsah vyprodukovaného TYM ( $P < 0,05$ ). Největší snížení pak bylo zaznamenáno ve vzorcích s nejvyšší testovanou koncentrací nisinu. Konkrétně byl detekován o 60 % nižší obsah TYM ( $177,3 \pm 12,0$  mg/l) oproti kontrole ( $440,6 \pm 8,1$  mg/l). Ve vzorcích s přidavkem nisinu o koncentraci  $35,7 \mu\text{g/ml}$  došlo k poklesu TYM o 29 % a nisin v nejnižší zkoumané koncentraci snížil produkci TYM o 12 %. Srovnatelné snížení produkce TYM (23 % a 19 %) bylo pozorováno i ve vzorcích se stejnými koncentracemi nisinu, ale aplikovaných po 5 hodinách kultivace kmene RIBM 89 (Obr. 35). Statisticky významné snížení účinku nisinu na produkci, respektive redukci, TYM oproti předchozímu času aplikace (2 h) bylo pak sledováno pouze v nejvyšší testované koncentraci ( $P < 0,05$ ). Přesto byla zjištěna redukce obsahu TYM o 42 % porovnáním s kontrolou.



Obr. 35: Vliv nisinu na produkci tyraminu kmenem *Lactiplantibacillus plantarum* RIBM 89 při teplotě  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$  (čas aplikace 5 h).

V případě aplikace nisinu v dalších hodinách kultivace BA-produkčního kmene RIBM 89 (tedy 9., 12. a 24. hodinu kultivace) byl zaznamenán snižující se účinek nisinu na produkci TYM (Obr. 36 a Obr. 7B–C v Příloze II). Přídavek nisinu v nejnižší koncentraci v čase 9 h a 12 h měl srovnatelný vliv ( $P > 0,05$ ). Bylo detekováno snížení obsahu TYM o 13 % a 15 % oproti kontrole. Stejný trend byl pozorován i ve vzorcích s přidavkem nisinu o koncentraci  $35,7 \mu\text{g/ml}$  (snížení

o 21 % a 19 %). Detekovaná množství TYM se signifikantně lišila až ve vzorcích s nejvyšší koncentrací nisinu ( $P < 0,05$ ). Aplikace nisinu v 9. hodinu kultivace kmene RIBM 89 významněji snížila produkci TYM než aplikace nisinu v 12. hodinu kultivace tohoto kmene ( $P < 0,05$ ). Byl zjištěn o 33 % nižší obsah TYM oproti kontrole. Nejnižší snížení pak bylo zaznamenáno ve vzorcích po aplikaci nisinu ve všech 3 koncentracích 24. hodinu kultivace BA-produkčního kmene.



Obr. 36: Vliv nisinu na produkci tyraminu kmenem *Lactiplantibacillus plantarum* RIBM 89 při teplotě 30 °C (čas aplikace 12 h).

#### 4.4.2 Vliv nisinu na produkci tyraminu u kmene *Lactiplantibacillus plantarum* RIBM 89 při teplotě 12 °C

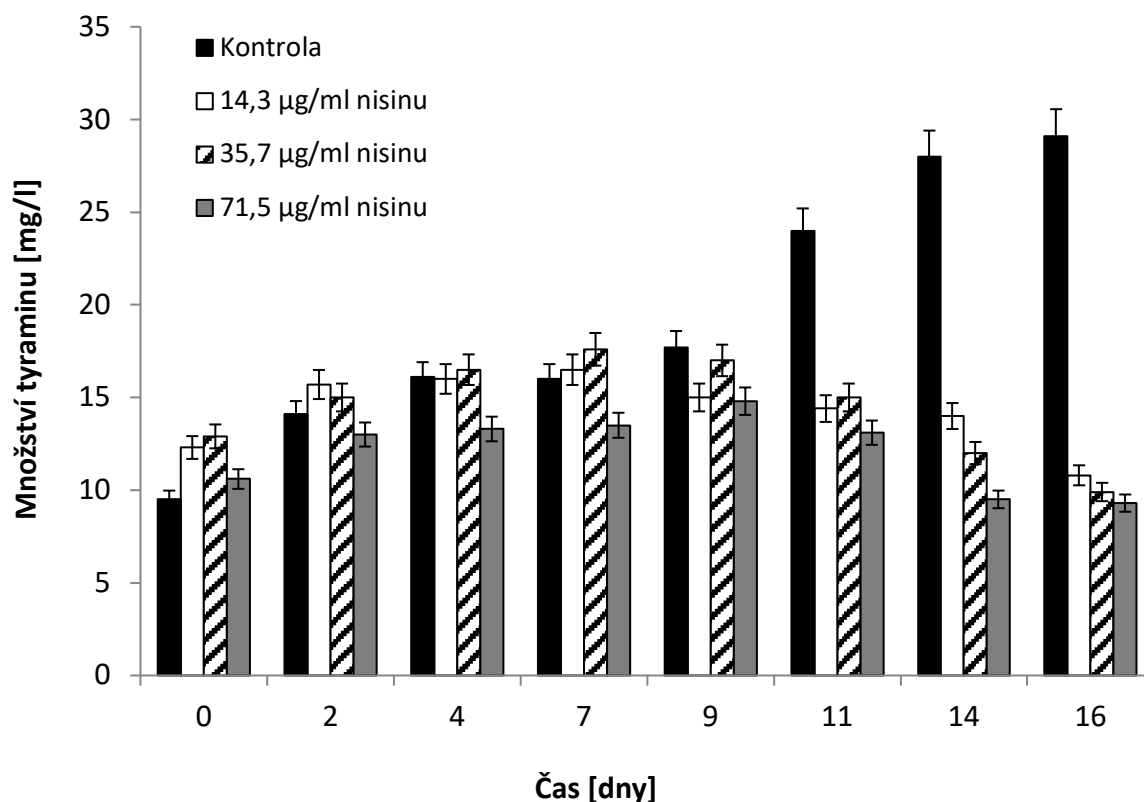
Vývoj produkce tyraminu u kmene *Lac. plantarum* RIBM 89 v kultivačních médiích s přísadkou nisinu ve 3 zkoumaných koncentracích, které byly zaočkovány v 0., 4. a 9. den je graficky znázorněn na Obr. 37–Obr. 40. Dekarboxylázová aktivita kmene RIBM 89 byla výrazně ovlivněna teplotou kultivace ( $P < 0,05$ ). Porovnáme-li množství vyprodukovaného TYM v kontrolních vzorcích při teplotě 30 °C a při teplotě 12 °C, lze pozorovat signifikantní snížení produkce tyraminu kmenem RIBM 89 při teplotě 12 °C. Při této teplotě kultivace bylo detekováno v kontrolních vzorcích na konci doby kultivace (16 dní) pouze  $29,1 \pm 1,5$  mg/l tyraminu. Naproti tomu při teplotě kultivace 30 °C bylo zjištěno na konci doby kultivace (72 h) patnáctkrát vyšší množství tyraminu ( $440,6 \pm 8,1$  mg/l).

Kromě teploty byla dekarboxylázová aktivita kmene RIBM 89 ovlivněna i přísadkou nisinu ve všech časech aplikace ( $P < 0,05$ ). Účinek nisinu aplikovaného na začátku kultivace kmene RIBM 89 (0. den) byl signifikantní ve všech 3 zkoumaných koncentracích ( $P < 0,05$ ). Na konci 16denní kultivace bylo detekováno snížení o více jak 60 % srovnáním s kontrolou. Statisticky významný

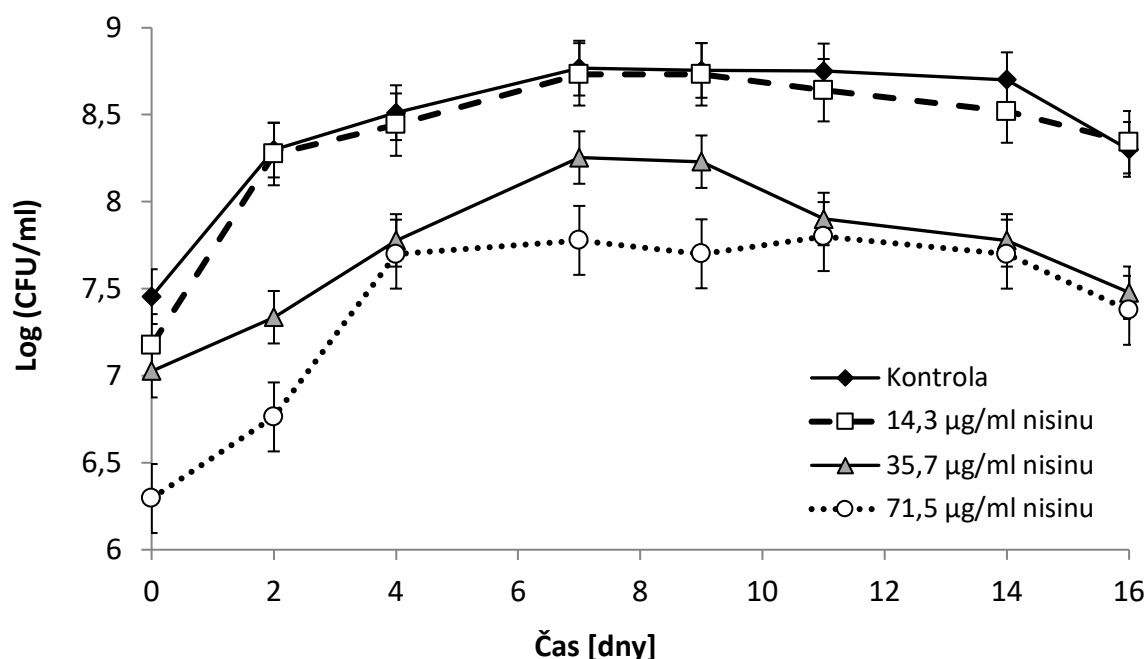


rozdíl mezi působením jednotlivých koncentrací nisinu nebyl však zaznamenán ( $P > 0,05$ ). Zajímavým jevem pozorovaným po aplikaci nisinu v koncentraci 14,3  $\mu\text{g/ml}$  a 35,7  $\mu\text{g/ml}$ , zejména v 0. den, byla detekce vyššího obsahu TYM oproti kontrolním vzorkům během prvních 7 dnů kultivace. Tento trend byl pozorován v některých časech kultivace kmene RIBM 89 i při teplotě 30 °C.

V případě aplikace nisinu v nejnižší testované koncentraci (14,3  $\mu\text{g/ml}$ ) v dalších dnech kultivace kmene RIBM 89 (tedy 2., 4., a 7. den kultivace) lze sledovat srovnatelný vliv na produkci TYM ( $P > 0,05$ ; Obr. 39 a Obr. 8A–B v Příloze II). Detekovaná množství TYM na konci doby kultivace se v těchto vzorcích pohybovala v rozmezí 22,5–23,4 mg/l (cca o 20 % nižší obsah TYM než u kontroly). Výrazně nižší množství TYM po 16denní kultivaci bylo pak zjištěno až při aplikaci nisinu ve stejné koncentraci v 9. a 11. den kultivace kmene RIBM 89 ( $P < 0,05$ ). V prvním případě se jednalo o 35% snížení obsahu TYM s porovnáním s kontrolou (Obr. 40) a v druhém případě o 45% snížení (Obr. 8C v Příloze II).



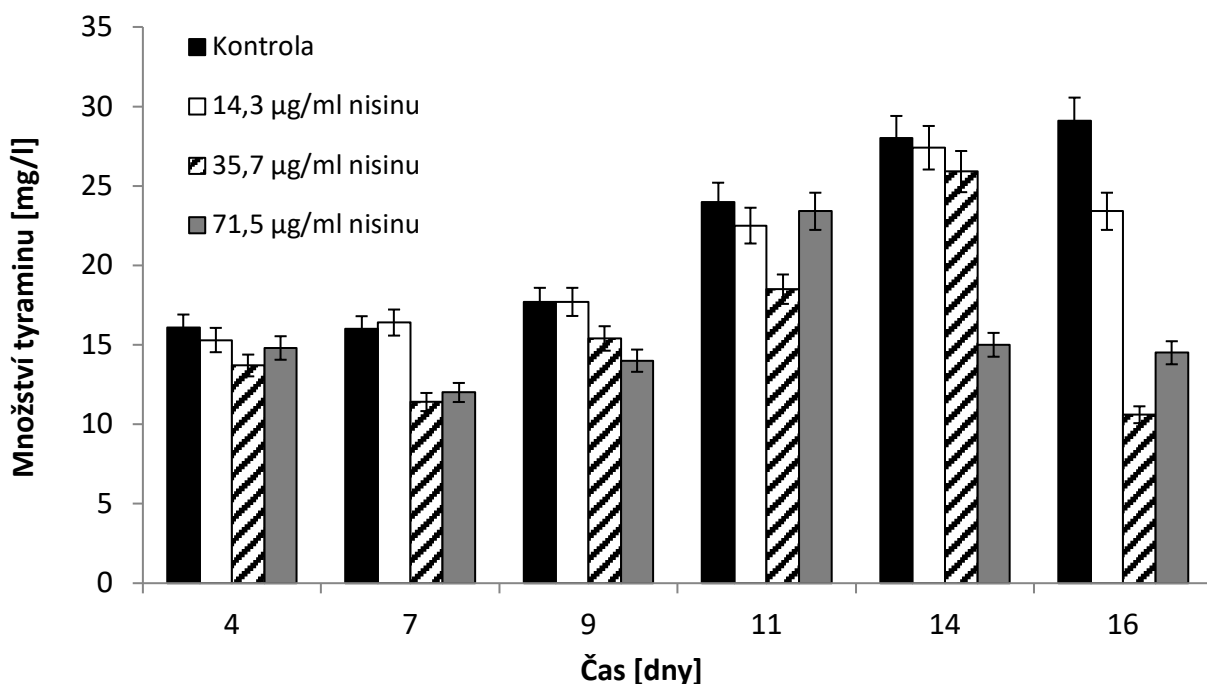
Obr. 37: Vliv nisinu na produkci tyraminu kmenem *Lactiplantibacillus plantarum* RIBM 89 při teplotě 12 °C (čas aplikace 0. den).



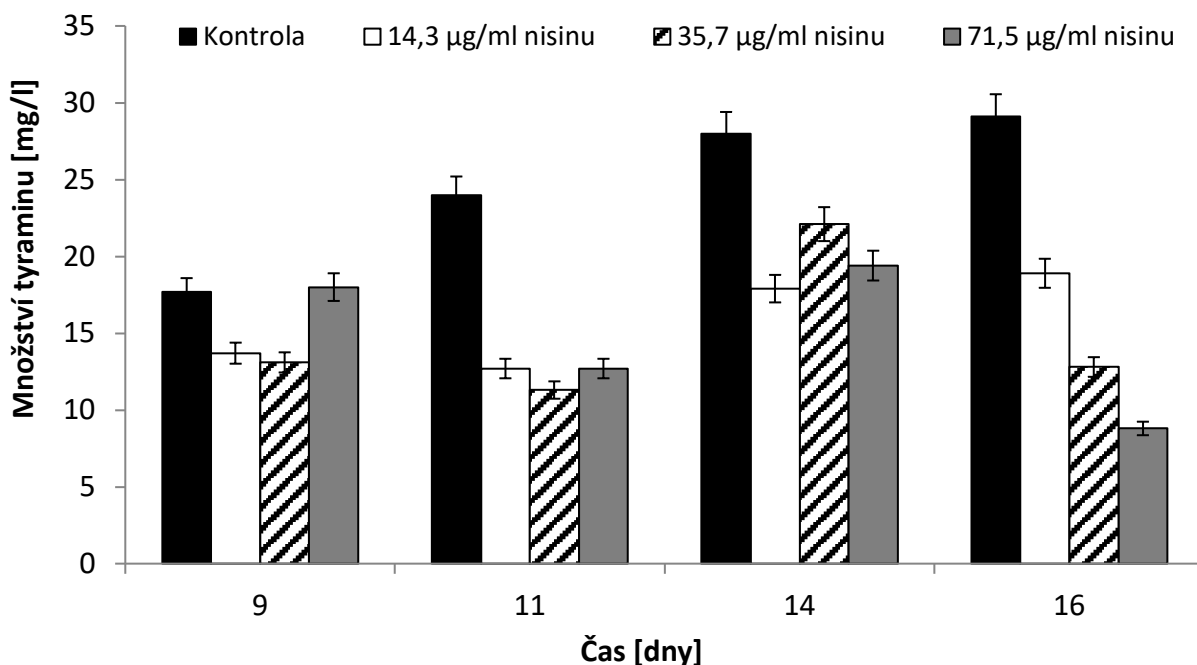
Obr. 38: Vliv nisinu na růst kmene *Lactiplantibacillus plantarum* RIBM 89 při teplotě 12 °C (čas aplikace 0. den).

Co se týká účinku nisinu v dalších zkoumaných koncentracích (35,7 µg/ml a 71,5 µg/ml), lze pozorovat vliv času aplikace nisinu k rostoucím buňkám produkčního kmene. Ve vzorcích, kde byl nisin přidán až 2. a 9. den kultivace produkčního kmene (exponenciální a začátek stacionární fáze růstu kmene RIBM 89, Obr. 38), bylo pozorováno snížení produkce TYM v závislosti na koncentraci nisinu. Při přidavku nisinu v koncentraci 35,7 µg/ml 2. den kultivace byl detekován o 59 % nižší obsah TYM s porovnáním s kontrolou a při aplikaci nisinu v koncentraci 71,5 µg/ml pak o 71 %. Obdobný účinek nisinu ve stejných koncentracích byl zaznamenán i při aplikaci 9. den kultivace ( $P > 0,05$ ). V ostatních v časech aplikace nisinu, tj. v 4., 7., a 11. den kultivace BA-produkčního kmene, byl sledován snižující se účinek nisinu v nejvyšší testované koncentraci na dekarboxylázovou aktivitu kmene RIBM 89 oproti přidavku nisinu v koncentraci 35,7 µg/ml. Přičemž statisticky významný rozdíl aplikace nisinu v uvedených koncentracích 7. a 11. den kultivace nebyl pozorován ( $P > 0,05$ ). Konkrétně bylo zaznamenáno ve vzorcích s přidavkem nisinu v koncentraci 35,7 µg/ml aplikovaných 7. den kultivace o 46 % nižší množství TYM než v kontrole a stejná koncentrace nisinu aplikovaná 11. den snížila produkci o 47 %. Ve vzorcích s nejvyšší testovanou koncentrací nisinu pak po 16 dnech kultivace bylo detekováno v obou případech snížení množství TYM o 35 % v porovnání s kontrolou. Významně nižšího obsahu TYM bylo dosaženo aplikací nisinu v těchto koncentracích 4. den kultivace BA-produkčního kmene. Byl zde pozorován obdobný trend, kdy nisin ve 2. testované koncentraci měl větší vliv na

snížení produkce TYM než v nejvyšší aplikované koncentraci. Detekovaná množství TYM ve vzorcích s přídatkem nisinu o koncentraci 35,7  $\mu\text{g/ml}$  byla o 64 % nižší oproti kontrole a ve vzorcích s přídatkem nisinu v koncentraci 71,5  $\mu\text{g/ml}$  o 50 % nižší než v kontrolním vzorku.



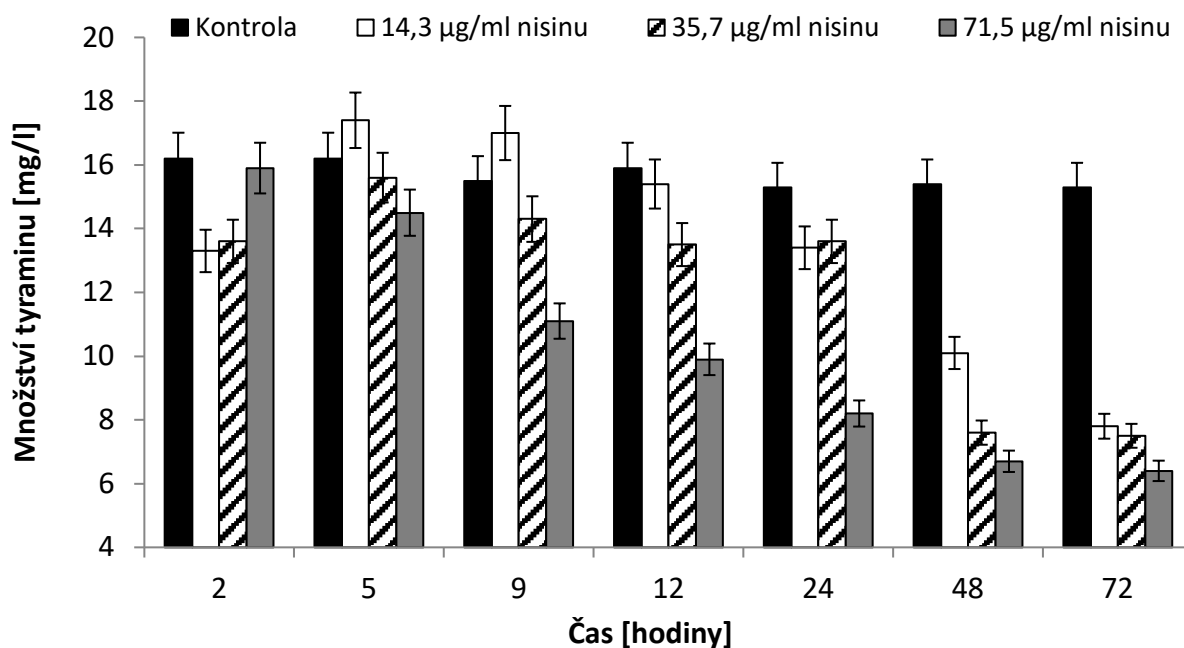
Obr. 39: Vliv nisinu na produkci tyraminu kmenem *Lactiplantibacillus plantarum* RIBM 89 při teplotě 12 °C (čas aplikace 4. den).



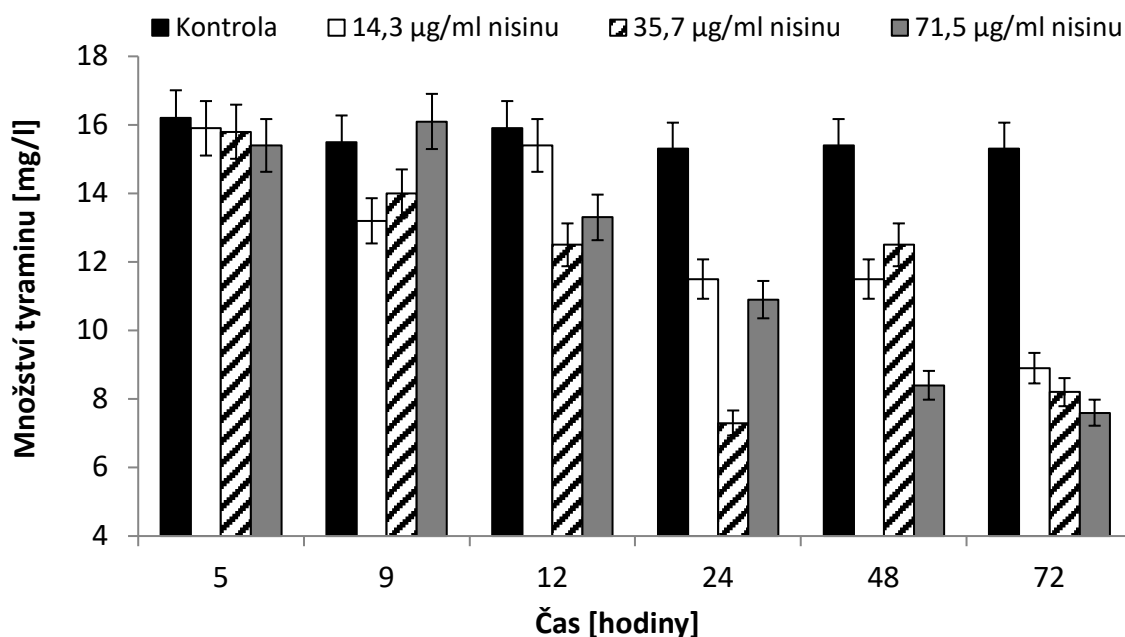
Obr. 40: Vliv nisinu na produkci tyraminu kmenem *Lactiplantibacillus plantarum* RIBM 89 při teplotě 12 °C (čas aplikace 9. den).

#### 4.4.3 Vliv nisinu na produkci tyraminu u kmene *Latilactobacillus curvatus* T3 při teplotě 30 °C

Celková produkce tyraminu kmenem *Latilactobacillus curvatus* T3, oproti kmenu *Lactiplantibacillus plantarum* RIBM 89, byla výrazně nižší ( $P < 0,05$ ). Tento fakt může souviset s nižšími počty CFU/ml detekovaných v kontrolních vzorcích u kmene T3 (6,9–8,3 log CFU/ml; Obr. 44) oproti počtům zjištěným v kontrolních vzorcích u kultury RIBM 89 (7,0–9,3 log CFU/ml; Obr. 34). Maximální vyprodukované množství tyraminu v kontrolních vzorcích nepřesáhlo  $16,2 \pm 0,8$  mg/l (Obr. 41). Toto množství TYM bylo detekováno v kontrolním vzorku po 2 hodinách kultivace kmene *Lat. curvatus* T3, avšak v dalších hodinách kultivace zvýšení produkce TYM nebylo zaznamenáno. Naopak bylo detekováno mírné snížení obsahu TYM do 24. hodiny kultivace ( $15,3 \pm 0,8$  mg/l;  $P > 0,05$ ). Od této doby až do konce 72hodinové kultivace se v kontrolních vzorcích množství tyraminu neměnila a stagnovala na hranici  $15,3 \pm 0,7$  mg/l. Přídavek nisinu ve všech koncentracích, které byly zaočkovány spolu s produkčním kmenem T3 v čase 0 h, snížil dekarboxylázovou aktivitu tohoto kmene. Detekovaná množství TYM se v těchto vzorcích na konci doby kultivace pohybovala v od 6,0 do 7,3 mg/l. Ve vzorcích, kde byl aplikován nisin v nejnižší testované koncentraci, bylo pozorováno snížení obsahu TYM o 52 % a v další testované koncentraci snížení o 55 % oproti kontrolním vzorkům. Největší snížení obsahu TYM bylo pak zjištěno ve vzorcích s přídavkem nisinu o nejvyšší testované koncentraci, a to o 61 %. Tento trend, kdy s aplikací vyšší koncentrace nisinu docházelo k úměrnému snížení obsahu tyraminu ve vzorcích, lze pozorovat ve všech časech přídavku nisinu.



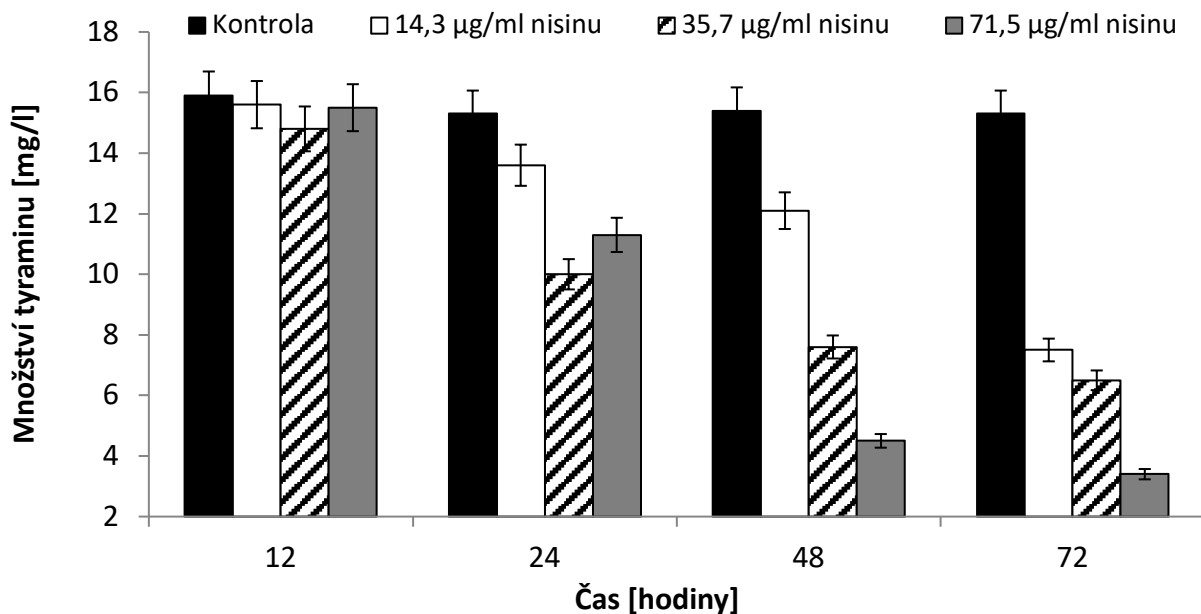
Obr. 41: Vliv nisinu na produkci tyraminu kmenem *Latilactobacillus curvatus* T3 při teplotě 30 °C (čas aplikace 0 h).



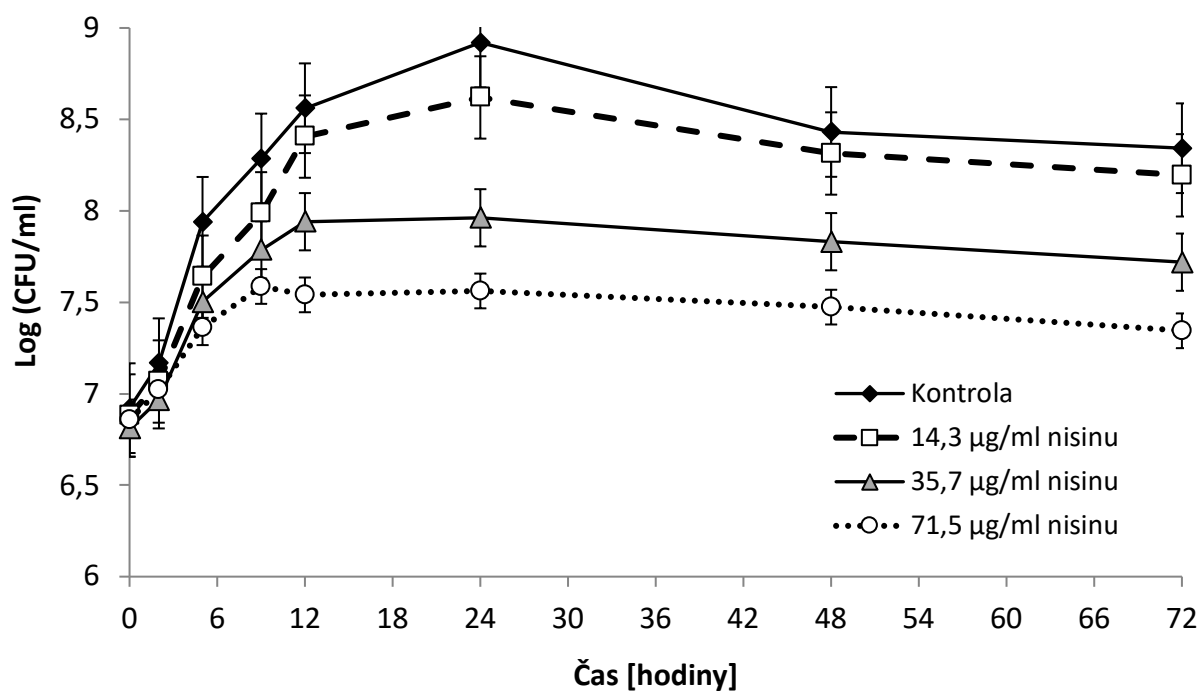
Obr. 42: Vliv nisinu na produkci tyraminu kmenem *Lactobacillus curvatus* T3 při teplotě 30 °C (čas aplikace 5 h).

Vliv přidavku nisinu ve sledovaných koncentracích po 2 hodinách kultivace buněk kmene T3 (Obr. 9A v Příloze II) byl srovnatelný s časem aplikace bakteriocinu v čase 0 h ( $P > 0,05$ ). Zjištěné hodnoty vyprodukovaného tyraminu se na konci kultivace pohybovaly v těchto vzorcích mezi 6,4–7,8 mg/l. Po aplikaci nisinu v dalších hodinách kultivace, tj. 5. a 9. hodinu, byla detekována po 72 h mírně vyšší množství TYM ve všech vzorcích. V případě přidavku nisinu v čase 5 hodin (Obr. 42), ve vzorcích s nisinem o koncentraci 14,3 µg/ml bylo zjištěné množství TYM  $8,9 \pm 0,4$  mg/l, tedy redukce o 42 % oproti kontrole. Ve vzorcích s dalšími zkoumanými koncentracemi nisinu bylo detekováno  $8,2 \pm 0,4$  mg/l a  $7,6 \pm 0,3$  mg/l tyraminu, snížení o 46 % a 50 % srovnáním s kontrolou. Obdobný účinek nisinu ve stejných koncentracích byl zaznamenán i při aplikaci 9. hodinu kultivace kmene T3 ( $P > 0,05$ ; Obr. 9B v Příloze II). Naopak výrazně nižšího obsahu TYM oproti předchozím časům aplikace bylo dosaženo aplikací nisinu v pozdější fázi růstu kmene T3, tedy 12. a 24. h kultivace. Největší redukce byla zaznamenána ve vzorcích s nejvyšší testovanou koncentrací bakteriocinu aplikovaného 12. hodinu (Obr. 43). Na konci kultivace bylo detekováno o 78 % nižší množství TYM ( $3,4 \pm 0,2$  mg/l) oproti kontrole ( $14,3 \pm 0,4$  mg/l). Obdobné snížení obsahu TYM ( $3,7 \pm 0,2$  mg/l) bylo sledováno i po přidavku nisinu ve stejné koncentraci 24. hodinu kultivace kmene T3 ( $P > 0,05$ ; Obr. 9C v Příloze II). Co se týká přidavku bakteriocinu v dalších koncentracích, aplikace nisinu v koncentraci 14,3 µg/ml vedla k snížení obsahu TYM o 51 % (čas inokulace v 12. h kultivace) a o 52 % (čas inokulace v 24. h kultivace) oproti kontrolnímu vzorku. Ve vzorcích s přidavkem nisinu v koncentraci 35,7 µg/ml bylo pak detekováno o 58 % a 60 % nižší množství TYM porovnáním s kontrolou. Nebyl

zaznamenán statisticky významný rozdíl mezi časem aplikace nisinu v uvedených koncentracích v 12. a 24. hodinu kultivace kmene T3.



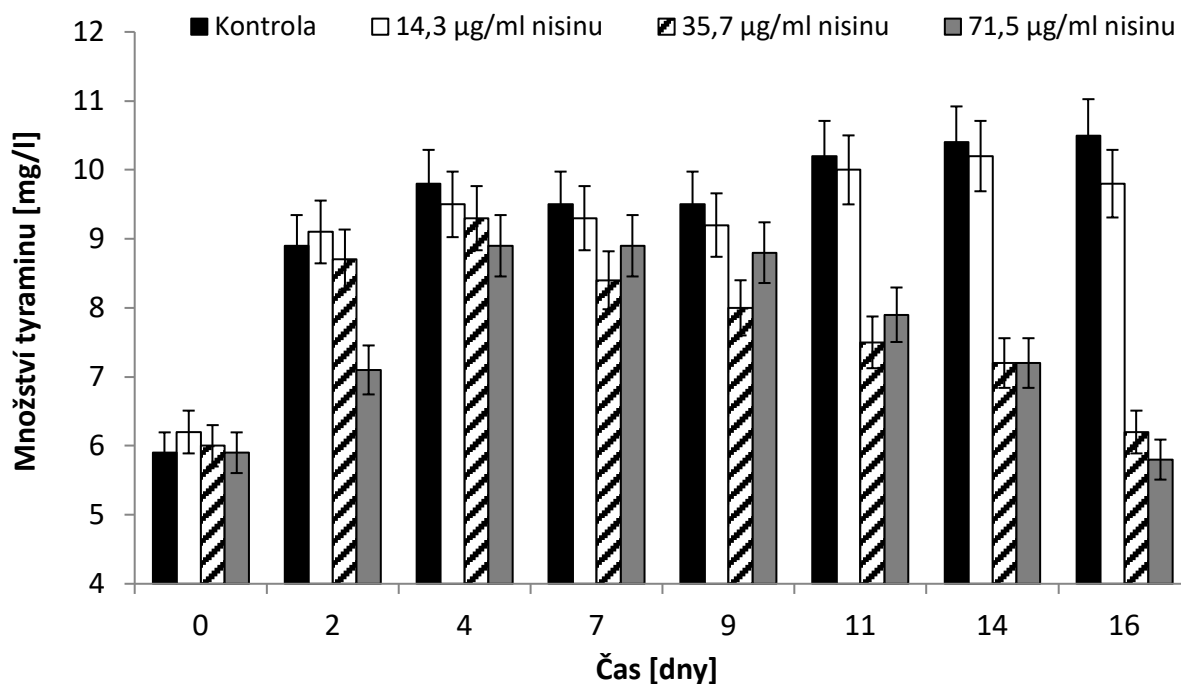
Obr. 43: Vliv nisinu na produkci tyraminu kmenem *Latilactobacillus curvatus* T3 při teplotě 30 °C (čas aplikace 12 h).



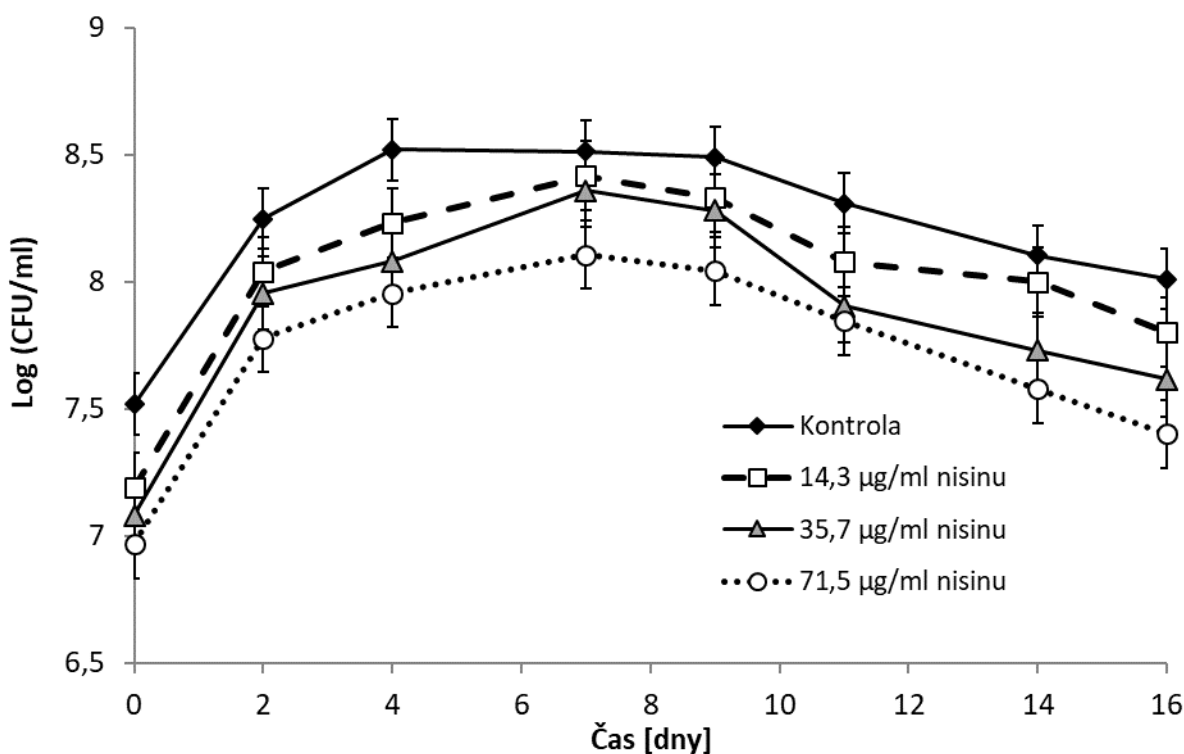
Obr. 44: Vliv nisinu na růst kmene *Latilactobacillus curvatus* T3 při teplotě 30 °C (čas aplikace 0 h).

#### 4.4.4 Vliv nisinu na produkci tyraminu u kmene *Latilactobacillus curvatus* T3 při teplotě 12 °C

Stejně jako u kultury *Lac. plantarum* RIBM 89 byla dekarboxylázová aktivita kmene *Latilactobacillus curvatus* T3 ovlivněna teplotou kultivace, avšak nebylo zaznamenáno tak signifikantní snížení produkce tyraminu jako u kultury RIBM 89. V kontrolním vzorku na začátku kultivace byl detekován tyramin v množství  $5,9 \pm 0,3$  mg/l. Po 11 dnech kultivace se jeho obsah navýšil až na hodnotu  $10,5 \pm 0,5$  mg/l a do konce 16. denní kultivace stagnovala na tomto množství. Přídavek nisinu na začátku kultivace kmene *Lat. curvatus* T3 (0. den) měl významný vliv na snížení produkce tyraminu pouze ve 2 nejvyšších testovaných koncentracích (Obr. 45). Po působení nisinu v koncentraci  $35,7 \mu\text{g/ml}$  byl detekován na konci doby kultivace ve vzorcích snížení obsahu TYM o 41 % a po působení nisinu v nejvyšší testované koncentraci o 45 % s porovnáním s kontrolou. Ve vzorcích, kde byl přidán nisin v nejnižší zkoumané koncentraci ( $14,3 \mu\text{g/ml}$ ), byla pozorována obdobná vyprodukovaná množství TYM jako v kontrole až do 14. dne kultivace kmene T3. Na konci 16denní kultivace pak bylo detekováno nepatrné snížení obsahu TYM na hodnotu  $9,8 \pm 0,5$  mg/l ( $P > 0,05$ ).



Obr. 45: Vliv nisinu na produkci tyraminu kmenem *Latilactobacillus curvatus* T3 při teplotě 12 °C (čas aplikace 0. den).

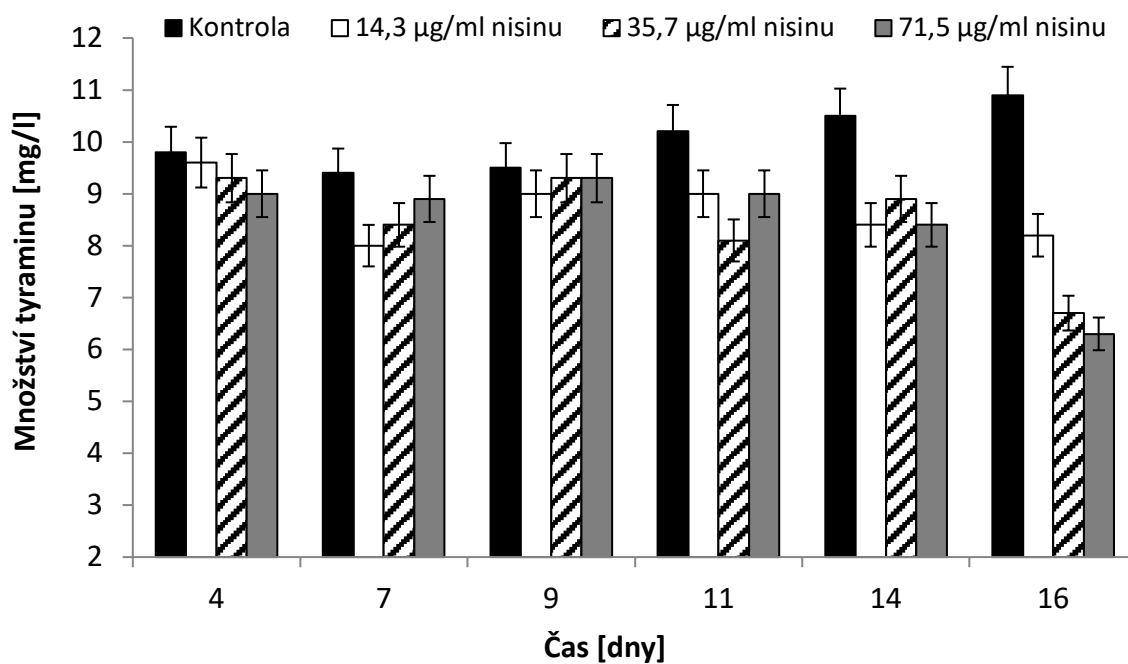


Obr. 46: Vliv nisinu na růst kmene *Lactobacillus curvatus* T3 při teplotě 12 °C (čas aplikace 0. den).

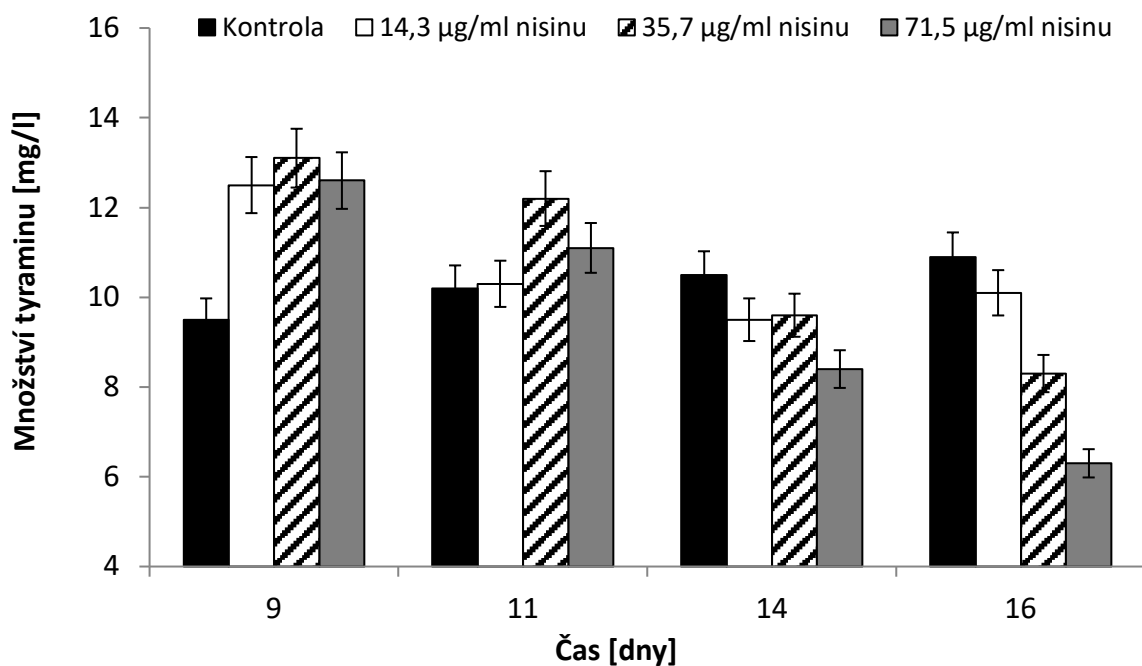
Co se týká účinku nisinu v dalších časech aplikace, nisin v nejnižší testované koncentraci (14,3 µg/ml), kromě času aplikace 4. a 7. den, neměl statisticky významný vliv na produkci tyraminu ( $P > 0,05$ ). Ve vzorcích, kde byl nisin v této koncentraci aplikovaný 4. den kultivace (Obr. 47), bylo pozorováno na konci kultivace snížení TYM o 25 % a při aplikaci 7. den (Obr. 10B v Příloze II) pak o 19 % srovnáním s kontrolou. Rovněž u další zkoumané koncentrace nisinu (35,7 µg/ml), lze pozorovat vliv času aplikace bakteriocinu k rostoucím buňkám produkčního kmene. Pokud byl přidán nisin v exponenciální až počáteční stacionární fázi růstu kmene T3 (2. a 4. den kultivace, Obr. 46), bylo pozorováno výraznější snížení obsahu tyraminu oproti aplikaci nisinu v pozdějších fázích růstu tohoto kmene (7., 9. a 11. den kultivace). Konkrétně ve vzorcích po aplikaci nisinu 2. a 4. den bylo na konci kultivace zjištěno snížení obsahu TYM o 42 % a o 39 % porovnáním s kontrolou. Naproti tomu ve vzorcích po aplikaci nisinu 7., 9. a 11. den bylo detekováno snížení o 30 %, 24 % a 14 % oproti kontrolnímu vzorku (Obr. 48 a Obr. 10C v Příloze II).

Vliv nisinu v nejvyšší testované koncentraci na produkci TYM byl srovnatelný ( $P > 0,05$ ) až na jednu výjimku. Tou výjimkou byl přídavek nisinu 7. den kultivace kmene T3. Na konci 16denní kultivace bylo v těchto vzorcích detekováno nejnižší množství TYM –  $5,1 \pm 0,3$  mg/l (snížení o 53 % oproti kontrole). V ostatních časech aplikace nisinu bylo pozorováno snížení zhruba o 40 % srovnáním s kontrolou.





Obr. 47: Vliv nisinu na produkci tyraminu kmenem *Latilactobacillus curvatus* T3 při teplotě 12 °C (čas aplikace 4. den).



Obr. 48: Vliv nisinu na produkci tyraminu kmenem *Latilactobacillus curvatus* T3 při teplotě 12 °C (čas aplikace 9. den).

## 5. SOUHRNNÁ DISKUZE

Empirické využívání divokých mikroorganismů a jejich metabolitů pro prodloužení udržitelnosti potravin bylo praktikováno po staletí. Nicméně, teprve až po objevení penicilinu se řada těchto látek stala předmětem výzkumu. V současné době je věnována velká pozornost antibakteriálním látkám produkovanými bakteriemi mléčného kvašení. Díky schopnosti produkovat celou řadu látek s inhibičními účinky představují BMK velký potenciál v bioprezervaci potravin (Perez et al., 2014; Fernandez et al., 2017; Delcarlo et al., 2019). Účinek BMK je způsoben produkcí bakteriocinů a dalších antagonistických sloučenin, jako jsou organické kyseliny, diacetyl, reuterin nebo peroxid vodíku (Reis et al., 2012). V experimentální části disertační práce byl nejprve proveden skrínig antimikrobiální aktivity bezbuněčných supernatantů z 22 kmenů (12 kmenů *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*, 2 kmeny *Lactobacillus acidophilus*, 4 kmeny *Lb. gasseri*, 3 kmeny *Lb. helveticus* a 1 kmen *Enterococcus faecium*) produkujících bakteriocin nebo látky podobné bakteriocinům (BLIS). Obecně bakteriociny BMK jsou za běžných podmínek účinné zejména vůči grampozitivním mikroorganismům (Balciunas et al., 2013; Favaro et al., 2015). Proto jako indikátorové mikroorganismy byly zvoleny pouze grampozitivní bakterie s významnou dekarboxylázovou aktivitou izolované z různých potravinových matric a nápojů. Největší antimikrobiální aktivita byla pozorována u zkoumaných supernatantů bakterií schopných produkovat nisin, kmenů *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*, kdy jedenáct z dvanácti testovaných CFS (CFS z kmenů CCDM 71, CCDM 671, CCDM 702, CCDM 731 a CCDM 670, CCDM 686, CCDM 689, CCDM 695 a CCDM 698) projevilo inhibiční účinek na alespoň 1 testovaný indikátorový kmen s dekarboxylázovou aktivitou. Vůči působení CFS z laktokoků byly nejvíce citlivé zkoumané bakterie mléčného kvašení, zejména pak testované kmeny laktobacilů. Všechny kmeny laktobacilů vykazovaly citlivost vůči 9 z 12 analyzovaných supernatantů z kmenů laktokoků. Tyto výsledky jsou v souladu s tvrzením, že spektrum účinku bakteriocinů je relativně úzké a jejich inhibiční účinek se projevuje zejména na kmeny taxonomicky blízké k jejich producentům (Cleveland et al., 2001). Kmeny BMK byly různou měrou citlivé vůči působení supernatantů výše uvedených laktokoků. Nicméně největší inhibiční účinek na většinu kmenů BMK byl sledován u supernatantů z *Lc. lactis* ssp. *lactis* CCDM 686 a *Lc. lactis* ssp. *lactis* CCDM 689. Spektrum účinku těchto CFS zahrnovalo druhy *Levilactobacillus brevis* (17/17), *Latilactobacillus curvatus* (8/8), *Lacticaseibacillus casei/paracasei* (3/3), *Lactiplantibacillus plantarum* (4/4) a *Latilactobacillus sakei* (1/1). Největší inhibiční zóny pak byly pozorovány u kmene *Latilactobacillus curvatus* T3, přičemž po působení CFS kmene CCDM 686 byl sledován vznik zóny o průměru  $18 \pm 0,0$  mm a po působení CFS kmene CCDM 689 zóny o průměru  $17,5 \pm 0,7$  mm. Vyšší citlivost vůči působení těchto supernatantů byla pozorována rovněž u kmene *Lactiplantibacillus plantarum* RIBM 89 (vznik inhibičních zón větších než

16 mm). Tyto výsledky tak mohou být v souladu s prací Şanlıbaba et al. (2009), kteří zjistili antagonistické působení supernatantu z nisin-produkujícího kmene *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* LL27 na kmeny *Lactococcus lactis* (11/11), *Latilactobacillus sakei* (1/1) a *Lactiplantibacillus plantarum* (1/1). Z testovaných kmenů BMK vyšší citlivost byla rovněž pozorována u kmenů *Lac. plantarum* a *Lat. sakei*. Dále CFS z tohoto kmene inhibičně působil i na kmeny *Enterococcus faecalis* (2/2). Inhibiční účinek CFS testovaných laktokoků na *Enterococcus faecalis* byl prokázán i v této disertační práci. Detekované průměry inhibičních zón (10,3–11,0 mm) u kmenů *E. faecalis* byly srovnatelné s průměry zón uváděných v již zmíněné studii Şanlıbaba et al. (2009). Z dalších enterokoků testovaných v disertační práci, výrazný inhibiční účinek byl sledován u kmenů *E. faecium*. Devět ze čtrnácti kmenů *E. faecium* projevilo citlivost vůči působení nejméně 2 supernatantů z laktokoků. Průměry inhibičních zón se pohybovaly v rozmezí 9,5–13,3 mm. Obdobné velikosti inhibičních zón (9–15 mm) detekovaných u 4 kmenů *E. faecium* po působení CFS z kmene *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* MK02R, potenciálního producenta nisinu, uvádějí ve své práci Kruger et al. (2013). Také Biscola et al. (2013) zjistili inhibiční aktivitu CFS ze 2 isolátů (isolát 69 a 94) ze sušeného masa na kmeny *E. faecium*. Isolát 69 vykazoval širší antimikrobiální spektrum, proto byl následně identifikován jako *Lactococcus lactis* a označen za potenciálního producenta nisinu Z.

Obecně testované kmeny enterokoků byly citlivější vůči působení daných CFS než kmeny stafylokoků, kdy 53 % (19/36) zkoumaných enterokoků bylo inhibováno nejméně 2 supernatanty z laktokoků. Oproti tomu z 27 testovaných stafylokoků pouze 3 kmeny prokázaly citlivost vůči alespoň jednomu CFS z laktokoků, konkrétně vůči CFS z kmene *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* CCDM 414 a z kmene CCDM 418. Oba supernatanty působily inhibičně na 2 kmeny *S. haemolyticus*, přičemž CFS z kmene CCDM 414 inhiboval i růst kmene *S. hominis*. V dosud publikované literatuře není mnoho studií týkajících se antimikrobiální aktivity CFS kmenů *Lactococcus lactis* na koaguláza-negativní kmeny stafylokoků uváděných v této práci. Většina autorů se zaměřuje na koaguláza-pozitivní druh *S. aureus* a na další významné patogeny a oportunní patogeny jako *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Salmonella enterica*, *Enterobacter aerogenes* (nyní *Klebsiella aerogenes*) a *Escherichia coli* (Sharaf a Al Harbi, 2011; Kruger et al., 2013; Yerlikaya, 2019; Maalaoui et al., 2020). Pokud je mi známo, pouze ve studii Biscola et al. (2013) byly zahrnuty do testování antimikrobiální aktivity CFS z potenciálního producenta nisinu Z (*Lc. lactis* 69) zástupci koaguláza-negativních stafylokoků. Testované kmeny stafylokoků byly rovněž živočišného původu. Konkrétně se jednalo o izoláty z tradičního fermentovaného a sušeného masa zvaného „charqui“. Inhibiční účinek CFS byl zaznamenán na kmeny *S. xylosus* (7/9), *S. pasteurii/warneri* (2/3), *S. saprophyticus* (1/1) a *Staphylococcus* sp. (2/5).

V další části práce byl sledován vliv 2 nisin-produkujících kmenů *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* biovar. *diacetylactis* CCDM 686 a CCDM 689, jejich

supernatantů a komerčního nisinu na produkci tyraminu u *Latilactobacillus curvatus* T3 a *Lactiplantibacillus plantarum* RIBM 89. Bez přítomnosti protektivních kultur a jejich antimikrobiálních látek byla u obou kmenů zaznamenána největší vyprodukovaná množství tyraminu v pozdní stacionární fázi růstu. Dle studií mnohých autorů je tato fáze růstu bakterie obdobím, kdy dochází k maximální produkci biogenních aminů v důsledku zvyšujícího se stresu buněk způsobeného vyčerpáním živin (Kim et al., 2002; Calles-Enríquez et al., 2010; La Gioia et al., 2011).

Jeden z důležitých faktorů ovlivňujících dekarboxylázovou aktivitu bakterií je teplota. V naší práci byl sledován vliv dvou teplot na produkci tyraminu, a to 30 °C a 12 °C. Teplota 30 °C byla zvolena z důvodu optimálního růstu jak kmenů s dekarboxylázovou aktivitou, tak zkoumaných protektivních kultur. Druhá kultivační teplota (12 °C) byla zvolena proto, že je to teplota, při které dochází ke zrání mnohých sýrů, resp. kvašení některých typů piva (Ceruti et al., 2015; Capece et al., 2018; Rezaei et al., 2020; Walsh et al., 2020; Iorizzo et al., 2021).

Optimální teplota podporující buněčný metabolismus a proliferaci může umocňovat aktivitu dekarboxylačních enzymů přítomných v těchto buňkách (Gardini et al., 2016). Marcobal et al. (2006) uvádějí, že optimální teplota pro produkci tyraminu kmeny *E. faecium* a *Levilactobacillus brevis* je 32 °C. Rovněž Bargossi et al. (2015) zaznamenali největší aktivitu enzymu tyrozin-dekarboxyláza (*tdc*) purifikovaného z *E. faecalis* po 2 h při teplotě 30 °C a 37 °C, přičemž signifikantní rozdíl mezi těmito teplotami nebyl zaznamenán ( $P > 0,05$ ). Tyto výsledky korespondují s výsledky této disertační práce. Oba testované kmeny (*Lat. curvatus* T3 a *Lac. plantarum* RIBM 89) vykazovaly signifikantně vyšší produkci tyraminu při teplotě 30 °C než při teplotě 12 °C ( $P < 0,05$ ). Například již po 72 h při kultivaci v 30 °C byl schopen kmen *Lac. plantarum* RIBM 89 vyprodukovat až 444 mg/l tyraminu v kontrolním vzorku. Naproti tomu po 16 dnech kultivace při 12 °C bylo vyprodukované množství až 3x nižší (131 mg/l).

Kromě teploty rovněž inokulace nisin-produkujících kmenů (*Lc. lactis* spp. *lactis* CCDM 686 a CCDM 689) a jejich supernatantů k BA-produkčním kmenům vedla k výraznému snížení produkce tyraminu. Produkce TYM kmenem *Lac. plantarum* RIBM 89 byla více inhibována přítomností protektivních kultur než jejich supernatantů. Naproti tomu účinek obou testovaných protektivních kmenů a jejich supernatantů na produkci sledovaného BA byl obdobný u kmene *Lat. curvatus* T3. Například po přidavku kmenů CCDM 686 a CCDM 689 k produkčnímu kmenu RIBM 89 v čase 0 h bylo zaznamenáno na konci doby kultivace při 30 °C o 59 % a 60 % nižší množství TYM oproti kontrole. Zatímco přidavek supernatantů těchto kultur vedl ke snížení TYM pouze o 26 % a o 8 % porovnáním s kontrolou. Produkce TYM kmenem *Lat. curvatus* T3 byla snížena po aplikaci protektivních kultur i jejich CFS o více než 70 % oproti kontrole. Tento fakt může být důsledkem většího inhibičního účinku supernatantů na růst buněk kmene T3, kdy byly detekovány po přidavcích CFS 686 a CFS 689 v čase

odběru 24 h výrazně nižší hodnoty CFU/ml (8,5 log CFU/ml a 8,6 log CFU/ml) než v kontrole (9,5 log CFU/ml). Za stejných podmínek u kmene RIBM 89 nebylo pozorováno tak signifikantní snížení počtu vyrostených kolonií (9,2 log CFU/ml po přidavku obou CFS) oproti kontrole (9,6 log CFU/ml).

Z výsledků sledování vlivu komerčního nisinu na produkci TYM kmeny RIBM 89 a T3 plyne, že přídavek nisinu ve všech 3 koncentracích snížil obsah TYM v těchto vzorcích. Ve většině případů byl zaznamenán trend, čím vyšší aplikovaná koncentrace nisinu, tím vyšší snížení množství TYM vyprodukovaného BA-produkčními kmeny. Tento trend není překvapující, jelikož úměrně s aplikací vyšší koncentrace nisinu dochází k většímu snížení počtu buněk produkčního kmene (snížení až o 1 log CFU/ml). K podobnému závěru dospěli i Saelao et al. (2018), kteří zkoumali vliv nisin-produkujícího kmene na produkci tyraminu u kmenů *E. faecalis* a *Weissella cibaria*. V důsledku snížení počtu buněk (snížení o 2 log CFU/ml) produkčních kmenů vedlo ke snížení kumulace tyraminu.

Snížení produkce tyraminu kmenem *Enterococcus faecalis* a histaminu kmenem *Streptococcus thermophilus* kultivací s bakteriocin-produkujícími kmeny *Lc. lactis* ssp. *lactis* poukazuje práce Tabanelli et al. (2014). Ve studii těchto autorů zkoumané kmeny laktokoků vykazovaly větší inhibiční efekt vůči *Streptococcus thermophilus* ve srovnání s *Enterococcus faecalis*, kdy růst *St. thermophilus* byl zcela inhibován po inokulaci kmene *Lc. lactis* ssp. *lactis* VR84, producenta nisinu Z. Rovněž Joosten a Nuñez (1996) uvádějí, že použití dvou bakteriocin-produkujících kmenů *E. faecalis* a nisin-produkujícího kmene *Lc. lactis* jako startérové kultury při výrobě sýru vedlo k výraznému snížení počtů *Lactobacillus buchneri* (nyní *Lentilactobacillus buchneri*), a tím i produkci histaminu. Vliv supernatantů z *Lactobacillus acidophilus*, *St. thermophilus*, *Lc. lactis* ssp. *lactis* a *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *cremoris* na produkci tyraminu u vybraných patogenních a podmíněně patogenních mikroorganismů studovali Toy et al. (2015). Byly testovány dvě různé koncentrace CFS (50% a 25%). Obě koncentrace CFS z kmene *St. thermophilus* a 50% z kmene *Lb. acidophilus* inhibovaly produkci TYM u *Salmonella* Paratyphi A až o 98 % oproti kontrole. Produkce TYM u *Listeria monocytogenes* byla nejvíce inhibována 50% CFS z *Lc. lactis* ssp. *lactis* a 50% CFS z *Lb. acidophilus*. U *Escherichia coli* bylo vyprodukované množství TYM nižší po aplikaci všech testovaných CFS. Naopak u *Staphylococcus aureus* byla po aplikaci 50% CFS z kmene *St. thermophilus* a po aplikaci 50% CFS z kmene *Lc. lactis* ssp. *lactis* sledována vyšší produkce tyraminu. Z těchto výsledků vyplývá, že BA-produkující kmeny mohou být různě citlivé vůči bakteriocin-produkujícím kmenům nebo jejich CFS a mohou mít různé účinky na produkci BA.

Dále byl sledován vliv přídaveků protektivních kultur, jejich CFS a nisinu v různých časech kultivace BA-produkčních kmenů. Z dosažených výsledků je patrný vliv času přídaveků protektivních kultur a jejich CFS. Ve většině případů byl zaznamenán větší účinek na snížení produkce sledovaného BA, pokud byly

producenti nisinu a jejich CFS zaočkovány v prvních 4 časech aplikace. V pozdějších časech docházelo k výraznému snížení nebo zcela k vymizení inhibičního účinku protektivních kultur a jejich CFS na produkci TYM. Pokud je mi známo, naše práce je jedinou studií, která poukazuje vliv času inokulace nisin-produkujících kmenů a jejich metabolitů (CFS a nisinu) na produkci TYM.

Výsledky této práce potvrdily, že přidavek nisin-produkujících kmenů a jejich antimikrobiálních látek (CFS a nisin) mohou signifikantně snížit produkci tyraminu u kmenů *Lactobacillus curvatus* a *Lactiplantibacillus plantarum* v *in vitro* podmínkách. Nicméně v komplexním prostředí reálné potraviny může být účinek protektivních kultur a jejich antimikrobiálních látek na produkci tyraminu ovlivněn v důsledku přítomnosti jiných kompetujících mikroorganismů, jejich metabolickou činností a parametry nastavených při výrobě fermentovaných potravin. Proto bude třeba provést další výzkum za účelem ověření vlivu těchto protektivních kmenů a jejich metabolitů s antimikrobiální aktivitou na snížení produkce tyraminu v reálné potravinové matrici.

## 6. ZÁVĚR

Tato disertační práce se zabývala sledováním vlivu vybraných protektivních kmenů bakterií mléčného kvašení a jejich metabolitů s antimikrobiálními účinky na produkci tyraminu u kmenů izolovaných z potravin s významnou tyrozindekarboxylázovou aktivitou.

Na základě získaných výsledků lze vyvodit tyto závěry:

- V případě testování antimikrobiální aktivity supernatantů z protektivních kultur byl největší inhibiční účinek pozorován u supernatantů z nisin-produkujících kmenů *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*, kdy jedenáct z dvanácti testovaných CFS (CFS z kmenů CCDM 71, CCDM 671, CCDM 702, CCDM 731 a CCDM 670, CCDM 686, CCDM 689, CCDM 695 a CCDM 698) projevilo inhibiční působení na alespoň 1 testovaný indikátorový kmen s dekarboxylázovou aktivitou.
- Vůči působení CFS z laktokoků byly nejvíce citlivé testované bakterie mléčného kvašení, zejména kmeny laktobacilů. Všechny testované kmeny laktobacilů vykazovaly citlivost vůči 9 z 12 analyzovaných supernatantů z kmenů laktokoků.
- Z výsledků testování inhibičního účinku nisinu vyplývá, že citlivost zkoumaných dekarboxyláza-pozitivních BMK na nisin je značně variabilní nejen v rámci rodu, ale i druhu. Kmeny téhož druhu reagují rozdílně na působení nisinu. Největší citlivost prokázaly kmeny *Latilactobacillus curvatus* T3 a *Lactiplantibacillus plantarum* RIBM 89.
- Bez přítomnosti protektivních kultur a antimikrobiálních látek u kmenů *Latilactobacillus curvatus* T3 a *Lactiplantibacillus plantarum* RIBM 89 byla největší vyprodukovaná množství tyraminu zaznamenána v pozdní stacionární fázi růstu.
- Oba testované kmeny (*Lat. curvatus* T3 a *Lac. plantarum* RIBM 89) vykazovaly signifikantně vyšší produkci tyraminu při teplotě 30 °C než při teplotě 12 °C ( $P < 0,05$ ).
- V přítomnosti nisin-produkujících kmenů (*Lc. lactis* ssp. *lactis* CCDM 686 a CCDM 689) a jejich CFS bylo zaznamenáno snížení produkce tyraminu kmeny RIBM 89 a T3 při obou testovaných teplotách.
- Produkce TYM kmenem *Lac. plantarum* RIBM 89 byla více inhibována přítomností protektivních kultur než jejich supernatantů. Naproti tomu účinek protektivních kmenů a jejich supernatantů na produkci sledovaného BA byl obdobný u kmene *Lat. curvatus* T3.

- Z dosažených výsledků je patrný vliv času přidavků protektivních kultur a jejich CFS. Ve většině případů byl zaznamenán větší účinek na snížení produkce sledovaného BA, pokud byli producenti nisinu a jejich CFS zaočkováni v prvních 4 časech aplikace, tzn. při teplotě kultivace 30 °C: přidavky v čase 0, 2, 5 a 9 h; při kultivaci v teplotě 12 °C: přidavky v čase 0., 2., 4., a 9. den. V pozdějších časech docházelo k výraznému snížení nebo zcela k vymizení inhibičního účinku protektivních kultur a jejich CFS na produkci TYM.
- Z výsledků sledování vlivu komerčního nisinu na produkci TYM kmeny RIBM 89 a T3 plyne, že přídavek nisinu ve všech 3 koncentracích (14 µg/ml, 25,7 µg/ml, 71,5 µg/ml) snížil obsah TYM v těchto vzorcích. Ve většině případů byl zaznamenán trend, čím vyšší aplikovaná koncentrace nisinu, tím vyšší snížení množství TYM vyprodukovaných BA-produkčními kmeny.
- Vliv času aplikace nisinu neměl jednoznačný trend, avšak snížení produkce tyraminu kmeny T3 a RIBM 89 bylo pozorováno ve všech časech přidavků nisinu.

Výsledky této práce potvrdily, že přídavek nisin-produkujících kmenů a jejich antimikrobiálních látek (CFS a nisin) mohou výrazně snížit produkci tyraminu u kmenů *Latilactobacillus curvatus* a *Lactiplantibacillus plantarum*. Nicméně je třeba provést další výzkum za účelem vyšetření těchto protektivních kmenů a jejich an látek v realné potravinové matici.



## 7. PŘÍNOS PRO VĚDU A PRAXI

Přínos předkládané práce v oblasti vědy lze vidět v následujících aspektech:

- Byl proveden rozsáhlý skrining antimikrobiální aktivity supernatantů z 22 kmenů (12 kmenů *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*, 2 kmeny *Lactobacillus acidophilus*, 4 kmeny *Lb. gasseri*, 3 kmeny *Lb. helveticus* a 1 kmen *Enterococcus faecium*) produkujících bakteriocin nebo látky podobné bakteriocinům (BLIS) vůči 103 kmenům (z toho 41 kmenů BMK, 36 kmenů rodu *Enterococcus* a 26 kmenů rodu *Staphylococcus*) s významnou dekarboxylázovou aktivitou.
- Byla stanovena minimální inhibiční koncentrace (MIC) komerčního nisinu u 21 kmenů BMK s významnou tyrozin-dekarboxylázovou aktivitou (13 kmenů *Levilactobacillus brevis*, 5 kmenů *Latilactobacillus curvatus*, 2 kmeny *Lactiplantibacillus plantarum* a 1 kmen *Lacticaseibacillus casei/paracasei*).
- Byl studován vliv nisin-produkujících kmenů (*Lc. lactis* ssp. *lactis* CCDM 686 a CCDM 689) a jejich supernatantů na produkci tyraminu kmeny izolovanými z fermentovaných potravin (*Latilactobacillus curvatus* T3 a *Lactiplantibacillus plantarum* RIBM 89) v závislosti na teplotě kultivace (30 °C a 12 °C). Rovněž byl zkoumán vliv přídavku protektivních kultur a jejich CFS v různých časových intervalech kultivace kmenů T3 a RIBM 89.
- Byl zjištěn vliv různé koncentrace nisinu na kinetiku produkce tyraminu u kmenů *Latilactobacillus curvatus* T3 a *Lactiplantibacillus plantarum* RIBM 89 v závislosti na teplotě kultivace (30 °C a 12 °C). Rovněž byl zhodnocen vliv přídavku nisinu v různých časových intervalech kultivace kmenů T3 a RIBM 89.
- Jedná se o první studii, která poukazuje vliv času inokulace nisin-produkujících kmenů a jejich metabolitů (CFS a nisinu) na produkci tyraminu.

Přínos předkládané práce v oblasti praxe lze vidět v následujících aspektech:

- Zdůraznění vlivu teploty kultivace na dekarboxylázovou aktivitu.
- Zjištění, že přídavek protektivních kmenů a jejich supernatantů, může výrazně snížit produkci tyraminu kmeny *Latilactobacillus curvatus* a *Lactiplantibacillus plantarum* i při vyšší teplotě kultivace (30 °C).
- Zjištění, že přídavek nisinu i v subletálních koncentracích může inhibovat produkci tyraminu u kmenů *Latilactobacillus curvatus* a *Lactiplantibacillus plantarum*.
- Získané poznatky mohou přispět k nalezení strategie vedoucí ke snížení tvorby a hromadění tyraminu ve vysokých koncentracích ve fermentovaných potravinách.

## 8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Abdollahi, S., Ghahremani, M.H., Setayesh, N., Samadi, N., 2018. *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica* affect the expression of nisin gene and its production by *Lactococcus lactis*. *Microb. Pathog.*, roč. 123, s. 28–35. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.06.024>
- Abdulhussein, A.A., Wallace, H.M., 2014. Polyamines and membrane transporters. *Amino Acids*, roč. 46, s. 655–660. <https://doi.org/10.1007/s00726-013-1553-6>
- Adachi, O., Yamada, H., Ogata, K., 1966. Purification and properties of putrescine oxidase of *Micrococcus rubens*. *Agric. Biol. Chem.*, roč. 30, s. 1202–1210. <https://doi.org/10.1080/00021369.1966.10858750>
- Aflaki, F., Ghoulipour, V., Saemian, N., Sheibani, S., 2014. Biogenic Amine Contents in Non-alcoholic Beers: Screening and Optimization of Derivatization. *Food Anal. Methods*, roč. 7, s. 713–720. <https://doi.org/10.1007/s12161-013-9746-x>
- Ahmad, W., Mohammed, G.I., Al-Eryani, D.A., Saigl, Z.M., Alyoubi, A.O., Alwael, H., Bashammakh, A.S., O'Sullivan, C.K., El-Shahawi, M.S., 2020. Biogenic Amines Formation Mechanism and Determination Strategies: Future Challenges and Limitations. *Crit. Rev. Anal. Chem.*, roč. 50, s. 485–500. <https://doi.org/10.1080/10408347.2019.1657793>
- Almeida, C., Fernandes, J.O., Cunha, S.C., 2012. A novel dispersive liquid-liquid microextraction (DLLME) gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) method for the determination of eighteen biogenic amines in beer. *Food Control*, roč. 25, s. 380–388. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.10.052>
- 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 Food Sci. Technol.*, roč. 39, s. 146–155. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2014.07.007>
- Alves Carneiro, V., Soares Melo, R., Mateus Gomes Pereira, A., Maria Albuquerque Azevedo, Á., Nágila Carneiro Matos, M., Mesquita Bastos Cavalcante, R., Rhonalty Rocha, R., de Queiroz Albuquerque, V., Alberto Pérez Guerrero, J., Eduardo Aragão Catunda Junior, F., 2020. Essential Oils as an Innovative Approach against Biofilm of Multidrug-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Bact. Biofilms*. <https://doi.org/10.5772/intechopen.91833>

- Balciunas, E.M., Castillo Martinez, F.A., Todorov, S.D., Franco, B.D.G. de M., Converti, A., Oliveira, R.P. de S., 2013. Novel biotechnological applications of bacteriocins: A review. *Food Control*, roč. 32, s. 134–142. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.11.025>
- Barbosa, M.S., Jurkiewicz, C., Landgraf, M., Todorov, S.D., Franco, B.D.G.M., 2018. Effect of proteins, glucose and NaCl on growth, biosynthesis and functionality of bacteriocins of *Lactobacillus sakei* subsp. *sakei* 2a in foods during storage at 4 °C: Tests in food models. *LWT*, roč. 95, s. 167–171. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.04.082>
- Bardócz, S., 1995. Polyamines in food and their consequences for food quality and human health. *Trends Food Sci. Technol.*, roč. 6, s. 341–346. [https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(00\)89169-4](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(00)89169-4)
- Bargossi, E., Gardini, F., Gatto, V., Montanari, C., Torriani, S., Tabanelli, G., 2015. The capability of tyramine production and correlation between phenotypic and genetic characteristics of *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* strains. *Front. Microbiol.*, roč. 6, s. 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01371>
- Bemena, L.D., Mohamed, L.A., Fernandes, A.M., Lee, B.H., 2014. Applications of bacteriocins in food, livestock health and medicine. *Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci.*, roč. 3, s. 924–949. <https://doi.org/10.13140/RG.2.1.3426.2488>
- Benkerroum, N., 2016. Biogenic Amines in Dairy Products: Origin, Incidence, and Control Means. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.*, roč. 15, s. 801–826. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12212>
- Biscola, V., Todorov, S.D., Capuano, V.S.C., Abriouel, H., Gálvez, A., Franco, B.D.G.M., 2013. Isolation and characterization of a nisin-like bacteriocin produced by a *Lactococcus lactis* strain isolated from charqui, a Brazilian fermented, salted and dried meat product. *Meat Sci.*, roč. 93, s. 607–613. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2012.11.021>
- Boehm, T., Karer, M., Gludovac, E., Petroczi, K., Resch, M., Schuetzenberger, K., Klavins, K., Borth, N., Jilma, B., 2020. Simple, sensitive and specific quantification of diamine oxidase activity in complex matrices using newly discovered fluorophores derived from natural substrates. *Inflamm. Res.*, roč. 69, s. 937–950. <https://doi.org/10.1007/s00011-020-01359-5>
- Bogdanović, T., Petričević, S., Brkljača, M., Listeš, I., Pleadin, J., 2020. Biogenic amines in selected foods of animal origin obtained from the Croatian retail market. *Food Addit. Contam. - Part A Chem. Anal. Control. Expo. Risk Assess.*, roč. 37, s. 815–830. <https://doi.org/10.1080/19440049.2020.1726503>

- Bover-Cid, S., Izquierdo-Pulido, M., Vidal-Carou, M.C., 2001. Effect of the interaction between a low tyramine-producing *Lactobacillus* and proteolytic staphylococci on biogenic amine production during ripening and storage of dry sausages. *Int. J. Food Microbiol.*, roč. 65, s. 113–123. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(00\)00525-0](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00525-0)
- Bover-Cid, S., Schoppen, S., Izquierdo-Pulido, M., Vidal-Carou, M.C., 1999. Relationship between biogenic amine contents and the size of dry fermented sausages. *Meat Sci.*, roč. 51, s. 305–311. [https://doi.org/10.1016/S0309-1740\(98\)00120-X](https://doi.org/10.1016/S0309-1740(98)00120-X)
- Bover Cid, S., Miguélez-Arrizado, M.J., Becker, B., Holzapfel, W.H., Vidal-Carou, M.C., 2008. Amino acid decarboxylation by *Lactobacillus curvatus* CTC273 affected by the pH and glucose availability. *Food Microbiol.*, roč. 25, s. 269–277. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2007.10.013>
- Branchek, T.A., Blackburn, T.P., 2003. Trace amine receptors as targets for novel therapeutics: Legend, myth and fact. *Curr. Opin. Pharmacol.*, roč. 3, s. 90–97. [https://doi.org/10.1016/S1471-4892\(02\)00028-0](https://doi.org/10.1016/S1471-4892(02)00028-0)
- Brewer, M.S., 2009. Irradiation effects on meat flavor: A review. *Meat Sci.*, roč. 81, s. 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2008.07.011>
- Broadley, K.J., 2010. The vascular effects of trace amines and amphetamines. *Pharmacol. Ther.*, roč. 125, s. 363–375. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2009.11.005>
- Buňka, F.B., Budinský, P.B., Čechová, M., Drienovský, V.D., Pachlová, V.P., Matoulková, D.M., Kubán, V.K., Buňková, L.B., 2012. Content of biogenic amines and polyamines in beers from the Czech Republic. *J. Inst. Brew.*, roč. 118, s. 213–216. <https://doi.org/10.1002/jib.31>
- Buňková, L., Adamcová, G., Hudcová, K., Velichová, H., Pachlová, V., Lorencová, E., Buňka, F., 2013. Monitoring of biogenic amines in cheeses manufactured at small-scale farms and in fermented dairy products in the Czech Republic. *Food Chem.*, roč. 141, s. 548–551. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.03.036>
- Buňková, L., Buňka, F., Hlobilová, M., Vaňátková, Z., Nováková, D., Dráb, V., 2009. Tyramine production of technological important strains of *Lactobacillus*, *Lactococcus* and *Streptococcus*. *Eur. Food Res. Technol.*, roč. 229, s. 533–538. <https://doi.org/10.1007/s00217-009-1075-3>
- Buňková, L., Buňka, F., Mantlová, G., Čablová, A., Sedláček, I., Švec, P., Pachlová, V., Kráčmar, S., 2010a. The effect of ripening and storage conditions on the distribution of tyramine, putrescine and cadaverine in Edam-cheese. *Food Microbiol.*, roč. 27, s. 880–888. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.04.014>

- Buňková, L., Buňka, F., Hlobilová, M., Dráb, V., Kráčmar, S., 2010b. Komparace rzných metod detekce dekarboxylázové aktivvity u bakterií mléčného kvašení. *Potravinarstvo Slovak Journal of Food Sciences*, roč. 4.
- Buňková, L., Buňka, F., Pollaková, E., Podešvová, T., Dráb, V., 2011. The effect of lactose, NaCl and an aero/anaerobic environment on the tyrosine decarboxylase activity of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* and *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. *Int. J. Food Microbiol.*, roč. 147, s. 112–119. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.03.017>
- Buňková, L., Hudcová, K., Budinský, P., 2012. Sledování kvality farmářských sýrů. *Mlékařské listy*, roč. 133.
- Burdychová, R., Komprda, T., 2007. Biogenic amine-forming microbial communities in cheese. *FEMS Microbiol. Lett.*, roč. 276, s. 149–155. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2007.00922.x>
- Büyükdeveci, M.E., Boga, E.K., Ozyurt, G., 2019. Gamma-irradiation induced effects on biogenic amine formation and quality of frog legs (*Rana esculenta*) during storage. *LWT*, roč. 99, s. 379–386. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.10.001>
- Cai, L., Cao, A., Li, Y., Song, Z., Leng, L., Li, J., 2015. The effects of essential oil treatment on the biogenic amines inhibition and quality preservation of red drum (*Sciaenops ocellatus*) fillets. *Food Control*, roč. 56, s. 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.03.009>
- Callejón, S., Sendra, R., Ferrer, S., Pardo, I., 2016. Cloning and characterization of a new laccase from *Lactobacillus plantarum* J16 CECT 8944 catalyzing biogenic amines degradation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, roč. 100, s. 3113–3124. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-7158-0>
- Callejón, S., Sendra, R., Ferrer, S., Pardo, I., 2014. Identification of a novel enzymatic activity from lactic acid bacteria able to degrade biogenic amines in wine. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, roč. 98, s. 185–198. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-4829-6>
- Calles-Enríquez, M., Eriksen, B.H., Andersen, P.S., Rattray, F.P., Johansen, A.H., Fernández, M., Ladero, V., Alvarez, M.A., 2010. Sequencing and transcriptional analysis of the streptococcus thermophilus histamine biosynthesis gene cluster: Factors that affect differential hdca expression. *Appl. Environ. Microbiol.*, roč. 76, s. 6231–6238. <https://doi.org/10.1128/AEM.00827-10>
- Calo, J.R., Crandall, P.G., O'Bryan, C.A., Ricke, S.C., 2015. Essential oils as antimicrobials in food systems - A review. *Food Control*, roč. 54, s. 111–119. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.12.040>

- Capece, A., Romaniello, R., Siesto, G., Romano, P., 2018. Conventional and non-conventional yeasts in beer production. *Fermentation*, roč. 4, s. 38. <https://doi.org/10.3390/fermentation4020038>
- Caplice, E., Fitzgerald, G.F., 1999. Food fermentations: Role of microorganisms in food production and preservation. *Int. J. Food Microbiol.*, roč. 50, s. 131–149. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(99\)00082-3](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(99)00082-3)
- Capozzi, V., Russo, P., Ladero, V., Fernández, M., Fiocco, D., Alvarez, M.A., Grieco, F., Spano, G., 2012. Biogenic amines degradation by *Lactobacillus plantarum*: Toward a potential application in wine. *Front. Microbiol.*, roč. 3, s. 1–6. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00122>
- Ceruti, R.J., Zorrilla, S.E., Sabbag, N.G., Costa, S.C., Sihufe, G.A., 2015. Acceleration of Reggianito cheese ripening. Effect of increased initial ripening temperatures on biochemical and sensory characteristics. *Dairy Sci. Technol.*, roč. 95, s. 231–243. <https://doi.org/10.1007/s13594-014-0205-2>
- Cleveland, J., Montville, T.J., Nes, I.F., Chikindas, M.L., 2001. Bacteriocins: Safe, natural antimicrobials for food preservation. *Int. J. Food Microbiol.*, roč. 71, s. 1–20. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(01\)00560-8](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(01)00560-8)
- 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*, roč. 10, s. 1–26. <https://doi.org/10.3390/biom10081181>
- Corbineau, S., Breton, M., Mialet-Perez, J., Costemale-Lacoste, J.F., 2017. Major depression and heart failure: Interest of monoamine oxidase inhibitors. *Int. J. Cardiol.*, roč. 247, s. 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2017.07.005>
- Corsetti, A., Perpetuini, G. a R. Tofalo (2014). Biopreservation effects in fermented foods. In *Advances in Fermented Foods and Beverages. - Improving Quality, Technologies and Health Benefits*. 1. vyd. Cambridge: Woodhead Publishing, 2014. Kapitola 13. s. 311–327. ISBN 978-1-78242-02-8.
- Cotter, P.D., Hill, C., Ross, P.R., 2005. Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nat. Rev. Microbiol.*, roč. 3, s. 777–788. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1240>
- Criado, P.R., Criado, R.F.J., Maruta, C.W., Machado Filho, C.D.A., 2010. Histamine, histamine receptors and antihistamines: New concepts. *An. Bras. Dermatol.*, roč. 85, s. 195–210. <https://doi.org/10.1590/S0365-05962010000200010>

- Cueva, C., García-Ruiz, A., González-Rompinelli, E., Bartolome, B., Martín-Álvarez, P.J., Salazar, O., Vicente, M.F., Bills, G.F., Moreno-Arribas, M. V., 2012. Degradation of biogenic amines by vineyard ecosystem fungi. Potential use in winemaking. *J. Appl. Microbiol.*, roč. 112, s. 672–682. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2012.05243.x>
- Dabadé, D.S., Jacxsens, L., Miclotte, L., Abatih, E., Devlieghere, F., De Meulenaer, B., 2021. Survey of multiple biogenic amines and correlation to microbiological quality and free amino acids in foods. *Food Control*, roč. 120. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107497>
- Dadáková, E., Křížek, M., Pelikánová, T., 2009. Determination of biogenic amines in foods using ultra-performance liquid chromatography (UPLC). *Food Chem.*, roč. 116, s. 365–370. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.02.018>
- Dapkevicius, M.L.N.E., Nout, M.J.R., Rombouts, F.M., Houben, J.H., Wymenga, W., 2000. Biogenic amine formation and degradation by potential fish silage starter microorganisms. *Int. J. Food Microbiol.*, roč. 57, s. 107–114. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(00\)00238-5](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00238-5)
- De Mey, E., De Klerck, K., De Maere, H., Dewulf, L., Derdelinckx, G., Peeters, M.C., Fraeye, I., Vander Heyden, Y., Paelinck, H., 2014. The occurrence of N-nitrosamines, residual nitrite and biogenic amines in commercial dry fermented sausages and evaluation of their occasional relation. *Meat Sci.*, roč. 96, s. 821–828. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2013.09.010>
- 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 Chem.*, roč. 218, s. 249–255. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.09.046>
- del Rio, B., Redruello, B., Linares, D.M., Ladero, V., Ruas-Madiedo, P., Fernandez, M., Martin, M.C., Alvarez, M.A., 2019. The biogenic amines putrescine and cadaverine show in vitro cytotoxicity at concentrations that can be found in foods. *Sci. Rep.*, roč. 9, s. 1–7. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-36239-w>
- Delcarlo, S.B., Parada, R., Schelegueda, L.I., Vallejo, M., Marguet, E.R., Campos, C.A., 2019. From the isolation of bacteriocinogenic LAB strains to the application for fish paste biopreservation. *LWT*, roč. 110, s. 239–246. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.04.079>
- Dischinger, J., Basi Chipalu, S., Bierbaum, G., 2014. Lantibiotics: Promising candidates for future applications in health care. *Int. J. Med. Microbiol.*, roč. 304, s. 51–62. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2013.09.003>

- Dole, T., Koltun, S., Baker, S.M., Goodrich-Schneider, R.M., Marshall, M.R., Sarnoski, P.J., 2017. Colorimetric Evaluation of Mahi-Mahi and Tuna for Biogenic Amines. *J. Aquat. Food Prod. Technol.*, roč. 26, s. 781–789. <https://doi.org/10.1080/10498850.2017.1297879>
- Domínguez, R., Munekata, P.E., Agregán, R., Lorenzo, J.M., 2016. Effect of commercial starter cultures on free amino acid, biogenic amine and free fatty acid contents in dry-cured foal sausage. *LWT - Food Sci. Technol.*, roč. 71, s. 47–53. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.03.016>
- Durak-Dados, A., Michalski, M., Osek, J., 2020. Histamine and other biogenic amines in food. *J. Vet. Res.*, roč. 64, s. 281–288. <https://doi.org/10.2478/jvetres-2020-0029>
- EFSA, 2006. Opinion of the Scientific Panel on Food Additives, Flavourings, Processing Aids and Materials in Contact with Food on a request from the Commission related to The use of nisin (E 234) as a food additive. *EFSA J.* roč. 4 (314), s. 1–16. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2006.314>
- EFSA, 2011. Question Number EFSA-Q-2009-00829. Scientific opinion on risk based control of biogenic amine formation in fermented foods. *EFSA J.*, roč. 9, s. 2393–2486. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2011.2393>
- EFSA, 2017. Assessment of the incidents of histamine intoxication in some EU countries. Technical report. *EFSA Support. Publ.*, roč. 14, s. 1–37. <https://doi.org/10.2903/sp.efsa.2017.EN-1301>
- EFSA, 2017. Safety of nisin (E 234) as a food additive in the light of new toxicological data and the proposed extension of use. *EFSA J.*, roč. 15, <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2017.5063>
- EFSA; European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2017. *EFSA J.*, roč. 16. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2018.5500>
- Enascuta, C.E., Stepan, E., Oprescu, E.E., Radu, A., Alexandrescu, E., Stoica, R., Epure, D.G., Niculescu, M.D., 2018. Microencapsulation of essential oils. *Rev. Chim.*, roč. 69, s. 1612–1615. <https://doi.org/10.37358/rc.18.7.6381>
- Eom, J.S., Seo, B.Y., Choi, H.S., 2015. Biogenic amine degradation by *Bacillus* species isolated from traditional fermented soybean food and detection of decarboxylase-related genes. *J. Microbiol. Biotechnol.*, roč. 25, s. 1523–1531. <https://doi.org/10.4014/jmb.1506.06006>
- Espinosa-Pesqueira, D., Roig-Sagués, A.X., Manuela Hernández-Herrero, M., 2018. Screening method to evaluate amino acid-decarboxylase activity of bacteria present in Spanish artisanal ripened cheeses. *Foods*, roč. 7. <https://doi.org/10.3390/foods7110182>



- Falleh, H., Ben Jemaa, M., Saada, M., Ksouri, R., 2020. Essential oils: A promising eco-friendly food preservative. *Food Chem.*, roč. 330, s. 127268. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127268>
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations); WHO (World Health Organization). *Histamine in Salmonids. Joint FAO/WHO Literature Review*; World Health Organization: Geneva, Switzerland, 2018; ISBN 9789241514439.
- Favaro, L., Barretto Penna, A.L., Todorov, S.D., 2015. Bacteriocinogenic LAB from cheeses - Application in biopreservation? *Trends Food Sci. Technol.*, roč. 41, s. 37–48. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2014.09.001>
- Feng, C., Teuber, S., Gershwin, M.E., 2016. Histamine (Scombroid) Fish Poisoning: a Comprehensive Review. *Clin. Rev. Allergy Immunol.*, roč. 50, s. 64–69. <https://doi.org/10.1007/s12016-015-8467-x>
- Fernández-Reina, A., Urdiales, J.L., Sánchez-Jiménez, F., 2018. What we know and what we need to know about aromatic and cationic biogenic amines in the gastrointestinal tract. *Foods*, roč. 7. <https://doi.org/10.3390/foods7090145>
- Fernandez, B., Vimont, A., Desfossés-Foucault, É., Daga, M., Arora, G., Fliss, I., 2017. Antifungal activity of lactic and propionic acid bacteria and their potential as protective culture in cottage cheese. *Food Control* 78, 350–356. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.03.007>
- Finberg, J.P.M., Rabey, J.M., 2016. Inhibitors of MAO-A and MAO-B in psychiatry and neurology. *Front. Pharmacol.*, roč. 7, s. 1–15. <https://doi.org/10.3389/fphar.2016.00340>
- Galgano, F., Suzzi, G., Favati, F., Caruso, M., Martuscelli, M., Gardini, F., Salzano, G., 2001. Biogenic amines during ripening in 'Semicotto Caprino' cheese: Role of enterococci. *Int. J. Food Sci. Technol.*, roč. 36, s. 153–160. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2621.2001.00443.x>
- Gardini, F., Özogul, Y., Suzzi, G., Tabanelli, G., Özogul, F., 2016. Technological factors affecting biogenic amine content in foods: A review. *Front. Microbiol.*, roč. 7, s. 1–18. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01218>
- Glória, M. B. A. (2005). Bioactive Amines. s. 13–32. In: HUI, Y. H.: *Handbook of Food Science, Technology, and Engineering*. Boca Raton: CRC Press, 2005, 3632 s. ISBN 978-1-4665-0787-6.
- Gücüköglü, A., Küplülü, Ö., 2010. The effect of different starter cultures and ripening temperatures on formation of biogenic amine in Turkish fermented sausages. *Eur. Food Res. Technol.*, roč. 230, s. 875–884. <https://doi.org/10.1007/s00217-010-1220-z>

- Guil-Guerrero, J.L., Ramos, L., Moreno, C., Zúñiga-Paredes, J.C., Carlosama-Yepey, M., Ruales, P., 2016. Antimicrobial activity of plant-food by-products: A review focusing on the tropics. *Livest. Sci.*, roč. 189, s. 32–49. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2016.04.021>
- Hasper, H.E., De Kruijff, B., Breukink, E., 2004. Assembly and stability of nisin-Lipid II pores. *Biochemistry*, roč. 43, s. 11567–11575. <https://doi.org/10.1021/bi049476b>
- Hernández-Borges, J., D’Orazio, G., Aturki, Z., Fanali, S., 2007. Nano-liquid chromatography analysis of dansylated biogenic amines in wines. *J. Chromatogr. A*, roč. 1147, s. 192–199. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.02.072>
- Hintz, T., Matthews, K.K., Di, R., 2015. The Use of Plant Antimicrobial Compounds for Food Preservation. *Biomed Res. Int.*, roč. 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/246264>
- Holta, E., Pohjanpelto, P., 1983. Polyamine starvation causes accumulation of cadaverine and its derivatives in a polyamine-dependent strain of Chinese-hamster ovary cells. *Biochem. J.* roč. 210, s. 945–948. <https://doi.org/10.1042/bj2100945>
- Hu, Y., Liu, X., Shan, C., Xia, X., Wang, Y., Dong, M., Zhou, J., 2017. Novel bacteriocin produced by *Lactobacillus alimentarius* FM-MM4 from a traditional Chinese fermented meat Nanx Wudl: Purification, identification and antimicrobial characteristics. *Food Control*, roč. 77, s. 290–297. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.02.007>
- Hu, Y., Xia, W., Liu, X., 2007. Changes in biogenic amines in fermented silver carp sausages inoculated with mixed starter cultures. *Food Chem.*, roč. 104, s. 188–195. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.11.023>
- Huang, Z., Liu, X., Jia, S., Luo, Y., 2017. Antimicrobial effects of cinnamon bark oil on microbial composition and quality of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) fillets during chilled storage. *Food Control*, roč. 82, s. 316–324. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.07.017>
- Hungerford, J.M., 2010. Scombroid poisoning: A review. *Toxicon*, roč. 56, s. 231–243. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2010.02.006>
- Iorizzo, M., Coppola, F., Letizia, F., Testa, B., Sorrentino, E., 2021. Role of Yeasts in the Brewing Process: Tradition and Innovation. *Processes*, roč. 9, s. 839. <https://doi.org/10.3390/pr9050839>

- Chander, H., Batish, V. H., Babu, S., Singh, R. S. 1989. Factors affecting ami-ne production by a selected strain of *Lactobacillus bulgaricus*. *Journal of Food Science*, roč. 54, s. 940–942. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1989.tb07917.x>
- Cheigh, C.I., Pyun, Y.R., 2005. Nisin biosynthesis and its properties. *Biotechnol. Lett.*, roč. 27, s. 1641–1648. <https://doi.org/10.1007/s10529-005-2721-x>
- Chen, H. a D.G. Hoover, 2003. Bacteriocins and their food applications. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.*, roč. 2, s. 82–100.
- Janusz, G., Pawlik, A., Świdorska-Burek, U., Polak, J., Sulej, J., Jarosz-Wilkolazka, A., Paszczyński, A., 2020. Laccase properties, physiological functions, and evolution. *Int. J. Mol. Sci.*, roč. 21. <https://doi.org/10.3390/ijms21030966>
- Jeevaratnam, K., Jamuna, M., Bawa, A.S., 2005. Biological preservation of foods - Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Indian J. Biotechnol.*, roč. 4, s. 446–454.
- Joosten, H.M.L.J., 1988. Conditions allowing the formation of biogenic amines in cheese. *Neth Milk Dairy J.*, roč. 4, s. 329–357.
- Joosten, H.M.L.J., Nuñez, M., 1996. Prevention of histamine formation in cheese by bacteriocin-producing lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, roč. 62, s. 1178–1181. <https://doi.org/10.1128/aem.62.4.1178-1181.1996>
- Jutel, M., M. Akdis a C. A. Akdis, 2009. Histamine, histamine receptors and their role in immune pathology. *Clinical and Experimental Allergy*, roč. 39, s. 1786–1800. ISSN 1365-2222.
- Kalač, P., Krausová, P., 2005. A review of dietary polyamines: Formation, implications for growth and health and occurrence in foods. *Food Chem.*, roč. 90, s. 219–230. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.03.044>
- Kalač, P. a M. Křížek, 2003. A review of biogenic amines and polyamines in beer. *J. Inst. Brew.*, roč. 109, s. 123–128.
- Kalač, P., Šavel, J., Křížek, M., Pelikánová, T., Prokopová, M., 2002. Biogenic amine formation in bottled beer. *Food Chem.*, roč. 79, s. 431–434. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(02\)00193-0](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(02)00193-0)
- Kandasamy, S., Yoo, J., Yun, J., Kang, H.B., Seol, K.H., Ham, J.S., 2021. Quantitative analysis of biogenic amines in different cheese varieties obtained from the korean domestic and retail markets. *Metabolites*, roč. 11, s. 1–16. <https://doi.org/10.3390/metabo11010031>
- Karovičová, J. a Z. Kohajdová, 2005. Biogenic Amines in Food. *Chemical Papers*, roč. 59, s. 70–79. ISSN 1336-9075.

- Kašička, V., 1997. Theoretical Bases and Separation Principles of Capillary Electromigration Methods. Chem. List., roč. 91, s. 326–329.
- Kim, J.H., Ahn, H.J., Jo, C., Park, H.J., Chung, Y.J., Byun, M.W., 2004. Radiolysis of biogenic amines in model system by gamma irradiation. Food Control, roč. 15, s. 405–408. [https://doi.org/10.1016/S0956-7135\(03\)00102-6](https://doi.org/10.1016/S0956-7135(03)00102-6)
- Kim, S.H., Price, R.J., Morrissey, M.T., Field, K.G., Wei, C.I., An, H., 2002. Histamine production by *Morganella morganii* in mackerel, albacore, mahi-mahi, and salmon at various storage temperatures. J. Food Sci., roč. 67, s. 1522–1528. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2002.tb10316.x>
- Kim, T.K., Lee, J.I., Kim, J.H., Mah, J.H., Hwang, H.J., Kim, Y.W., 2011. Comparison of ELISA and HPLC methods for the determination of biogenic amines in commercial doenjang and gochujang. Food Sci. Biotechnol., roč. 20, s. 1747–1750. <https://doi.org/10.1007/s10068-011-0241-0>
- Kimoto-Nira, H., Moriya, N., Ohmori, H., Suzuki, C., 2014. Altered superoxide dismutase activity by carbohydrate utilization in a *Lactococcus lactis* strain. J. Food Prot., roč. 77, s. 1161–1167. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-13-475>
- Klaenhammer, T. R., 1993. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. FEMS Microbiology Reviews., roč. 12, s. 39 – 86.
- Kodíček, Milan (2004). ELISA. In: Biochemické pojmy: výkladový slovní [online]. Praha: VŠCHT Praha, 2004 [cit. 2021-06-14]. Dostupné z: [https://vydavatelstvi-old.vscht.cz/knihy/uid\\_es-002/ebook.html?p=elisa](https://vydavatelstvi-old.vscht.cz/knihy/uid_es-002/ebook.html?p=elisa)
- Kondo, T., Kondo, E., Maki, H., Yasumoto, K., Takagi, K., Kano, K., Ikeda, T., 2004. Purification and characterization of aromatic amine dehydrogenase from *Alcaligenes xylosoxidans*. Biosci. Biotechnol. Biochem., roč. 68, s. 1921–1928. <https://doi.org/10.1271/bbb.68.1921>
- Křížek, M., Dadáková, E., Vácha, F., Pelikánová, T., Matějková, K., 2018. The effects of two essential oil and UV-light irradiation treatments on the formation of biogenic amines in vacuum packed fillets of carp (*Cyprinus carpio*). LWT, roč. 95, s. 268–273. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.04.097>
- Křížek, M a V. Hlavatá, 1995. Stanovení vybraných biogenních aminů v pivu. Kvasný průmysl, roč. 41.

- Kruger, M.F., Barbosa, M. de S., Miranda, A., Landgraf, M., Destro, M.T., Todorov, S.D., Gombossy de Melo Franco, B.D., 2013. Isolation of bacteriocinogenic strain of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* from rocket salad (*Eruca sativa* Mill.) and evidences of production of a variant of nisin with modification in the leader-peptide. *Food Control*, roč. 33, s. 467–476. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.03.043>
- La Gioia, F., Rizzotti, L., Rossi, F., Gardini, F., Tabanelli, G., Torriani, S., 2011. Identification of a tyrosine decarboxylase gene (*tdcA*) in *Streptococcus thermophilus* 1TT45 and analysis of its expression and tyramine production in milk. *Appl. Environ. Microbiol.*, roč. 77, s. 1140–1144. <https://doi.org/10.1128/AEM.01928-10>
- Ladero, V., Calles-Enriquez, M., Fernandez, M., A. Alvarez, M., 2010. Toxicological Effects of Dietary Biogenic Amines. *Curr. Nutr. Food Sci.*, roč. 6, s. 145–156. <https://doi.org/10.2174/157340110791233256>
- Ladero, V., Martín, M.C., Redruello, B., Mayo, B., Flórez, A.B., Fernández, M., Alvarez, M.A., 2015. Genetic and functional analysis of biogenic amine production capacity among starter and non-starter lactic acid bacteria isolated from artisanal cheeses. *Eur. Food Res. Technol.*, roč. 241, s. 377–383. <https://doi.org/10.1007/s00217-015-2469-z>
- Landete, J.M., De Las Rivas, B., Marcobal, A., Muñoz, R., 2011. PCR methods for the detection of biogenic amine-producing bacteria on wine. *Ann. Microbiol.*, roč. 61, s. 159–166. <https://doi.org/10.1007/s13213-010-0068-6>
- Larqué, E., Sabater-Molina, M., Zamora, S., 2007. Biological significance of dietary polyamines. *Nutrition*, roč. 23, s. 87–95. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2006.09.006>
- Lee, Y.C., Lin, C. Saint, Liu, F.L., Huang, T.C., Tsai, Y.H., 2015. Degradation of histamine by *Bacillus polymyxa* isolated from salted fish products. *J. Food Drug Anal.*, roč. 23, s. 836–844. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2015.02.003>
- Leuschner, R.G.K., Hammes, W.P., 1998. Tyramine degradation by micrococci during ripening of fermented sausage. *Meat Sci.*, roč. 49, s. 289–296. [https://doi.org/10.1016/S0309-1740\(97\)00124-1](https://doi.org/10.1016/S0309-1740(97)00124-1)
- Linares, D.M., Martín, M.C., Ladero, V., Alvarez, M.A., Fernández, M., 2011. Biogenic amines in dairy products. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, roč. 51, s. 691–703. <https://doi.org/10.1080/10408398.2011.582813>
- 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 Food Sci. Technol.*, roč. 30, s. 38–55. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2012.11.005>

- Lorencová, E., Buňková, L., Matoulková, D., Dráb, V., Pleva, P., Kubáň, V., Buňka, F., 2012. Production of biogenic amines by lactic acid bacteria and bifidobacteria isolated from dairy products and beer. *Int. J. Food Sci. Technol.*, roč. 47, s. 2086–2091. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2012.03074.x>
- Lorencová, E., Salek, R.N., Černíková, M., Buňková, L., Hýlková, A., Buňka, F., 2020. Biogenic amines occurrence in beers produced in Czech microbreweries. *Food Control*, roč. 117, s. 107335. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107335>
- Ma, J.K., Raslan, A.A., Elbadry, S., El-Ghareeb, W.R., Mulla, Z.S., Bin-Jumah, M., Abdel-Daim, M.M., Darwish, W.S., 2020. Levels of biogenic amines in cheese: correlation to microbial status, dietary intakes, and their health risk assessment. *Environ. Sci. Pollut. Res.*, roč. 27, s. 44452–44459. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-10401-2>
- Maalaoui, A., Trimeche, A., Marnet, P.G., Demarigny, Y., 2020. Use of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* strains to inhibit the development of Pathogens. *Food Nutr. Sci.*, roč. 11, s. 98–112. <https://doi.org/10.4236/fns.2020.112009>
- Mahdy, A.M., Webster, N.R., 2017. Histamine and antihistamines. *Anaesth. Intensive Care Med.*, roč. 18, s. 210–215. <https://doi.org/10.1016/j.mpaic.2017.01.007>
- Maifreni, M., Frigo, F., Bartolomeoli, I., Innocente, N., Biasutti, M., Marino, M., 2013. Identification of the Enterobacteriaceae in Montasio cheese and assessment of their amino acid decarboxylase activity. *J. Dairy Res.*, roč. 80, s. 122–127. <https://doi.org/10.1017/S002202991200074X>
- Maintz, L., Schwarzer, V., Bieber, T., van der Ven, K., Novak, N., 2008. Effects of histamine and diamine oxidase activities on pregnancy: A critical review. *Hum. Reprod. Update*, roč. 14, s. 485–495. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmn014>
- Mantoanelli, J.O.F., Gonçalves, L.M., Pereira, E.A., 2020. Dansyl Chloride as a Derivatizing Agent for the Analysis of Biogenic Amines by CZE-UV. *Chromatographia*, roč. 83, s. 767–778. <https://doi.org/10.1007/s10337-020-03896-x>
- Marcobal, Á., Martín-Álvarez, P.J., Moreno-Arribas, M.V., Muñoz, R., 2006. A multifactorial design for studying factors influencing growth and tyramine production of the lactic acid bacteria *Lactobacillus brevis* CECT 4669 and *Enterococcus faecium* BIFI-58. *Res. Microbiol.*, roč. 157, s. 417–424. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2005.11.006>
- Marková, M a B. Králová, 2004. Pyridoxalfosfát – katalyzátor přeměn aminokyselin. *Chemické listy*, roč. 98, s. 102–107. ISSN 1213-7103.

- Marino, M., Maifreni, M., Moret, S., Rondinini, G., 2000. The capacity of Enterobacteriaceae species to produce biogenic amines in cheese. *Lett. Appl. Microbiol.* <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2000.00783.x>
- Martuscelli, M., Crudele, M.A., Gardini, F., Suzzi, G., 2000. Biogenic amine formation and oxidation by *Staphylococcus xylosus* strains from artisanal fermented sausages. *Lett. Appl. Microbiol.*, roč. 31, s. 228–232. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2000.00796.x>
- Mbarki, R., Sadok, S., Barkallah, I., 2008. Influence of Gamma Irradiation on Microbiological, Biochemical, and Textural Properties of Bonito (*Sarda sarda*) During Chilled Storage. *Food Sci. Technol. Int.*, roč. 14, s. 367–373. <https://doi.org/10.1177/1082013208097444>
- Mendes, R., Silva, H.A., Nunes, M.L., Empis, J.M.A., 2000. Deteriorative changes during ice storage of irradiated blue jack mackerel. *J. Food Biochem.*, roč. 24, s. 89–105. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4514.2000.tb00688.x>
- Min, J. S., Lee, S.O., Jang, A., Jo, C., Lee, M., 2007a. Control of microorganisms and reduction of biogenic amines in chicken breast and thigh by irradiation and organic acids. *Poult. Sci.*, roč. 86, s. 2034–2041. <https://doi.org/10.1093/ps/86.9.2034>
- Min, Joong Seok, Lee, S.O., Jang, A., Jo, C., Lee, M., 2007b. Irradiation and organic acid treatment for microbial control and the production of biogenic amines in beef and pork. *Food Chem.*, roč. 104, s. 791–799. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.12.030>
- Miyake, M., Minami, T., Hirota, M., Toguchi, H., Odomi, M., Ogawara, K.I., Higaki, K., Kimura, T., 2006. Novel oral formulation safely improving intestinal absorption of poorly absorbable drugs: Utilization of polyamines and bile acids. *J. Control. Release*, roč. 111, s. 27–34. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2005.11.010>
- Moini, S., Tahergorabi, R., Hosseini, S.V., Rabbani, M., Tahergorabi, Z., Feás, X., Aflaki, F., 2009. Effect of gamma radiation on the quality and shelf life of refrigerated rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fillets. *J. Food Prot.*, roč. 72, s. 1419–1426. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-72.7.1419>
- Muñoz-Esparza, N.C., Latorre-Moratalla, M.L., Comas-Basté, O., Toro-Funes, N., Veciana-Nogués, M.T., Vidal-Carou, M.C., 2019. Polyamines in food. *Front. Nutr.*, roč. 6, s. 1–11. <https://doi.org/10.3389/fnut.2019.00108>
- Murooka, Y., Doi, N., Harada, T., 1979. Distribution of membrane-bound monoamine oxidase in bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, roč. 38, s. 565–569. <https://doi.org/10.1128/aem.38.4.565-569.1979>

- Naila, A., Flint, S., Fletcher, G., Bremer, P., Meerdink, G., 2010. Control of biogenic amines in food - existing and emerging approaches. *J. Food Sci.*, roč. 75. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2010.01774.x>
- Naila, A., Flint, S., Fletcher, G.C., Bremer, P.J., Meerdink, G., Morton, R.H., 2012. Prediction of the amount and rate of histamine degradation by diamine oxidase (DAO). *Food Chem.*, roč. 135, s. 2650–2660. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.07.022>
- Narang, D., Tomlinson, S., Holt, A., Mousseau, D.D., Baker, G.B., 2011. Trace amines and their relevance to psychiatry and neurology: a brief overview. *Bull. Clin. Psychopharmacol.*, roč. 21, s. 73–79. <https://doi.org/10.5350/kpb-bcp201121113>
- Nařízení Komise (ES) č. 2073/2005 ze dne 15. listopadu 2005 o mikrobiologických kritériích pro potraviny [online]. [cit. 2021-06-14]. Dostupné z: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/TXT/PDF/?uri=CELEX:02005R2073-20130701&from=ET>
- Nařízení Komise (EU) č. 1019/2013 ze dne 23. října 2013, kterým se mění příloha I nařízení (ES) č. 2073/2005, pokud jde o histamin v produktech rybolovu [online]. [cit. 2021-06-14]. Dostupné z: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/TXT/?uri=CELEX%3A32013R1019>
- Nařízení Komise (EU) č. 1129/2011 ze dne 11. listopadu, kterým se mění příloha II nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1333/2008 vytvořením seznamu potravinářských přídatných látek Unie [online]. [cit. 2021-06-14]. Dostupné z: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/TXT/PDF/?uri=CELEX:32011R1129&from=SL>
- Nes, I.F., Yoon, S.S., Diep, D.B., 2007. Ribosomally synthesized antimicrobial peptides (bacteriocins) in lactic acid bacteria: A review. *Food Sci. Biotechnol.*, roč. 16, s. 675–690. <https://doi.org/10.2174/1389450024605409>
- Novella-Rodriguez, S., Veciana-Nogues, M.T., Izquierdo-Pulido, M., Vidal-Carou, M.C., 2003. Distribution of Biogenic Amines and Polyamines in Cheese. *J. Food Sci.*, roč. 68, s. 750–756. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2003.tb08236.x>
- Niu, T., Li, X., Guo, Y., Ma, Y., 2019. Biogenic Amines in Chinese Rice Wine and Its Enzymatic Mechanism. *Foods*, roč. 8, s. 312. <https://doi.org/10.3390/foods8080312>
- O'Mahony, L., M. Akdis a C. A. Akdis, 2011. Regulation of the immune response and inflammation by histamine and histamine receptors. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, roč. 128, s. 1153–1164. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2011.06.051>



- Önal, A., 2007. A review: Current analytical methods for the determination of biogenic amines in foods. *Food Chem.*, roč. 103, s. 475–1486. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.08.028>
- Ordóñez, J.L., Troncoso, A.M., García-Parrilla, M.D.C., Callejón, R.M., 2016. Recent trends in the determination of biogenic amines in fermented beverages – A review. *Anal. Chim. Acta*, roč. 939, s. 10–25. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2016.07.045>
- Pachlová, V., Buňka, F., Flasarová, R., Válková, P., Buňková, L., 2012. The effect of elevated temperature on ripening of Dutch type cheese. *Food Chem.*, roč. 132, s. 1846–1854. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.12.017>
- Pachlová, V., Buňková, L., Flasarová, R., Salek, R.N., Dlabajová, A., Butor, I., Buňka, F., 2018. Biogenic amine production by nonstarter strains of *Lactobacillus curvatus* and *Lactobacillus paracasei* in the model system of Dutch-type cheese. *LWT*, roč. 97, s. 730–735. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.07.045>
- Panoutsopoulos, G.I., Kouretas, D., Gounaris, E.G., Beedham, C., 2004. Enzymatic oxidation of 2-phenylethylamine to phenylacetic acid and 2-phenylethanol with special reference to the metabolism of its intermediate phenylacetaldehyde. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.*, roč. 95, s. 273–279. <https://doi.org/10.1111/j.1742-7843.2004.t01-1-pto950505.x>
- Papageorgiou, M., Lambropoulou, D., Morrison, C., Kłodzińska, E., Namieśnik, J., Płotka-Wasyłka, J., 2018. Literature update of analytical methods for biogenic amines determination in food and beverages. *TrAC - Trends Anal. Chem.*, roč. 98, s. 128–142. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2017.11.001>
- Parada, J.L., Caron, C.R., Medeiros, A.B.P., Soccol, C.R., 2007. Bacteriocins from lactic acid bacteria: Purification, properties and use as biopreservatives. *Brazilian Arch. Biol. Technol.*, roč. 50, s. 521–542. <https://doi.org/10.1590/s1516-89132007000300018>
- Parente, E., Martuscelli, M., Gardini, F., Grieco, S., Crudele, M. A., Suzzi, G., 2001. Evolution of microbial populations and biogenic amine production in dry sausages produced in Southern Italy. *Journal of Applied Microbiology*, roč. 90, s. 882–891. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2001.01322.x>
- Parsons, M.E., Ganellin, C.R., 2006. Histamine and its receptors. *Br. J. Pharmacol.*, roč. 147, s. 127–135. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0706440>
- Pegg, A.E., 2013. Toxicity of polyamines and their metabolic products. *Chem. Res. Toxicol.*, roč. 26, s. 1782–1800. <https://doi.org/10.1021/tx400316s>

- Perez, M., Calles-Enríquez, M., Nes, I., Martin, M.C., Fernandez, M., Ladero, V., Alvarez, M.A., 2015. Tyramine biosynthesis is transcriptionally induced at low pH and improves the fitness of *Enterococcus faecalis* in acidic environments. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, roč. 99, s. 3547–3558. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-6301-7>
- Perez, R.H., Zendo, T., Sonomoto, K., 2014. Novel bacteriocins from lactic acid bacteria (LAB): Various structures and applications. *Microb. Cell Fact.*, roč. 13, S3. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-13-S1-S3>
- Punyaappa-path, S., Phumkhachorn, P., 2015. Nisin: production and mechanism of antimicrobial action. *Int. J. Curr. Res. Rev.*, roč. 7, s. 47–53.
- Rabie, M.A., Toliba, A.O., 2013. Effect of irradiation and storage on biogenic amine contents in ripened Egyptian smoked cooked sausage. *J. Food Sci. Technol.*, roč. 50, s. 1165–1171. <https://doi.org/10.1007/s13197-011-0444-7>
- Rafehi, M., Faltraco, F., Matthaei, J., Prukop, T., Jensen, O., Grytzmann, A., Blome, F.G., Berger, R.G., Krings, U., Vormfelde, S. V., Tzvetkov, M. V., Brockmöller, J., 2019. Highly variable pharmacokinetics of tyramine in humans and polymorphisms in OCT1, CYP2D6, and MAO-A. *Front. Pharmacol.*, roč. 10, s. 1–13. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.01297>
- Rea, M. C., Franz, C. M. A. P., Holzappel, W. H., Cogan. T. M., 2004. Development of Enterococci and Production of Tyramine during the Manufacture and Ripening of Cheddar Cheese. *Irish J. Agric. Food Res.*, roč. 43, s. 247-258.
- Reiners, J., Lagedroste, M., Gottstein, J., Adeniyi, E.T., Kalscheuer, R., Poschmann, G., Stühler, K., Smits, S.H.J., Schmitt, L., 2020. Insights in the Antimicrobial Potential of the Natural Nisin Variant Nisin H. *Front. Microbiol.*, roč. 11, s. 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.573614>
- Reis, J.A., Paula, A.T., Casarotti, S.N., Penna, A.L.B., 2012. Lactic Acid Bacteria Antimicrobial Compounds: Characteristics and Applications. *Food Eng. Rev.*, roč. 4, s. 124–140. <https://doi.org/10.1007/s12393-012-9051-2>
- Rezaei, A., Alirezalu, K., Damirchi, S.A., Hesari, J., Papademas, P., Domínguez, R., Lorenzo, J.M., Yaghoubi, M., 2020. Effect of pasteurization and ripening temperature on chemical and sensory characteristics of traditional motal cheese. *Fermentation*, roč. 6, s. 95. <https://doi.org/10.3390/FERMENTATION6040095>
- Roig-Sagués, A.X., Molina, A.P., Hernández-Herrero, M.M., 2002. Histamine and tyramine-forming microorganisms in Spanish traditional cheeses. *Eur. Food Res. Technol.*, roč. 215, s. 96–100. <https://doi.org/10.1007/s00217-002-0521-2>

- Romano, A., Ladero, V., Alvarez, M.A., Lucas, P.M., 2014. Putrescine production via the ornithine decarboxylation pathway improves the acid stress survival of *Lactobacillus brevis* and is part of a horizontally transferred acid resistance locus. *Int. J. Food Microbiol.*, roč. 175, s. 14–19. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.01.009>
- Roseiro, C., Santos, C., Sol, M., Silva, L., Fernandes, I., 2006. Prevalence of biogenic amines during ripening of a traditional dry fermented pork sausage and its relation to the amount of sodium chloride added. *Meat Sci.*, roč. 74, s. 557–563. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2006.03.030>
- Ruiz-Capillas, C., Herrero, A.M., 2019. Impact of biogenic amines on food quality and safety. *Foods*, roč. 8. <https://doi.org/10.3390/foods8020062>
- Saelao, S., Maneerat, S., Thongruck, K., Watthanasakphuban, N., Wiriyagulopas, S., Chobert, J.M., Haertlé, T., 2018. Reduction of tyramine accumulation in Thai fermented shrimp (kung-som) by nisin Z-producing *Lactococcus lactis* KTH0-1S as starter culture. *Food Control*, roč. 90, s. 249–258. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.03.003>
- Salvi, D., Tavladoraki, P., 2020. The tree of life of polyamine oxidases. *Sci. Rep.*, roč. 10. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-74708-3>
- Şanlıbaba, P., Akkoç, N., Akçelik, M., 2009. Identification and characterisation of antimicrobial activity of nisin A produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* LL27. *Czech J. Food Sci.*, roč. 27, s. 55–64. <https://doi.org/10.17221/151/2008-cjfs>
- Santin, Y., Resta, J., Parini, A., Mialet-Perez, J., 2021. Monoamine oxidases in age-associated diseases: New perspectives for old enzymes. *Ageing Res. Rev.*, roč. 66, s. 101256. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2021.101256>
- Sarkadi, L. S. (2008). Biogenic Amines. In *Process-induced food toxicants: occurrence, formation, mitigation, and health risks*. New Jersey: John Wiley & Sons, 2009. Kapitola 3b. s. 321 – 361. ISBN 978-0-470-07475-6.
- Sharaf, E.F. a R.M. Al Harbi, 2011. Isolation, Identification and Antimicrobial Activity of Some Local Isolates of Lactic Acid Bacteria. *Res. J. Microbiol.*, roč. 6, s. 826-838. <https://doi.org/10.3923/jm.2011.826.838>
- Schirone, M., Tofalo, R., Fasoli, G., Perpetuini, G., Corsetti, A., Manetta, A.C., Ciarrocchi, A., Suzzi, G., 2013. High content of biogenic amines in Pecorino cheeses. *Food Microbiol.*, roč. 34, s. 137–144. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2012.11.022>
- Schnedl, W.J., Enko, D., 2020. Considering histamine in functional gastrointestinal disorders. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, roč. 0, s. 1–8. <https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1791049>

- Seiler, N., 2004. Catabolism of polyamines. *Amino Acids*, roč. 26, s. 217–233. <https://doi.org/10.1007/s00726-004-0070-z>
- Shalaby, A.R., 1996. Significance of biogenic amines to food safety and human health. *Food Res. Int.*, roč. 29, s. 675–690. [https://doi.org/10.1016/S0963-9969\(96\)00066-X](https://doi.org/10.1016/S0963-9969(96)00066-X)
- Shalaby, A.R., Anwar, M.M., Sallam, E.M., Emam, W.H., 2016. Quality and safety of irradiated food regarding biogenic amines: Ras cheese. *Int. J. Food Sci. Technol.*, roč. 51, s. 1048–1054. <https://doi.org/10.1111/ijfs.13058>
- Siddiqui, J.A., Shoeb, S.M., Takayama, S., Shimizu, E., Yorifuji, T., 2000. Purification and characterization of histamine dehydrogenase from *Nocardioides simplex* IFO 12069. *FEMS Microbiol. Lett.*, roč. 189, s. 183–187. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(00\)00277-9](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(00)00277-9)
- Silla Santos, M.H., 1996. Biogenic amines: Their importance in foods. *Int. J. Food Microbiol.*, roč. 29, s. 213–231. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(95\)00032-1](https://doi.org/10.1016/0168-1605(95)00032-1)
- Sisecioglu, M., Kirecci, E., Cankaya, M., Ozdemir, H., Gulcin, I., Atasever, A., 2010. The prohibitive effect of lactoperoxidase system (LPS) on some pathogen fungi and bacteria. *Afr. J. Pharm. Pharmacol.*, roč. 4, s. 671–677.
- Smělá, D., Pechová, P., Komprda, T., Klejdus, B., Kubáň, V., 2004. Chromatografické stanovení biogenních aminů v trvanlivých salámech během fermentace a skladování. *Chem. List.*, roč. 98, s. 432–437.
- Stadnik, J., Dolatowski, Z.J., 2010. Biogenic amines in meat and fermented meat products. *Acta Sci. Pol. Technol. Aliment.*, roč. 9, s. 251–263.
- Stratton, J. E., Hutkins, R. W., Taylor, S. L., 1991. Histamine production in low – salt Cheddar cheese. *Journal of Food Protection*, roč. 54, s. 852–867. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-54.11.852>
- Sturza, A., Popoiu, C.M., Ionica, M., Duicu, O.M., Olariu, S., Muntean, D.M., Boia, E.S., 2019. Monoamine oxidase-related vascular oxidative stress in diseases associated with inflammatory burden. *Oxid. Med. Cell. Longev.*, roč. 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/8954201>
- Šušković, J., Kos, B., Beganović, J., Pavunc, A.L., Habjanič, K., Matoć, S., 2010. Antimicrobial activity - The most important property of probiotic and starter lactic acid bacteria. *Food Technol. Biotechnol.*, roč. 48, s. 296–307.
- Suzuki, A., Suzuki, M., 2021. Antimicrobial activity of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* isolated from a stranded cuvier's beaked whale (*Ziphius cavirostris*) against gram-positive and -negative bacteria. *Microorganisms*, roč. 9, s. 1–14. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9020243>

- Suzzi, G., Gardini, F., 2003. Biogenic amines in dry fermented sausages: A review. *Int. J. Food Microbiol.*, roč. 88, s. 41–54. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(03\)00080-1](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00080-1)
- Tabanelli, G., Montanari, C., Bargossi, E., Lanciotti, R., Gatto, V., Felis, G., Torriani, S., Gardini, F., 2014. Control of tyramine and histamine accumulation by lactic acid bacteria using bacteriocin forming lactococci. *Int. J. Food Microbiol.*, roč. 190, s. 14–23. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.08.023>
- Tagg, J.R., McGiven, A.R., 1971. Assay system for bacteriocins. *Appl. Microbiol.*, 21, s. 943. <https://doi.org/10.1128/aem.21.5.943-943.1971>
- Thomas, L.; Clarkson, M. a J. Delves-Broughton (2000). Nisin. In *Natural Food Antimicrobial Systems*. CRC Press (Taylor & Francis Group): Boca Raton, FL, 2000. Kapitola 18, s. 463–524. <https://doi.org/10.1201/9781420039368.ch18>
- Toy, N., Özogul, F., Özogul, Y., 2015. The influence of the cell free solution of lactic acid bacteria on tyramine production by food borne-pathogens in tyrosine decarboxylase broth. *Food Chem.*, roč. 173, s. 45–53. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.10.001>
- Trip, H., Mulder, N.L., Lolkema, J.S., 2012. Improved acid stress survival of *Lactococcus lactis* expressing the histidine decarboxylation pathway of *Streptococcus thermophilus* CHCC1524. *J. Biol. Chem.*, roč. 287, s. 11195–11204. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.330704>
- Van Ba, H., Seo, H.W., Kim, J.H., Cho, S.H., Kim, Y.S., Ham, J.S., Park, B.Y., Kim, H.W., Kim, T. Bin, Seong, P.N., 2016. The effects of starter culture types on the technological quality, lipid oxidation and biogenic amines in fermented sausages. *LWT - Food Sci. Technol.*, roč. 74, s. 191–198. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.07.019>
- Vanda, P., Miranda, A., M. Leca, J., C. Marques, J., 2017. Analytical methodologies for the determination of biogenic amines in wines: an overview of the recent trends. *J. Anal. Bioanal. Sep. Tech.*, roč. 2, s. 52–57. <https://doi.org/10.15436/2476-1869.17.1296>
- Vidal-Carou, M.C., M.T. Veciana-Nogués a M.L. Latorre-Moratalla (2008). *Biogenic Amines: Risks and Control*. In *Handbook of Fermented Meat and Poultry*. 1. vyd. UK: Blackwell Publishing, 2007. Kapitola 43. s. 455–468. ISBN 978-0-8138-1477-3.
- Walsh, E.A., Diako, C., Smith, D.M., Ross, C.F., 2020. Influence of storage time and elevated ripening temperature on the chemical and sensory properties of white Cheddar cheese. *J. Food Sci.*, roč. 85, s. 268–278. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.14998>

- Wolken, W.A.M., Lucas, P.M., Lonvaud-Funel, A., Lolkema, J.S., 2006. The mechanism of the tyrosine transporter TyrP supports a proton motive tyrosine decarboxylation pathway in *Lactobacillus brevis*. *J. Bacteriol.*, roč. 188, s. 2198–2206. <https://doi.org/10.1128/JB.188.6.2198-2206.2006>
- Wunderlichová, L., Buňková, L., Koutný, M., Valenta, T., Buňka, F., 2013. Novel touchdown-PCR method for the detection of putrescine producing Gram-negative bacteria in food products. *Food Microbiol.*, roč. 34, s. 268–276. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2012.09.024>
- Yagodina, O. V., Nikol'skaya, E.B., Khovanskikh, A.E., Kormilitsyn, B.N., 2002. Amine oxidases of microorganisms. *J. Evol. Biochem. Physiol.*, roč. 38, s. 251–258. <https://doi.org/10.1023/A:1020714607203>
- Yerlikaya, O., 2019. Probiotic potential and biochemical and technological properties of *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* strains isolated from raw milk and kefir grains. *J. Dairy Sci.*, roč. 102, s. 124–134. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-14983>
- Yu, A.M., Granvil, C.P., Haining, R.L., Krausz, K.W., Corchero, J., Küpfer, A., Idle, J.R., Gonzalez, F.J., 2003. The relative contribution of monoamine oxidase and cytochrome P450 isozymes to the metabolic deamination of the trace amine tryptamine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, roč. 304, s. 539–546. <https://doi.org/10.1124/jpet.102.043786>
- Zaman, M.Z., Bakar, F.A., Selamat, J., Bakar, J., 2010. Occurrence of biogenic amines and amines degrading bacteria in fish sauce. *Czech J. Food Sci.*, roč. 28, s. 440–449. <https://doi.org/10.17221/312/2009-cjfs>

## 9. SEZNAM OBRÁZKŮ A TABULEK

### Seznam obrázků

- Obr. 1: Dekarboxylace aminokyselin za vzniku příslušných BA a jejich transport přes buněčnou membránu. Histidindekarboxyláza (HDC), lyzindekarboxyláza (LDC), tyrozindekarboxyláza (TDC), ornitindekarboxyláza (ODC) (upraveno dle Gardini et al., 2016).*..... 11
- Obr. 2: Biosyntéza nisinu. Dha – dehydroalanin, Dhb – dehydrobutyrin, Abu – aminomáselná kyselina, A – alanin, S – thioetherový můstek (upraveno dle Punyaappa-path a Phumkhachorn, 2015)*..... 32
- Obr. 3: Znárodnění vzniku póru v buněčné membráně interakcí nisinu s lipidem II (upraveno dle Punyaappa-path a Phumkhachorn, 2015)*..... 33
- Obr. 4: Obecný mechanismus antimikrobiálního působení esenciálních olejů (upraveno dle Alves Carneiro et al., 2020)* ..... 34
- Obr. 5: Vznik dansyl-derivátu (upraveno dle Hernández-Borges et al., 2007)* . 36
- Obr. 6 – Princip ELISA (převzato z Kodíček, 2004)* ..... 37
- Obr. 7: Antimikrobiální působení komerčního přípravku nisinu na kmeny *Lactilactobacillus curvatus* T2, T3, T8, T15 a T36.*..... 57
- Obr. 8: Antimikrobiální působení komerčního přípravku nisinu na kmeny *Levilactobacillus brevis* RIBM 33, RIBM 50, RIBM 62, RIBM 67 a RIBM 68.* . 58
- Obr. 9: Antimikrobiální působení komerčního přípravku nisinu na kmeny *Levilactobacillus brevis* RIBM 69, RIBM 70, RIBM 72, RIBM 78 a RIBM 93.* . 58
- Obr. 10: Antimikrobiální působení komerčního přípravku nisinu na kmeny *Levilactobacillus brevis* (RIBM 101 a RIBM 111) a *Lactiplantibacillus plantarum* (RIBM 89 a RIBM 96) a *Lacticaseibacillus casei/paracasei* (RIBM 113).*..... 59
- Obr. 11: Vývoj produkce tyraminu kmenem *Lactiplantibacillus plantarum* RIBM 89 v přítomnosti *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* CCDM 686 a CCDM 689 při teplotě 30 °C (čas inokulace 0 h).* ..... 61
- Obr. 12: Vývoj produkce tyraminu kmenem *Lactiplantibacillus plantarum* RIBM 89 v přítomnosti *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* CCDM 686 a CCDM 689 při teplotě 30 °C (čas inokulace 5 h).* ..... 61
- Obr. 13: Vývoj produkce tyraminu kmenem *Lactiplantibacillus plantarum* RIBM 89 v přítomnosti *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* CCDM 686 a CCDM 689 při teplotě 30 °C (čas inokulace 12 h).* ..... 62
- Obr. 14: Vývoj produkce tyraminu kmenem *Lactiplantibacillus plantarum* RIBM 89 po přidavku supernatantu *Lc. lactis* ssp. *lactis* CCDM 686 (CFS 686) a supernatantu *Lc. lactis* ssp. *lactis* CCDM 689 (CFS 689) při teplotě 30 °C (čas inokulace 0 h).* ..... 63

<i>Obr. 15: Vývoj produkce tyraminu kmenem Lactiplantibacillus plantarum RIBM 89 po přidavku supernatantu Lc. lactis ssp. lactis CCDM 686 (CFS 686) a supernatantu Lc. lactis ssp. lactis CCDM 689 (CFS 689) při teplotě 30 °C (čas inokulace 5 h).....</i>	<i>64</i>
<i>Obr. 16: Vývoj produkce tyraminu kmenem Lactiplantibacillus plantarum RIBM 89 po přidavku supernatantu Lc. lactis ssp. lactis CCDM 686 (CFS 686) a supernatantu Lc. lactis ssp. lactis CCDM 689 (CFS 689) při teplotě 30 °C (čas inokulace 12 h).....</i>	<i>64</i>
<i>Obr. 17: Počty bakterií při růstu kultury Lactiplantibacillus plantarum RIBM 89 v kultivačním médiu po aplikaci supernatantů kultury CCDM 686 a CCDM 689 v čase 0 h (teplota kultivace 30 °C). .....</i>	<i>65</i>
<i>Obr. 18: Vývoj produkce tyraminu kmenem Lactiplantibacillus plantarum RIBM 89 v přítomnosti Lactococcus lactis ssp. lactis CCDM 686 a CCDM 689 při teplotě 12 °C (čas inokulace 0. den). .....</i>	<i>66</i>
<i>Obr. 19: Vývoj produkce tyraminu kmenem Lactiplantibacillus plantarum RIBM 89 v přítomnosti Lactococcus lactis ssp. lactis CCDM 686 a CCDM 689 při teplotě 12 °C (čas inokulace 4. den). .....</i>	<i>67</i>
<i>Obr. 20: Vývoj produkce tyraminu kmenem Lactiplantibacillus plantarum RIBM 89 v přítomnosti Lactococcus lactis ssp. lactis CCDM 686 a CCDM 689 při teplotě 12 °C (čas inokulace 9. den). .....</i>	<i>67</i>
<i>Obr. 21: Vývoj produkce tyraminu kmenem Lactiplantibacillus plantarum RIBM 89 po přidavku supernatantu kultury CCDM 686 (CFS 686) a supernatantu kultury CCDM 689 (CFS 689) při teplotě 12 °C (čas inokulace 0. den).....</i>	<i>68</i>
<i>Obr. 22: Vývoj produkce tyraminu kmenem Lactiplantibacillus plantarum RIBM 89 po přidavku supernatantu kultury CCDM 686 (CFS 686) a supernatantu kultury CCDM 689 (CFS 689) při teplotě 12 °C (čas inokulace 4. den).....</i>	<i>69</i>
<i>Obr. 23: Vývoj produkce tyraminu kmenem Lactiplantibacillus plantarum RIBM 89 po přidavku supernatantu kultury CCDM 686 (CFS 686) a supernatantu kultury CCDM 689 (CFS 689) při teplotě 12 °C (čas inokulace 9. den).....</i>	<i>69</i>
<i>Obr. 24: Počty bakterií při růstu kultury Lactiplantibacillus plantarum RIBM 89 v kultivačním médiu po aplikaci supernatantů kultury CCDM 686 a CCDM 689 v čase 0 h (teplota kultivace 12 °C). .....</i>	<i>70</i>
<i>Obr. 25: Vývoj produkce tyraminu kmenem Latilactobacillus curvatus T3 v přítomnosti Lactococcus lactis ssp. lactis CCDM 686 a CCDM 689 a jejich supernatantů (CFS 686 a CFS 689) při teplotě 30 °C (čas inokulace 0 h). .....</i>	<i>71</i>
<i>Obr. 26: Vývoj produkce tyraminu kmenem Latilactobacillus curvatus T3 v přítomnosti Lactococcus lactis ssp. lactis CCDM 686 a CCDM 689 a jejich supernatantů (CFS 686 a CFS 689) při teplotě 30 °C (čas inokulace 5 h). .....</i>	<i>71</i>



<i>Obr. 27: Vývoj produkce tyraminu kmenem Latilactobacillus curvatus T3 v přítomnosti Lactococcus lactis ssp. lactis CCDM 686 a CCDM 689 a jejich supernatantů (CFS 686 a CFS 689) při teplotě 30 °C (čas inokulace 12 h).....</i>	<i>72</i>
<i>Obr. 28: Počty bakterií při růstu kultury Latilactobacillus curvatus T3 v kultivačním médiu po aplikaci supernatantů kultury CCDM 686 a CCDM 689 v čase 0 h (teplota kultivace 30 °C).....</i>	<i>73</i>
<i>Obr. 29: Počty bakterií při růstu kultury Latilactobacillus curvatus T3 v kultivačním médiu po aplikaci supernatantů kultury CCDM 686 a CCDM 689 v čase 0 h (teplota kultivace 12 °C).....</i>	<i>76</i>
<i>Obr. 30: Vývoj produkce tyraminu kmenem Latilactobacillus curvatus T3 v přítomnosti Lactococcus lactis ssp. lactis CCDM 686 a CCDM 689 a jejich supernatantů (CFS 686 a CFS 689) při teplotě 12 °C (čas inokulace 0. den)...</i>	<i>74</i>
<i>Obr. 31: Vývoj produkce tyraminu kmenem Latilactobacillus curvatus T3 v přítomnosti Lactococcus lactis ssp. lactis CCDM 686 a CCDM 689 a jejich supernatantů (CFS 686 a CFS 689) při teplotě 12 °C (čas inokulace 4. den)...</i>	<i>74</i>
<i>Obr. 32: Vývoj produkce tyraminu kmenem Latilactobacillus curvatus T3 v přítomnosti Lactococcus lactis ssp. lactis CCDM 686 a CCDM 689 a jejich supernatantů (CFS 686 a CFS 689) při teplotě 12 °C (čas inokulace 9. den)...</i>	<i>76</i>
<i>Obr. 33: Vliv nisinu na produkci tyraminu kmenem Lactiplantibacillus plantarum RIBM 89 při teplotě 30 °C (čas aplikace 0 h). .....</i>	<i>78</i>
<i>Obr. 34: Vliv nisinu na růst kmene Lactiplantibacillus plantarum RIBM 89 při teplotě 30 °C (čas aplikace 0 h). .....</i>	<i>78</i>
<i>Obr. 35: Vliv nisinu na produkci tyraminu kmenem Lactiplantibacillus plantarum RIBM 89 při teplotě 30 °C (čas aplikace 5 h). .....</i>	<i>79</i>
<i>Obr. 36: Vliv nisinu na produkci tyraminu kmenem Lactiplantibacillus plantarum RIBM 89 při teplotě 30 °C (čas aplikace 12 h). .....</i>	<i>80</i>
<i>Obr. 37: Vliv nisinu na produkci tyraminu kmenem Lactiplantibacillus plantarum RIBM 89 při teplotě 12 °C (čas aplikace 0. den). .....</i>	<i>81</i>
<i>Obr. 38: Vliv nisinu na růst kmene Lactiplantibacillus plantarum RIBM 89 při teplotě 12 °C (čas aplikace 0. den).....</i>	<i>82</i>
<i>Obr. 39: Vliv nisinu na produkci tyraminu kmenem Lactiplantibacillus plantarum RIBM 89 při teplotě 12 °C (čas aplikace 4. den). .....</i>	<i>83</i>
<i>Obr. 40: Vliv nisinu na produkci tyraminu kmenem Lactiplantibacillus plantarum RIBM 89 při teplotě 12 °C (čas aplikace 9. den). .....</i>	<i>83</i>
<i>Obr. 41: Vliv nisinu na produkci tyraminu kmenem Latilactobacillus curvatus T3 při teplotě 30 °C (čas aplikace 0 h).....</i>	<i>84</i>
<i>Obr. 42: Vliv nisinu na produkci tyraminu kmenem Latilactobacillus curvatus T3 při teplotě 30 °C (čas aplikace 5 h).....</i>	<i>85</i>

<i>Obr. 43: Vliv nisinu na produkci tyraminu kmenem <i>Latilactobacillus curvatus</i> T3 při teplotě 30 °C (čas aplikace 12 h).</i>	86
<i>Obr. 44: Vliv nisinu na růst kmene <i>Latilactobacillus curvatus</i> T3 při teplotě 30 °C (čas aplikace 0 h).</i>	86
<i>Obr. 45: Vliv nisinu na produkci tyraminu kmenem <i>Latilactobacillus curvatus</i> T3 při teplotě 12 °C (čas aplikace 0. den).</i>	87
<i>Obr. 46: Vliv nisinu na růst kmene <i>Latilactobacillus curvatus</i> T3 při teplotě 12 °C (čas aplikace 0. den).</i>	88
<i>Obr. 47: Vliv nisinu na produkci tyraminu kmenem <i>Latilactobacillus curvatus</i> T3 při teplotě 12 °C (čas aplikace 4. den).</i>	89
<i>Obr. 48: Vliv nisinu na produkci tyraminu kmenem <i>Latilactobacillus curvatus</i> T3 při teplotě 12 °C (čas aplikace 9. den).</i>	89

## **Seznam tabulek**

<i>Tab. 1 – Výčet některých potravin, kde se využívá nisin (komerční přípravek Nisaplin) k bioprezervaci (Thomas et al., 2000)</i>	30
<i>Tab. 2 – Seznam použitých kmenů schopných produkce antimikrobiální látky</i>	40
<i>Tab. 3 – Použité dekarboxyláza-pozitivní mikroorganismy</i>	41
<i>Tab. 4 – Lineární gradientový eluční program</i>	49
<i>Tab. 5 – Inhibiční účinek supernatantů z kmenů <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> CCDM 686 a CCDM 689 na dekarboxyláza-pozitivní kmeney BMK [údaje jsou vyjádřeny jako průměry inhibičních zón v mm ze dvou měření ± SD včetně velikosti jamky o průměru 6,5 mm]</i>	51

## 10. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

A	Alanin
ABU	Aminomáselná kyselina
AE	Aerobní kultivace
AGM	Agmatin
ALDH	Aldehyddehydrogenáza
AMK	Aminokyseliny
AN	Anaerobní kultivace
ATP	Adenosintrifosfát
BA	Biogenní aminy
BIOHAZ	Vědecký panel pro biologická rizika
BLIS	Látky podobné bakteriocinům
BMK	Bakterie mléčného kvašení
CAD	Kadaverin
CCDM	Cultures Collection of Dairy Microorganisms
CFS	Bezbuňčný supernatant
CNS	Centrální nervový systém
CZE	Kapilární zónová elektroforéza
DAO	Diaminooxidáza
DHA	Dehydroalanin
DHB	Dehydrobutyrin
ECDC	Evropské středisko pro prevenci a kontrolunemocí
EFSA	Evropský úřad pro bezpečnost potravin
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
EU	Evropská unie
FAD	Flavinadenindinukleotid
FDA	Úřad pro kontrolu potravin a léčiv
GRAS	Všeobecně považovaný za bezpečný
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peroxid vodíku
HDC	Histidindekarboxyláza
HIM	Histamin
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie
LDC	Lyzindekarboxyláza
MAO	Monoaminoxidáza
MAOI	Inhibitory enzymu monoaminoxidáza
MCO	„Multicopper“ oxidáza
MHA/MHB	Mueller-Hinton agar/bujón
MRS	De Man, Rogosa a Sharpe agar/bujón
ODC	Ornitindekarboxyláza
PAO	Polyaminoxidáza
PCR	Polymerázová řetězová reakce

PHE	2-fenyletylamin
PMF	Proton motive force
PUT	Putrescin
S	Thioetherový můstek
SPD	Spermidin
SPM	Spermin
SSAT	Spermidin/spermin- <i>N</i> <sup>1</sup> -acetyltransferáza
TDC	Tyrozindekarboxyláza
TRM	Tryptamin
TYM	Tyramin

# 11. CURRICULUM VITAE

## OSOBNÍ ÚDAJE

---

**Jméno a příjmení:** Khatantuul Purevdorj  
**Datum a místo narození:** 21.04.1988 v Ulaanbaataru  
**Trvalé bydliště:** Na Honech I 5539, 76005 Zlín  
**Email:** purevdorj@utb.cz

## VZDĚLÁNÍ

---

2013–dosud **UTB ve Zlíně, Fakulta technologická**  
Doktorské studium; obor: Technologie potravin  
2011–2013 **UTB ve Zlíně, Fakulta technologická**  
Navazující magisterské studium; obor: Technologie, hygiena  
a ekonomika výroby potravin  
2008–2011 **UTB ve Zlíně, Fakulta technologická**  
Bakalářské studium; obor: Chemie a technologie potravin  
2004–2008 Gymnázium Zlín – Lesní čtvrť

## JAZYKOVÉ ZNALOSTI

---

Mongolština mateřský jazyk  
Čeština C2  
Angličtina B2  
Korejština A1

## PRACOVNÍ ZKUŠENOSTI

---

2018–dosud Akademický pracovník na Ústavu inženýrství ochrany  
životního prostředí, Fakulta technologická, UTB ve Zlíně  
2017–2018 Lektor kroužku Věda nás baví

- 06–08/2017 Dvoutměsíční pracovní stáž – Polytechnic Institute of Beja, Portugalsko, téma: Characterization of different kefir product's micro-biotype.
- 09–11/2016 Dvoutměsíční pracovní stáž – Department of Agricultural and Forestry Sciences (DAFNE), Università degli Studi della Tuscia di Viterbo, Itálie  
Téma: PGPR biostimulation for plant adaptation to heavy metal contamination.

## **ÚČAST NA GRANTOVÝCH PROJEKTECH**

---

- 2017–2021 NAZV QK1710156 – Nové přístupy a metody analýzy pro zajištění kvality, bezpečnosti a zdravotní nezávadnosti sýrů, optimalizace jejich výroby a zefektivnění procesů hygieny a sanitace při současném snížení zátěže životního prostředí odpadními vodami.
- 2017–2019 GAČR No. 17-09594S – Redukce obsahu biogenních aminů v modelových systémech.
- 2017 Projekt Interní grantové agentury UTB ve Zlíně, IGA/FT/2017/003 – Možnosti snížení výskytu nežádoucích látek v potravinách a v životním prostředí.
- 2016 Projekt Interní grantové agentury UTB ve Zlíně, IGA/FT/2016/002 – Výzkum procesů ke zlepšení stavu životního prostředí a kvality potravin.
- 2015 Projekt Interní grantové agentury UTB ve Zlíně, IGA/FT/2015/012 – Výzkum procesů ovlivňujících kvalitu potravin a stav životního prostředí.
- 2015 Institucionální program TBU FT22B/2015 – Inovace laboratorních cvičení z potravinářské mikrobiologie.
- 2014 Projekt Interní grantové agentury UTB ve Zlíně, IGA/FT/2014/ 005 – Pokročilé chemické a biochemické metody v ochraně životního prostředí.

## 12. PUBLIKAČNÍ ČINNOST

### PŘÍSPĚVKY V MEZINÁRODNÍCH ČASOPISECH S IMPAKT FAKTOREM EVIDOVANÝCH V DATABÁZI WEB OF SCIENCE

---

**PUREVDORJ, K.**, L. BUŇKOVÁ, A. DLABAJOVÁ, E. ČECHOVÁ, V. PACHLOVÁ a F. BUŇKA. 2021. The impact of cell-free supernatants of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* strains on the tyramine formation of *Lactobacillus* and *Lactiplantibacillus* strains isolated from cheese and beer. *Food Microbiology*, roč. 99, 103813. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2021.103813>. (IF<sub>2019</sub> = 4,155)

LAZÁRKOVÁ, Z., T. ŠOPÍK, J. TALÁR, **K. PUREVDORJ**, R. N. SALEK, L. BUŇKOVÁ, M. ČERNÍKOVÁ, M. NOVOTNÝ, V. PACHLOVÁ, I. NĚMEČKOVÁ a F. BUŇKA. 2021. Quality evaluation of white brined cheese stored in cans as affected by the storage temperature and time. *International Dairy Journal*, přijato k publikaci. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2021.105105>. (IF<sub>2019</sub> = 2,512)

PACHLOVÁ, V., L. BUŇKOVÁ, S. PURKTOVÁ, I. NĚMEČKOVÁ, Š. HAVLÍKOVÁ, **K. PUREVDORJ** a F. BUŇKA. 2018. Contaminating microorganisms in quark type cheese and their capability of biogenic amines production. *International Journal of Dairy Technology*, roč. 71, s. 1018–1022. DOI: <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12524>. (IF<sub>2019</sub> = 1,636)

BUBELOVÁ, Z., F. BUŇKA, M. TAŽÁKOVÁ, K. ŠTAJNOCHOVÁ, **K. PUREVDORJ** a L. BUŇKOVÁ. 2015. Effects of temperature, pH and NaCl content on in vitro putrescine and cadaverine production through the growth of *Serratia marcescens* CCM 303. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, roč. 50, s. 797–808. DOI: [10.1080/03601234.2015.1058097](https://doi.org/10.1080/03601234.2015.1058097). (IF<sub>2019</sub> = 1,697)

### PŘÍSPĚVKY V RECENZOVANÝCH ČASOPISECH EVIDOVANÝCH V DATABÁZI SCOPUS

---

**PUREVDORJ, K.**, K. MARŠÁLKOVÁ, I. BŘEZINOVÁ, A. ŽALKOVÁ, P. PLEVA a L. BUŇKOVÁ. 2017. Antimicrobial effect of selected lactic acid bacteria against microorganisms with decarboxylase activity. *Potravinárstvo Slovak Journal of Food Sciences*, roč. 11, s. 230–235. DOI: <https://doi.org/10.5219/740>.

BUTOR, I., H. PIŠTĚKOVÁ, **K. PUREVDORJ**, P. JANČOVÁ, F. BUŇKA a L. BUŇKOVÁ. 2017. Biogenic amines degradation by microorganisms isolated from cheese. *Potravinárstvo Slovak Journal of Food Sciences*, roč. 11, s. 302–308. DOI: <https://doi.org/10.5219/736>.

MARŠÁLKOVÁ, K., K. PUREVDORJ, P. JANČOVÁ, H. PIŠTĚKOVÁ A L. BUŇKOVÁ. 2017. Quantitative real-time PCR detection of putrescine-producing gram-negative bacteria. *Potravinárstvo Slovak Journal of Food Sciences*, roč. 11, s. 355–362. ISSN 1337-0960. DOI: <https://doi.org/10.5219/739>.

PLEVA, P., L. BUŇKOVÁ, E. THEIMROVÁ, V. BARTOŠÁKOVÁ, F. BUŇKA a K. PUREVDORJ. 2014. Biogenic amines in smear and mould-ripened cheeses. *Potravinárstvo Slovak Journal of Food Sciences*, roč. 8, s. 321–327. DOI: <https://doi.org/10.5219/408>.

## SBORNÍKY Z KONFERENCÍ

---

**PUREVDORJ, K.**, L. BUŇKOVÁ, I. ZICHÁČKOVÁ, E. THEIMROVÁ a F. BUŇKA. *Vliv protektivních kultur a nisinu na dekarboxylázovou aktivitu vybraných bakterií mléčného kvašení*. In: Tomáškovy dny 2016: XXV. konference mladých mikrobiologů. Brno: Masarykova univerzita, 2016. 85 s. ISBN 978-80-210-8255-7.

**PUREVDORJ, K.**, L. BUŇKOVÁ, H. PIŠTĚKOVÁ, E. ČECHOVÁ, J. BLÁHOVÁ, F. BUŇKA A M.T.P. GONÇALVES dos SANTOS. *Decarboxylase activity of microorganisms isolated from kefir*. In: Sborník 28. kongres Československej spoločnosti mikrobiologickej, 18.-21.9.2019, Tatranské Matliare, Slovensko, s. 131. ISBN 978-80-973411-0-7.

BUŇKOVÁ, L., **K. PUREVDORJ**, Š. BENEŠ, L. BERČÍKOVÁ, A. DLABAJOVÁ, P. PLEVA, P A F. BUŇKA. *Potravinářsky významné mikroorganizmy a jejich schopnost degradace biogenních aminů*. In: Sborník 28. kongres Československej spoločnosti mikrobiologickej, 18.-21.9.2019, Tatranské Matliare, Slovensko, s. 93. ISBN 978-80-973411-0-7.



## 13. PŘÍLOHA I

Tab. I – Antimikrobiální aktivita supernatantů z testovaných kmenů *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* (CCDM) na dekarboxyláza-pozitivní kmeny bakterií mléčného kvašení [(-) žádná inhibice; (+) 7,5–11 mm inhibiční zóna; (++) 12–14 mm inhibiční zóna; (+++) 15–18 mm inhibiční zóna].

Kmeny BMK	Inhibiční účinek supernatantů kmenů <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i>											
	CCDM	CCDM	CCDM	CCDM	CCDM	CCDM	CCDM	CCDM	CCDM	CCDM	CCDM	CCDM
	71	414	416	418	671	702	731	670	686	689	695	698
<i>Levilactobacillus brevis</i> T24	+	–	–	–	+	+	+	+	++	++	+	++
<i>L. brevis</i> B125	+	–	–	–	+	++	+	+	+	++	+	+
<i>L. brevis</i> RIBM 16	+	–	–	–	+	+	++	+	++	++	+	++
<i>L. brevis</i> RIBM 20	+	–	–	–	+	+	++	++	++	++	+	++
<i>L. brevis</i> RIBM 33	++	–	–	–	++	++	++	++	+++	+++	+	++
<i>L. brevis</i> RIBM 50	++	–	–	–	++	++	++	++	+++	+++	++	++
<i>L. brevis</i> RIBM 62	++	–	–	–	++	++	++	++	+++	+++	++	++
<i>L. brevis</i> RIBM 67	++	–	–	–	++	++	++	++	+++	+++	++	++
<i>L. brevis</i> RIBM 68	++	–	–	–	++	++	++	++	+++	+++	++	++
<i>L. brevis</i> RIBM 69	+	–	–	–	++	++	++	++	+++	+++	++	++
<i>L. brevis</i> RIBM 70	++	–	–	–	++	++	++	++	+++	+++	++	++
<i>L. brevis</i> RIBM 72	++	–	–	–	++	++	++	++	+++	+++	++	++
<i>L. brevis</i> RIBM 78	++	–	–	–	++	++	++	+	+++	+++	++	++
<i>L. brevis</i> RIBM 93	++	–	–	–	++	++	++	++	+++	+++	++	++
<i>L. brevis</i> RIBM 98	++	–	–	–	++	++	++	++	+++	+++	++	+
<i>L. brevis</i> RIBM 101	++	–	–	–	++	++	++	+	+++	+++	+	+
<i>L. brevis</i> RIBM 111	++	–	–	–	++	++	++	+	++	+++	+	++

Tab. I – Pokračování

Kmeny BMK	Inhibiční účinek supernatantů kmenů <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i>											
	CCD	CCD	CCD	CCD	CCD	CCD	CCD	CCD	CCD	CCD	CCD	CCDM
	M 71	M 414	M 416	M 418	M 671	M 702	M 731	M 670	M 686	M 689	M 695	698
<i>Latilactobacillus curvatus</i> T2	++	–	–	–	+	++	++	++	+++	+++	++	++
<i>Lat. curvatus</i> T3	+++	–	–	–	++	++	+++	+++	+++	+++	++	+++
<i>Lat. curvatus</i> T8	++	–	–	–	+	++	++	++	++	++	++	++
<i>Lat. curvatus</i> T15	++	–	–	–	+	++	++	++	++	++	++	++
<i>Lat. curvatus</i> T36	++	–	–	–	+	++	+	++	+++	+++	++	++
<i>Lat. curvatus</i> T37	+	–	–	–	+	+	+	+	++	++	+	+
<i>Lat. curvatus</i> T41	+	–	–	–	+	+	+	+	++	++	+	++
<i>Lat. curvatus</i> AI-3	+	–	–	–	+	+	+	+	++	++	+	++
<i>Lacticaseibacillus casei/paracasei</i> AIV-11	++	–	–	–	+	+	+	++	++	++	+	++
<i>Lc. casei/ paracasei</i> AIV-13	++	–	–	–	+	+	+	++	++	++	+	++
<i>Lc. casei/ paracasei</i> RIBM 113	++	–	–	–	++	++	++	+	+++	+++	+	++
<i>Lc. paracasei</i> T50	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>Lc. paracasei</i> T51	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>Lc. paracasei</i> T52	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>Latilactobacillus sakei</i> B103	+	–	–	–	+	+	++	+	+	++	+	+

Tab. I – Pokračování

Kmeny BMK	Inhibiční účinek supernatantů kmenů <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i>											
	CCDM	CCDM	CCDM	CCDM	CCDM	CCDM	CCDM	CCDM	CCDM	CCDM	CCDM	CCDM
	71	414	416	418	671	702	731	670	686	689	695	698
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> AI-7	+	–	–	–	+	+	+	+	++	++	+	++
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> RIBM 89	+++	–	–	–	++	++	++	++	+++	+++	++	++
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> RIBM 94	+	–	–	–	+	+	+	–	+	+	–	+
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> RIBM 96	++	–	–	–	++	++	++	++	+++	+++	++	++
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> B170	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> B171	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i> T63	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>Streptococcus salivarius</i> B149	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>Streptococcus salivarius</i> B150	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–

Tab. II – Antimikrobiální aktivita supernatantů z testovaných kmenů *Lactobacillus* a *Enterococcus* (CCDM 945) na dekarboxyláza-pozitivní kmeny bakterií mléčného kvašení [(-) žádná inhibice; (+) 7,5–11 mm inhibiční zóna; (++) 12–14 mm inhibiční zóna; (+++) 15–18 mm inhibiční zóna].

Kmeny BMK	Inhibiční účinek supernatantů kmenů <i>Lactobacillus</i> a <i>Enterococcus</i>									
	CCDM 79	CCDM 149	CCDM 214	CCDM 215	CCDM 340	CCDM 377	CCDM 62	CCDM 82	CCDM 125	CCDM 945
<i>Levilactobacillus brevis</i> T24	–	–	–	–	–	+	–	–	++	++
<i>L. brevis</i> B125	–	–	–	–	–	+	–	–	–	–
<i>L. brevis</i> RIBM 16	–	–	–	–	–	+	–	–	–	+
<i>L. brevis</i> RIBM 20	–	–	–	–	–	+	–	–	–	+
<i>L. brevis</i> RIBM 33	–	–	–	–	–	+	–	–	–	+
<i>L. brevis</i> RIBM 50	–	–	–	–	–	+	–	–	–	++
<i>L. brevis</i> RIBM 62	–	–	–	–	–	+	–	–	–	++
<i>L. brevis</i> RIBM 67	–	–	–	–	–	+	–	–	–	++
<i>L. brevis</i> RIBM 68	–	–	–	–	–	+	–	–	–	+
<i>L. brevis</i> RIBM 69	–	–	–	–	–	+	–	–	–	++
<i>L. brevis</i> RIBM 70	–	–	–	–	–	+	–	–	–	++
<i>L. brevis</i> RIBM 72	–	–	–	–	–	+	–	–	–	++
<i>L. brevis</i> RIBM 78	–	–	–	–	–	+	–	–	–	++
<i>L. brevis</i> RIBM 93	–	–	–	–	–	+	–	–	–	++
<i>L. brevis</i> RIBM 98	–	–	–	–	–	+	–	–	–	+
<i>L. brevis</i> RIBM 101	–	–	–	–	–	+	–	–	–	++
<i>L. brevis</i> RIBM 111	–	–	–	–	–	++	–	–	–	+

Tab. II – Pokračování

Kmeny BMK	Inhibiční účinek supernatantů kmenů <i>Lactobacillus a Enterococcus</i>									
	CCDM 79	CCDM 149	CCDM 214	CCDM 215	CCDM 340	CCDM 377	CCDM 62	CCDM 82	CCDM 125	CCDM 945
<i>Latilactobacillus curvatus</i> T2	–	–	–	–	–	+	–	–	+	+
<i>Lat. curvatus</i> T3	–	–	–	–	–	+	–	–	+	++
<i>Lat. curvatus</i> T8	–	–	–	–	–	+	–	–	–	++
<i>Lat. curvatus</i> T15	–	–	–	–	–	+	–	–	++	+
<i>Lat. curvatus</i> T36	–	–	–	–	–	+	–	–	++	++
<i>Lat. curvatus</i> T37	–	–	–	–	–	+	–	–	+	++
<i>Lat. curvatus</i> T41	–	–	–	–	–	+	–	–	–	++
<i>Lat. curvatus</i> AI-3	–	–	–	–	–	+	–	–	–	+
<i>Lacticaseibacillus casei/paracasei</i> AIV-11	–	–	–	–	–	+	–	–	–	+
<i>Lc. casei/paracasei</i> AIV-13	–	–	–	–	–	+	–	–	–	+
<i>Lc. casei/paracasei</i> RIBM 113	–	–	–	–	–	+	–	–	–	++
<i>Lc. paracasei</i> T50	–	–	–	–	–	–	–	–	+	+
<i>Lc. paracasei</i> T51	–	–	–	–	–	–	–	–	–	+
<i>Lc. paracasei</i> T52	–	–	–	–	–	–	–	–	–	+

Tab. II – Pokračování

Ostatní kmeny BMK	Inhibiční účinek supernatantů kmenů <i>Lactobacillus</i> a <i>Enterococcus</i>									
	CCDM 79	CCDM 149	CCDM 214	CCDM 215	CCDM 340	CCDM 377	CCDM 62	CCDM 82	CCDM 125	CCDM 945
<i>Lactilactobacillus sakei</i> B103	–	–	–	–	–	+	–	–	–	++
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> AI-7	–	–	–	–	–	+	–	–	–	+
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> RIBM 89	–	–	–	–	–	+	–	–	–	++
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> RIBM 94	–	–	–	–	–	+	–	–	–	+
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> RIBM 96	–	–	–	–	–	+	–	–	–	++
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> B170	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> B171	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>Leuconostoc</i> <i>pseudomesenteroides</i> T63	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>Streptococcus salivarius</i> B149	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>Streptococcus salivarius</i> B150	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–

Tab. III – Antimikrobiální aktivita supernatantů z testovaných kmenů *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* (CCDM) na dekarboxyláza-pozitivní kmeny rodu *Enterococcus* [(-) žádná inhibice; (+) 7,5–11 mm inhibiční zóna; (++) 12–14 mm inhibiční zóna; (+++) 15–18 mm inhibiční zóna].

Kmeny rodu <i>Enterococcus</i>	Inhibiční účinek supernatantů kmenů <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i>											
	CCDM	CCDM	CCDM	CCDM	CCDM	CCDM	CCDM	CCDM	CCDM	CCDM	CCDM	CCDM
	71	414	416	418	671	702	731	670	686	689	695	698
<i>Enter.</i> sp. T19	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>Enter.</i> sp. T20	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>Enter.</i> sp. E15	+	–	–	–	–	–	++	++	++	++	+	+
<i>Enter.</i> sp. E16	+	–	–	–	–	–	++	++	++	++	+	+
<i>Enter.</i> sp. E18	++	–	–	–	–	–	++	+	++	+	+	+
<i>Enter.</i> sp. E21	++	–	–	–	–	–	++	+	++	++	+	+
<i>Enter.</i> sp. E26	+	–	–	–	–	–	–	+	+	+	+	–
<i>Enter.</i> sp. E28	–	–	–	–	–	–	++	++	++	++	++	+
<i>Enter.</i> sp. E30	+	–	–	–	–	–	+	–	–	–	+	–
<i>E. durans</i> B151	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>E. durans</i> B152	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>E. durans</i> B153	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>E. durans</i> B154	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>E. durans</i> B160	–	–	–	–	–	–	+	+	+	–	+	+
<i>E. durans</i> B169	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–

Tab. III – Pokračování

Kmeny rodu <i>Enterococcus</i>	Inhibiční účinek supernatantů kmenů <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i>											
	CCDM	CCDM	CCDM	CCDM	CCDM	CCDM	CCDM	CCDM	CCDM	CCDM	CCDM	CCDM
	71	414	416	418	671	702	731	670	686	689	695	698
<i>E. faecalis</i> T43	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>E. faecalis</i> B131	+	–	–	–	–	–	+	+	+	+	+	–
<i>E. faecalis</i> B142	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>E. faecium</i> B129	+	–	–	–	–	–	+	+	+	–	–	–
<i>E. faecium</i> B133	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>E. faecium</i> B143	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>E. faecium</i> B144	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>E. faecium</i> B145	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>E. faecium</i> E2	+	–	–	–	–	–	++	+	+	+	+	+
<i>E. faecium</i> E5	++	–	–	–	–	–	++	++	++	++	++	++
<i>E. faecium</i> E8	++	–	–	–	–	–	+	+	+	+	++	+
<i>E. faecium</i> E11	++	–	–	–	–	–	+	+	+	+	+	+
<i>E. faecium</i> E13	+	–	–	–	–	–	+	+	+	+	+	–
<i>E. faecium</i> E14	++	–	–	–	–	–	++	++	+	++	+	++
<i>E. faecium</i> E17	–	–	–	–	–	–	–	–	–	+	+	–
<i>E. faecium</i> E25	++	–	–	–	–	–	++	+	++	+	+	+
<i>E. faecium</i> E27	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>E. hirae</i> B76	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>E. hirae</i> B122	++	–	–	–	–	–	+	+	+	+	+	+
<i>E. hirae</i> B124	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>E. hirae</i> B147	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–



Tab. IV – Antimikrobiální aktivita supernatantů z testovaných kmenů *Lactobacillus* a *Enterococcus* (CCDM 945) na dekarboxyláza-pozitivní kmeny rodu *Enterococcus* [(-) žádná inhibice; (+) 7,5–11 mm inhibiční zóna; (++) 12–14 mm inhibiční zóna; (+++) 15–18 mm inhibiční zóna].

Kmeny rodu <i>Enterococcus</i>	Inhibiční účinek supernatantů kmenů <i>Lactobacillus</i> a <i>Enterococcus</i>									
	CCDM 79	CCDM 149	CCDM 214	CCDM 215	CCDM 340	CCDM 377	CCDM 62	CCDM 82	CCDM 125	CCDM 945
<i>Enterococcus</i> sp. T19	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>Enterococcus</i> sp. T20	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>Enterococcus</i> sp. E15	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>Enterococcus</i> sp. E16	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>Enterococcus</i> sp. E18	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>Enterococcus</i> sp. E21	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>Enterococcus</i> sp. E26	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>Enterococcus</i> sp. E28	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>Enterococcus</i> sp. E30	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>E. durans</i> B151	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>E. durans</i> B152	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>E. durans</i> B153	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>E. durans</i> B154	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>E. durans</i> B160	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>E. durans</i> B169	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–

Tab. IV – Pokračování

Kmeny rodu <i>Enterococcus</i>	Inhibiční účinek supernatantů kmenů <i>Lactobacillus a Enterococcus</i>									
	CCDM 79	CCDM 149	CCDM 214	CCDM 215	CCDM 340	CCDM 377	CCDM 62	CCDM 82	CCDM 125	CCDM 945
<i>E. faecalis</i> T43	–	–	–	–	–	+	–	–	–	–
<i>E. faecalis</i> B131	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>E. faecalis</i> B142	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>E. faecium</i> B129	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>E. faecium</i> B133	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>E. faecium</i> B143	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>E. faecium</i> B144	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>E. faecium</i> B145	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>E. faecium</i> E2	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>E. faecium</i> E5	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>E. faecium</i> E8	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>E. faecium</i> E11	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>E. faecium</i> E13	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>E. faecium</i> E14	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>E. faecium</i> E17	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>E. faecium</i> E25	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>E. faecium</i> E27	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>E. hirae</i> B76	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>E. hirae</i> B122	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>E. hirae</i> B124	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>E. hirae</i> B147	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–

Tab. V – Antimikrobiální aktivita supernatantů z testovaných kmenů *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* (CCDM) na dekarboxyláza-pozitivní kmeny rodu *Staphylococcus* [(-) žádná inhibice; (+) 7,5–11 mm inhibiční zóna; (++) 12–14 mm inhibiční zóna; (+++) 15–18 mm inhibiční zóna].

Kmeny rodu <i>Staphylococcus</i>	Inhibiční účinek supernatantů kmenů <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i>											
	CCDM 71	CCDM 414	CCDM 416	CCDM 418	CCDM 671	CCDM 702	CCDM 731	CCDM 670	CCDM 686	CCDM 689	CCDM 695	CCDM 698
<i>S. epidermidis</i> B40	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>S. epidermidis</i> B136	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>S. epidermidis</i> B137	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>S. epidermidis</i> S8	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>S. haemolyticus</i> S9	–	+	–	+	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>S. haemolyticus</i> S10	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>S. haemolyticus</i> S11	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>S. haemolyticus</i> S12	–	+	–	+	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>S. hominis</i> B138	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>S. hominis</i> S5	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>S. hominis</i> S6	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>S. hominis</i> S7	–	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>S. pasteurii</i> S4	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>S. pasteurii</i> S14	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–

Tab. V – Pokračování

Kmeny rodu <i>Staphylococcus</i>	Inhibiční účinek supernatantů kmenů <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i>											
	CCDM	CCDM	CCDM	CCDM	CCDM	CCDM	CCDM	CCDM	CCDM	CCDM	CCDM	CCDM
	71	414	416	418	671	702	731	670	686	689	695	698
<i>S. succinus</i> B47	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>S. succinus</i> B77	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>S. succinus</i> B80	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>S. succinus</i> B89	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>S. warneri</i> B29	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>S. warneri</i> S1	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>S. warneri</i> S2	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>S. warneri</i> S3	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>S. warneri</i> S13	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>S. warneri</i> S15	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>S. warneri</i> S16	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>S. warneri</i> S17	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–

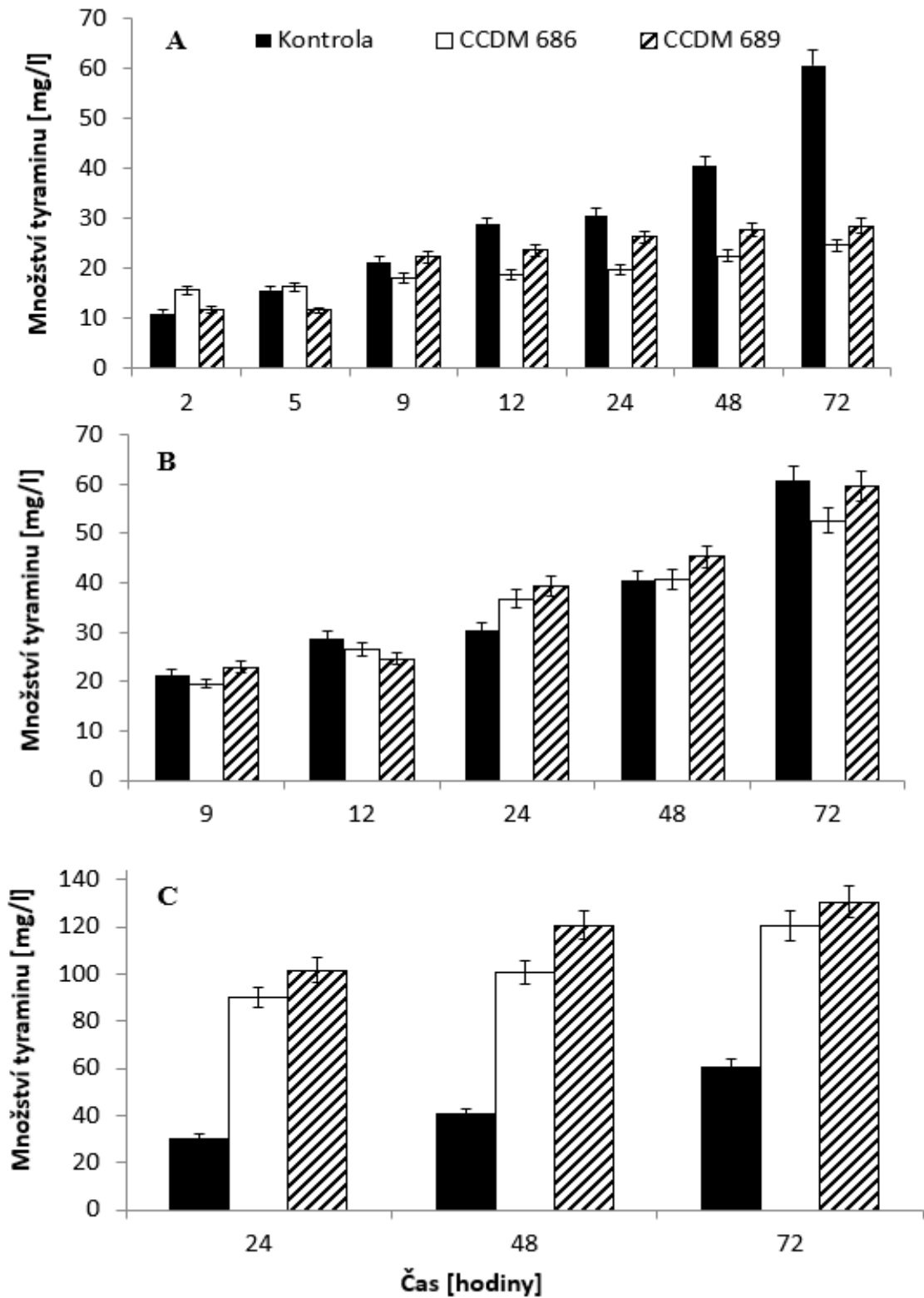
Tab. VI – Antimikrobiální aktivita supernatantů z testovaných kmenů *Lactobacillus* a *Enterococcus* (CCDM 945) na dekarboxyláza-pozitivní kmeny rodu *Staphylococcus* [(-) žádná inhibice; (+) 7,5–11 mm inhibiční zóna; (++) 12–14 mm inhibiční zóna; (+++) 15–18 mm inhibiční zóna].

Kmeny rodu <i>Staphylococcus</i>	Inhibiční účinek supernatantů kmenů <i>Lactobacillus</i> a <i>Enterococcus</i>									
	CCDM 79	CCDM 149	CCDM 214	CCDM 215	CCDM 340	CCDM 377	CCDM 62	CCDM 82	CCDM 125	CCDM 945
<i>S. epidermidis</i> B40	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>S. epidermidis</i> B136	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>S. epidermidis</i> B137	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>S. epidermidis</i> S8	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>S. haemolyticus</i> S9	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>S. haemolyticus</i> S10	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>S. haemolyticus</i> S11	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>S. haemolyticus</i> S12	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>S. hominis</i> B138	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>S. hominis</i> S5	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>S. hominis</i> S6	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>S. hominis</i> S7	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>S. pasteurii</i> S4	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>S. pasteurii</i> S14	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–

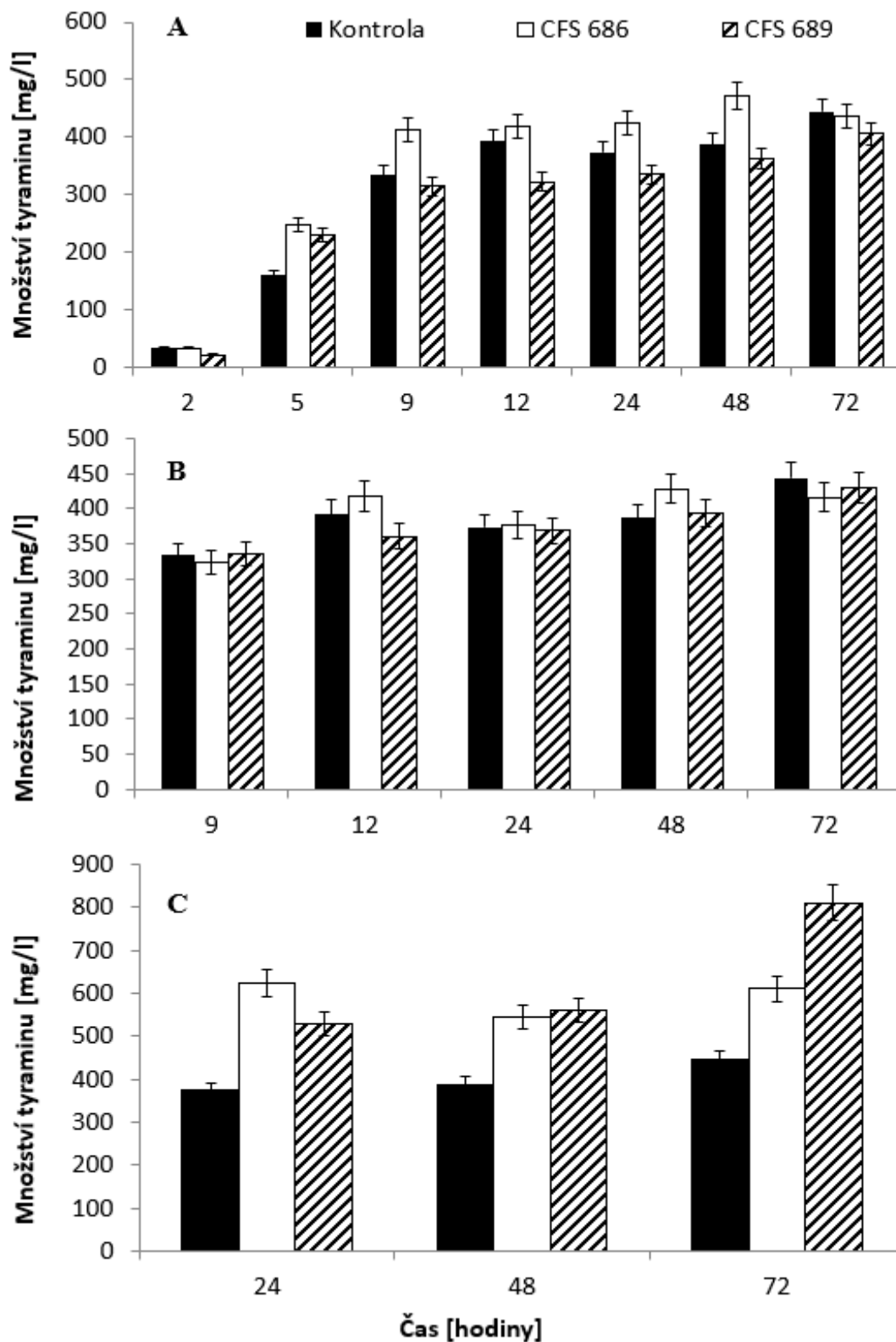
Tab. VI – Pokračování

Kmeny rodu <i>Staphylococcus</i>	Inhibiční účinek supernatantů kmenů <i>Lactobacillus a Enterococcus</i>									
	CCDM 79	CCDM 149	CCDM 214	CCDM 215	CCDM 340	CCDM 377	CCDM 62	CCDM 82	CCDM 125	CCDM 945
<i>S. succinus</i> B47	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>S. succinus</i> B77	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>S. succinus</i> B80	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>S. succinus</i> B89	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>S. warneri</i> B29	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>S. warneri</i> S1	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>S. warneri</i> S2	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>S. warneri</i> S3	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>S. warneri</i> S13	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>S. warneri</i> S15	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>S. warneri</i> S16	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>S. warneri</i> S17	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–

## 14. PŘÍLOHA II

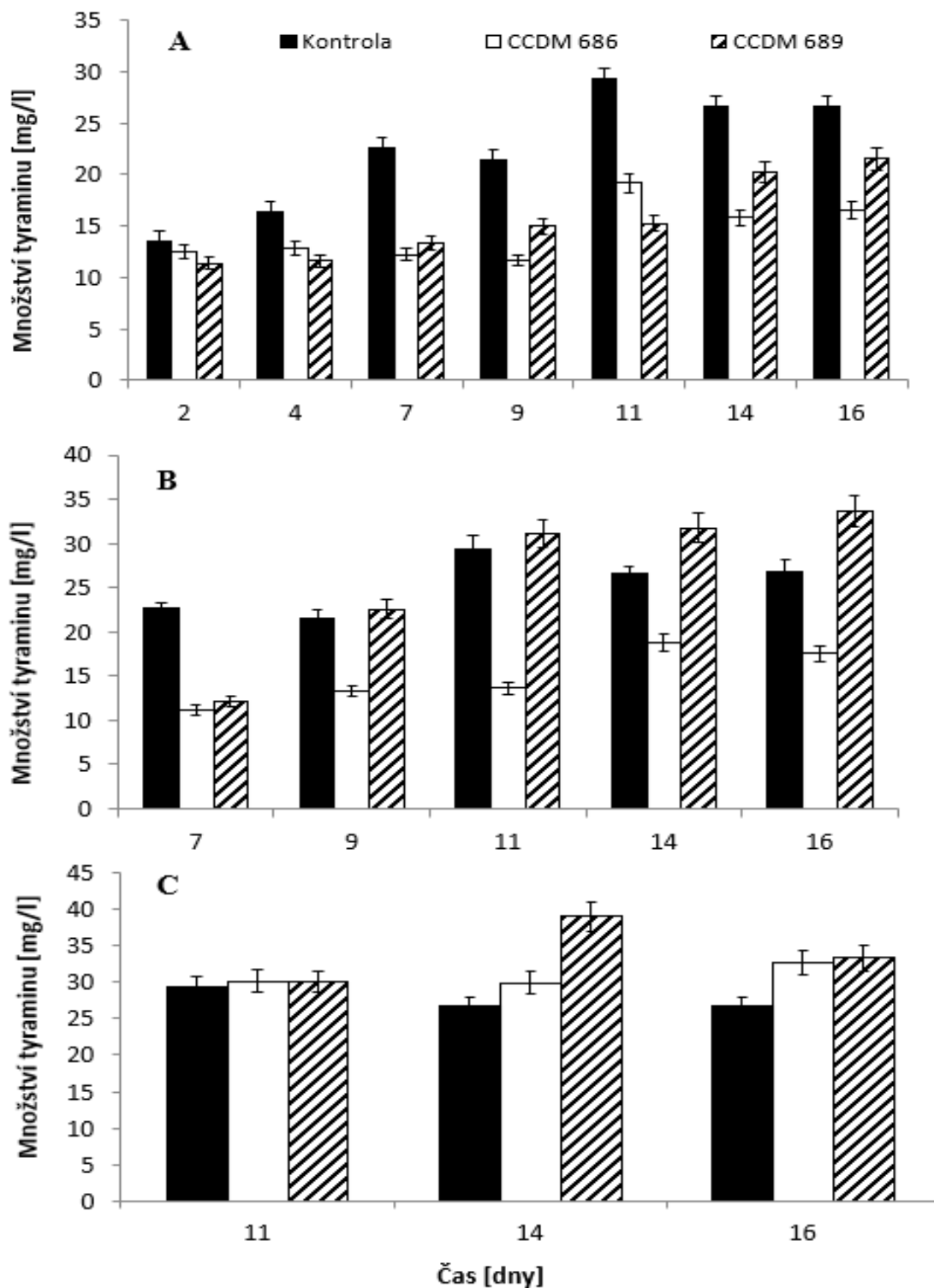


Obr. 1: Vývoj produkce tyraminu kmenem *Lactiplantibacillus plantarum* RIBM 89 v přítomnosti *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* CCDM 686 a CCDM 689 při teplotě 30 °C (A: čas inokulace 2 h, B: čas inokulace 9 h, C: čas inokulace 24 h).

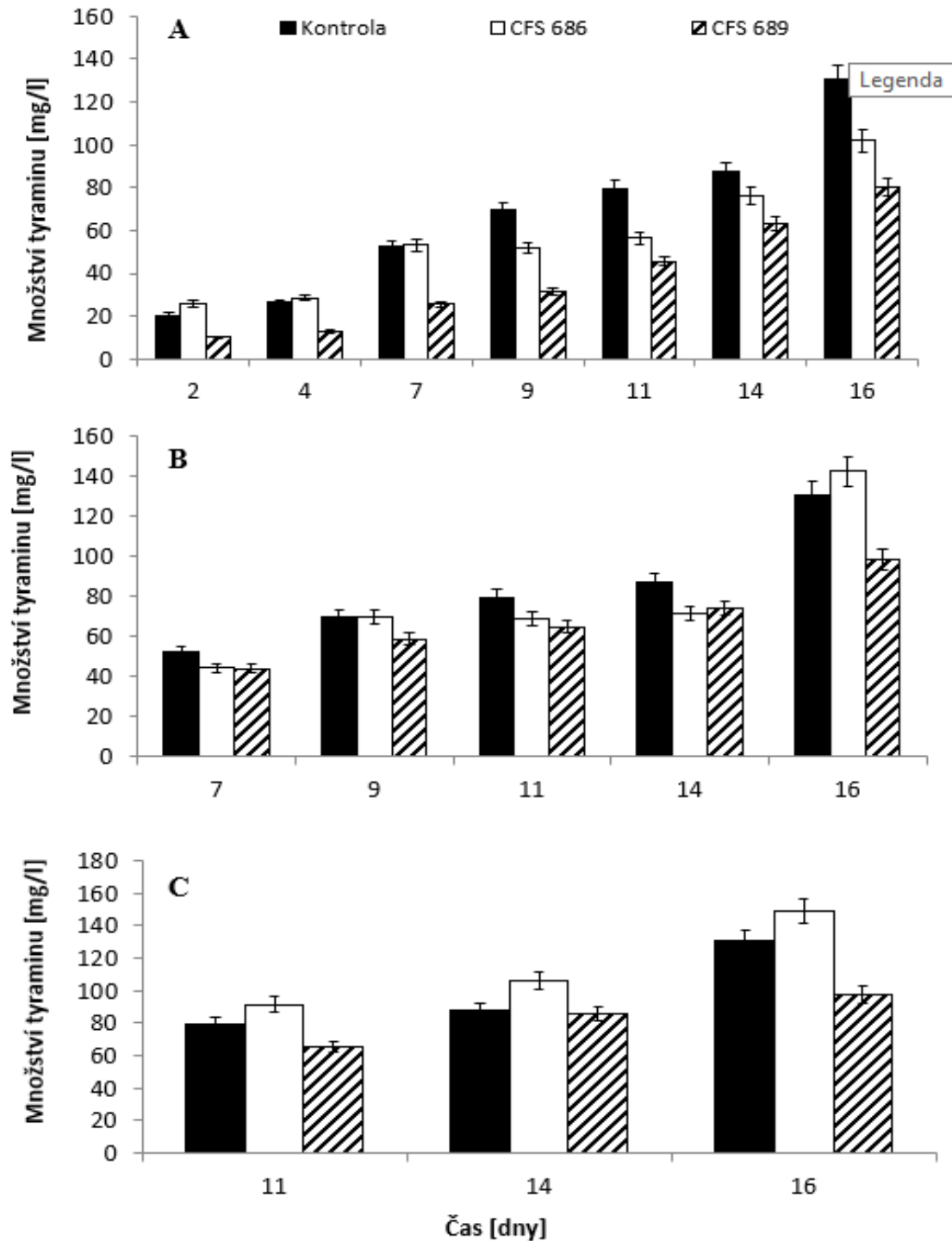


Obr. 2: Vývoj produkce tyraminu kmenem *Lactiplantibacillus plantarum* RIBM 89 po přidavku supernatantu z kmene *Lc. lactis* ssp. *lactis* CCDM 686 (CFS 686) a supernatantu z kmene *Lc. lactis* ssp. *lactis* CCDM 689 (CFS 689) při teplotě 30 °C (A: čas inokulace 2 h, B: čas inokulace 9 h, C: čas inokulace 24 h).

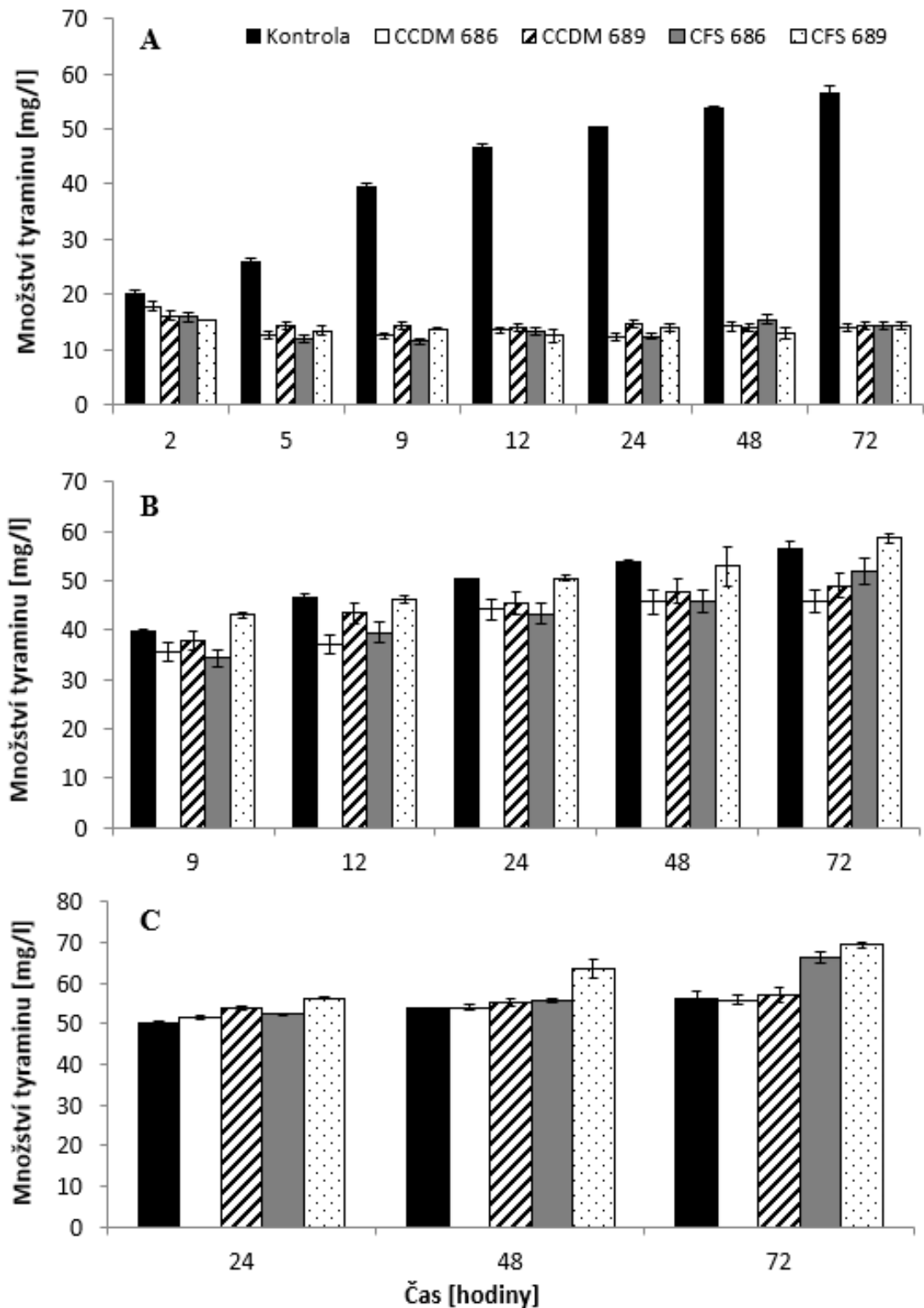




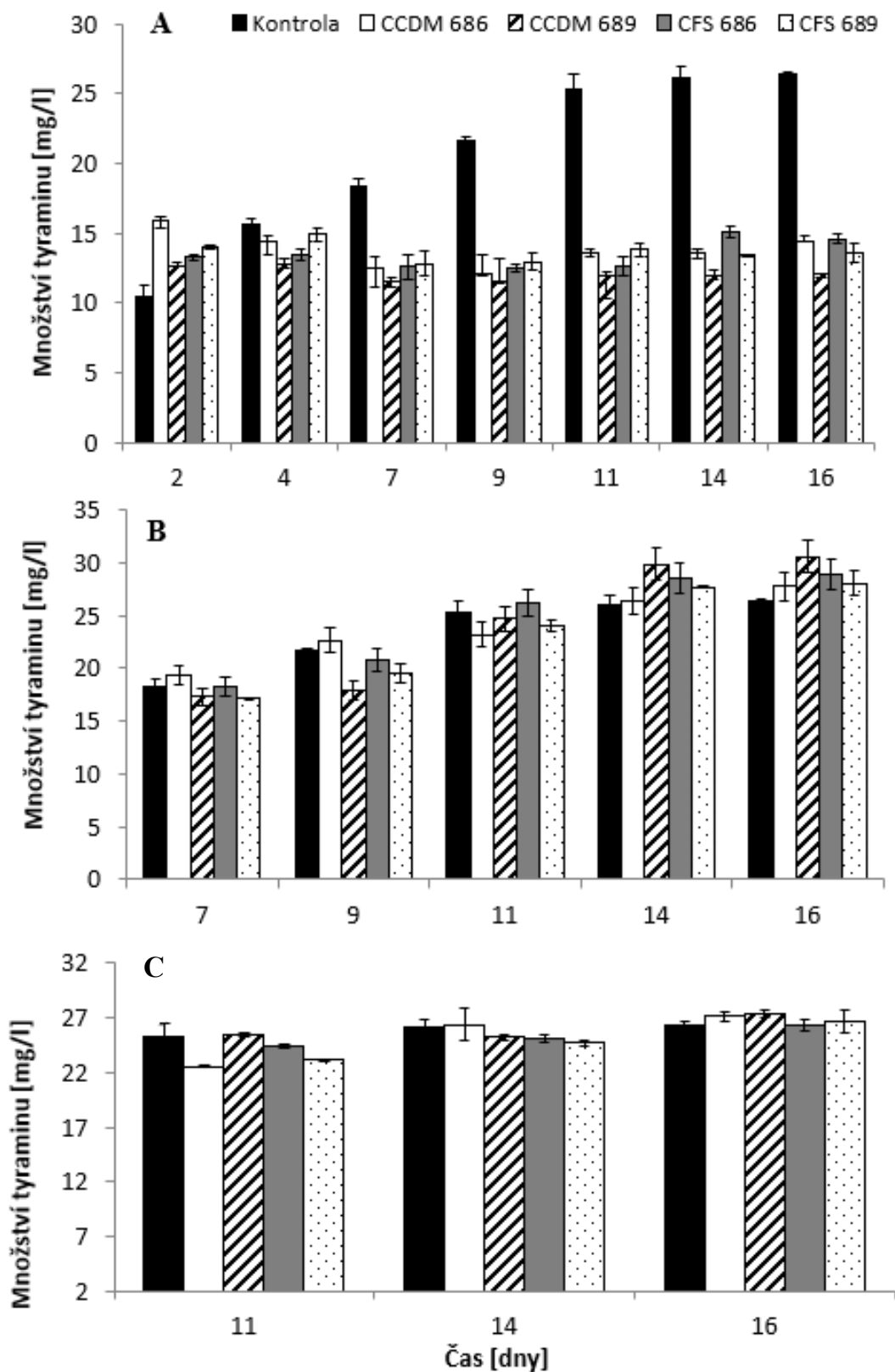
Obr. 3: Vývoj produkce tyraminu kmenem *Lactiplantibacillus plantarum* RIBM 89 v přítomnosti *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* CCDM 686 a CCDM 689 při teplotě 12 °C (A: čas inokulace 2. den, B: čas inokulace 7. den, C: čas inokulace 11. den).



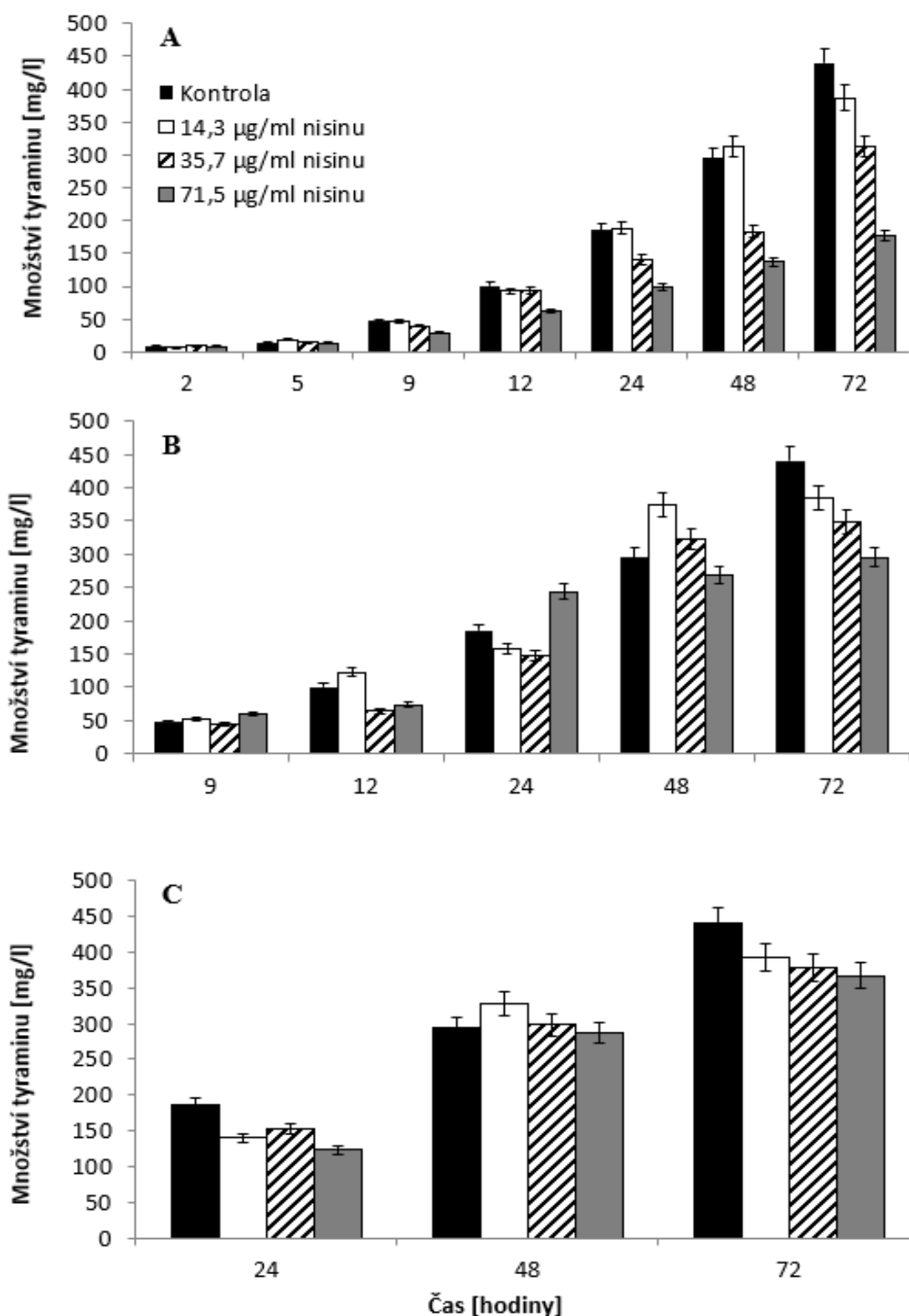
Obr. 4: Vývoj produkce tyraminu kmenem *Lactiplantibacillus plantarum* RIBM 89 po přidavku supernatantu z kmene *Lc. lactis* ssp. *lactis* CCDM 686 (CFS 686) a supernatantu z kmene *Lc. lactis* ssp. *lactis* CCDM 689 (CFS 689) při teplotě 12 °C (A: čas inokulace 2. den, B: čas inokulace 7. den, C: čas inokulace 11. den).



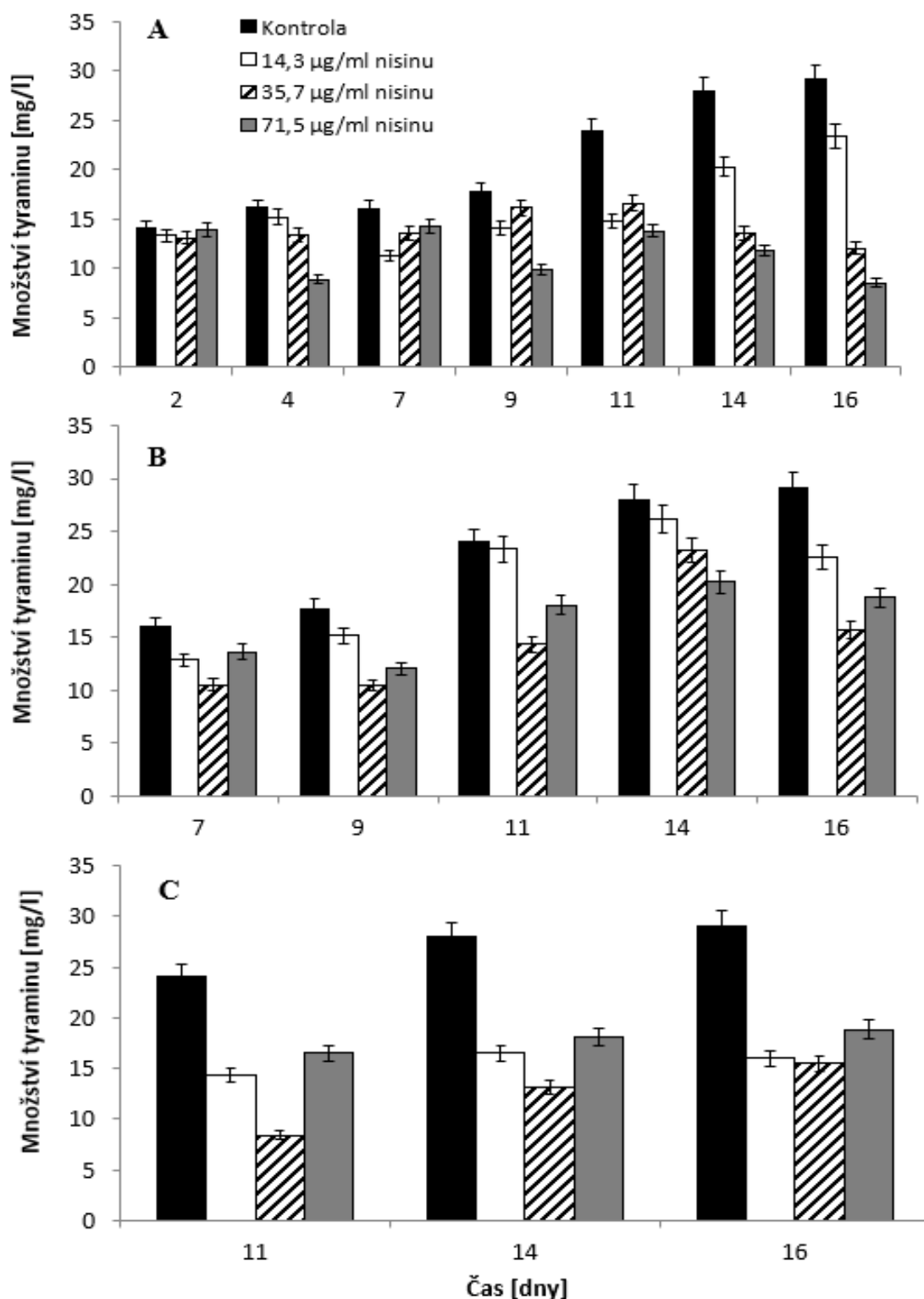
Obr. 5: Vývoj produkce tyraminu kmenem *Lactilactobacillus curvatus* T3 v přítomnosti *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* CCDM 686 a CCDM 689 a jejich supernatantů (CFS 686 a CFS 689) při teplotě 30 °C (A: čas inokulace 2 h, B: čas inokulace 9 h, C: čas inokulace 24 h).



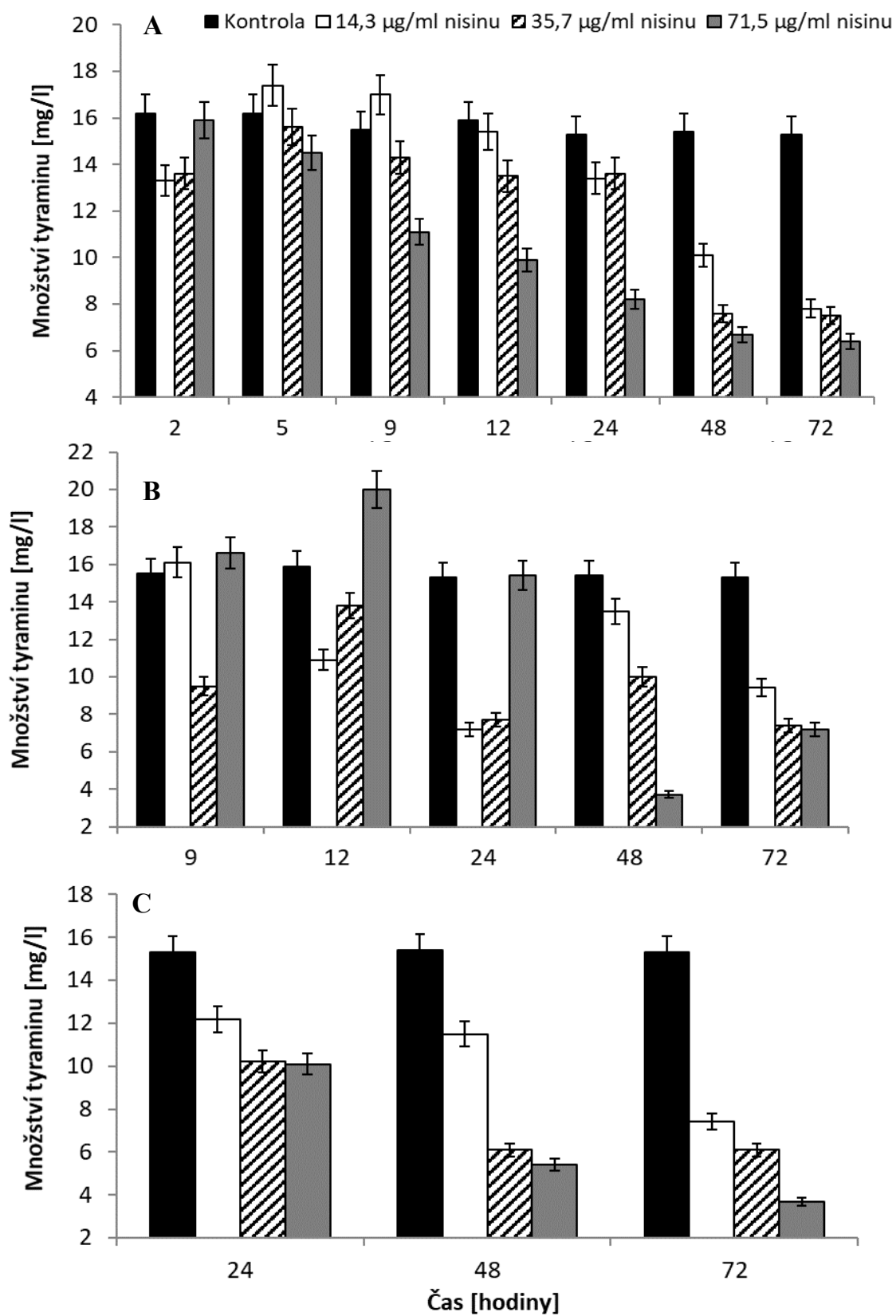
Obr. 6: Vývoj produkce tyraminu kmenem *Lactilactobacillus curvatus* T3 v přítomnosti *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* CCDM 686 a CCDM 689 a jejich supernatantů (CFS 686 a CFS 689) při teplotě 12 °C (A: čas inokulace 2. den, B: čas inokulace 7. den, C: čas inokulace 11. den).



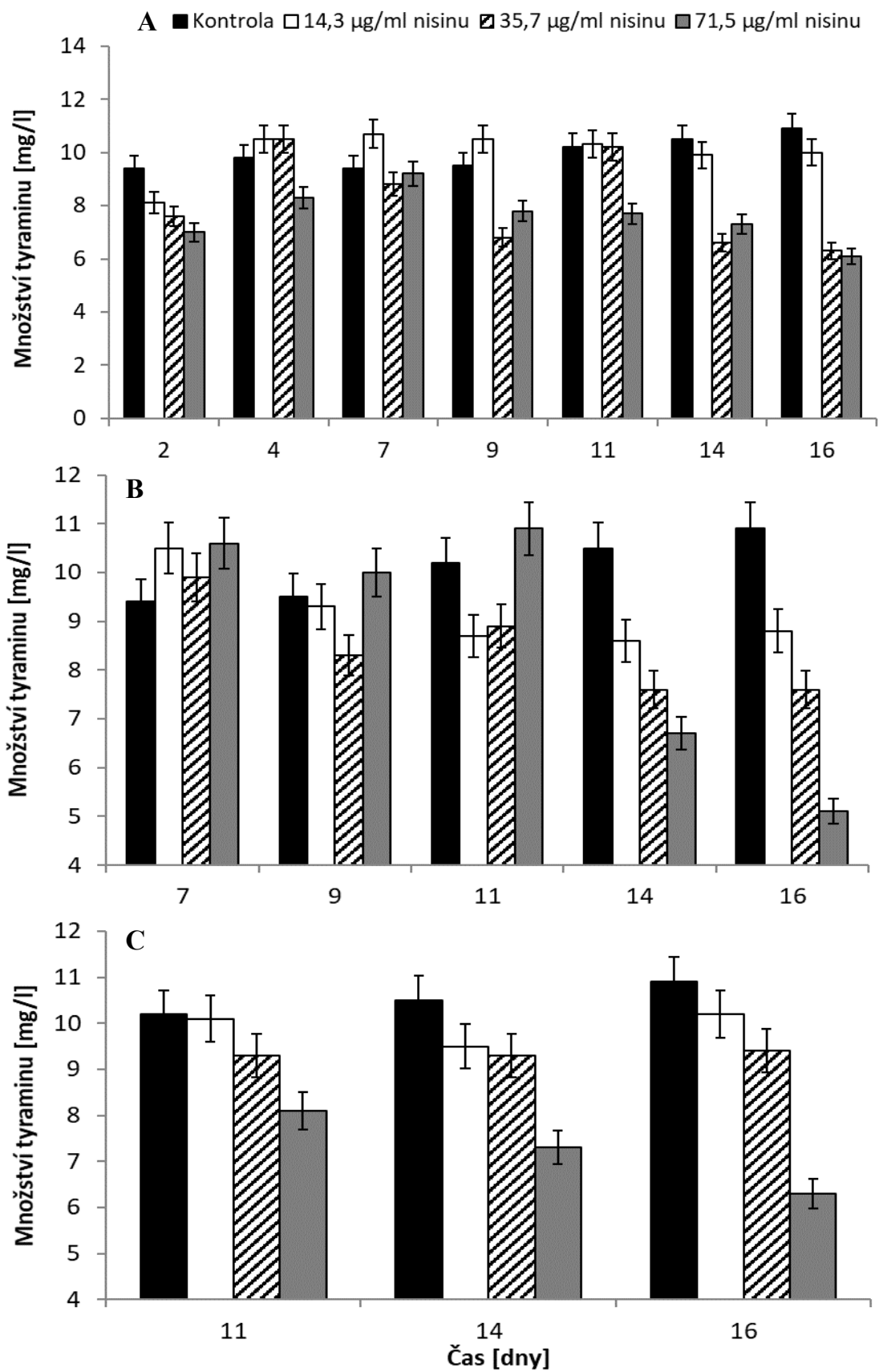
Obr. 7: Vliv nisinu na produkci tyraminu kmenem *Lactiplantibacillus plantarum* RIBM 89 při teplotě 30 °C (A: čas inokulace 2 h, B: čas inokulace 9 h, C: čas inokulace 24 h).



Obr. 8: Vliv nisinu na produkci tyraminu kmenem *Lactiplantibacillus plantarum* RIBM 89 při teplotě 12 °C (A: čas inokulace 2. den, B: čas inokulace 7. den, C: čas inokulace 11. den).



Obr. 9: Vliv nisinu na produkci tyraminu kmenem *Lactobacillus curvatus* T3 při teplotě 30 °C (A: čas inokulace 2 h, B: čas inokulace 9 h, C: čas inokulace 24 h).



Obr. 10: Vliv nisinu na produkci tyraminu kmenem *Lactobacillus curvatus* T3 při teplotě 12 °C (A: čas inokulace 2. den, B: čas inokulace 7. den, C: čas inokulace 11. den).