

Možnosti redukce biogenních aminů produkovaných mikroorganismy

Ing. Khatantuul Purevdorj, Ph.D.

Teze disertační práce



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Teze disertační práce

Možnosti redukce biogenních aminů produkovaných mikroorganismy

Strategies to reduce biogenic amines produced by microorganisms

Autor: **Ing. Khatantuul Purevdorj, Ph.D.**

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

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

Oponenti: doc. Ing. Marcela Pejchalová, Ph.D.
prof. Ing. Stanislav Kráčmar, DrSc.

Zlín, srpen 2021

© Khatantuul Purevdorj

Vydala **Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně** v edici **Doctoral Thesis Summary**.
Publikace byla vydána v roce 2021.

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.

ISBN 978-80-7678-016-3

„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 sepsání této práce. Dále děkuji Ing. Veronice Kučabové, Lence Machálkové, Ing. Olze Vlčkové, Ing. Zuzce Svobodové a Ing. et Ing. Ludmile Zálešákové 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 ± 1 °C a 12 ± 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 kmene (*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 kmene 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 kmene. 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 vysokého množství tyraminu ve fermentovaných potravinách, jako jsou sýry a pivo, lze využít nisin-produkující kmene a jejich metabolity (CFS a nisin), a tím zvýšit kvalitu a bezpečnost těchto fermentovaných potravin. Nicméně je třeba provést další výzkum za účelem vyšetření těchto protektivních kmenů a jejich antagonistických látek v realné 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 ± 1 °C and 12 ± 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, such as cheese or beer, 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

ABSTRAKT	4
ABSTRACT.....	5
OBSAH	6
1. SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	8
1.1 BIOGENNÍ AMINY A JEJICH VZNIK V POTRAVINÁCH	8
1.2 TOXICITA BA.....	9
1.2.1 <i>Toxicita histaminu</i>	<i>9</i>
1.2.2 <i>Toxicita tyraminu a dalších stopových BA.....</i>	<i>10</i>
1.3 MOŽNOSTI SNÍŽENÍ BIOGENNÍCH AMINŮ	10
1.3.1 <i>Snížování BA za použití ionizujícího záření</i>	<i>10</i>
1.3.2 <i>Mikroorganismy schopné degradace BA</i>	<i>11</i>
1.3.3 <i>Využití protektivní kultur a jejich antimikrobiálních látek ke snížení tvorby BA</i>	<i>11</i>
1.3.4 <i>Využití rostlinných antimikrobiálních látek ke snížení BA.....</i>	<i>12</i>
2. CÍLE PRÁCE.....	13
3. MATERIÁL A METODIKA.....	14
3.1 POUŽITÉ MIKROORGANIZMY	14
3.2 METODIKA EXPERIMENTŮ I A II.....	15
3.2.1 <i>Příprava supernatantů protektivních kultur (CFS).....</i>	<i>15</i>
3.2.2 <i>Příprava zásobního roztoku nisinu</i>	<i>15</i>
3.2.3 <i>Jamková difúzní metoda.....</i>	<i>15</i>
3.3 METODIKA EXPERIMENTU III A IV	16
3.4 STANOVENÍ MNOŽSTVÍ TYRAMINU V EXPERIMENTECH III – IV POMOCÍ HPLC/UV	17
3.5 STANOVENÍ POČTU MIKROORGANISMŮ V EXPERIMENTECH III – IV.....	17
3.6 STATISTICKÉ HODNOCENÍ ZÍSKANÝCH DAT	17
4. HLAVNÍ VÝSLEDKY PRÁCE	18
4.1 VÝSLEDKY EXPERIMENTU I	18
4.2 VÝSLEDKY EXPERIMENTU II.....	21
4.3 VÝSLEDKY EXPERIMENTU III.....	23

4.3.1	<i>Vliv protektivních kultur a jejich CFS na produkci tyraminu u kmene Lactiplantibacillus plantarum RIBM 89 při teplotě 30 °C</i>	23
4.3.2	<i>Vliv protektivních kultur a jejich CFS na produkci tyraminu u kmene Lactiplantibacillus plantarum RIBM 89 při teplotě 12 °C</i>	24
4.3.3	<i>Vliv protektivních kultur a jejich CFS na produkci tyraminu u kmene Latilactobacillus curvatus T3 při teplotě 30 °C</i>	26
4.3.4	<i>Vliv protektivních kultur a jejich CFS na produkci tyraminu u kmene Latilactobacillus curvatus T3 při teplotě 12 °C</i>	28
4.4	VÝSLEDKY EXPERIMENTU IV	29
4.4.1	<i>Vliv nisinu na produkci tyraminu u kmene Lactiplantibacillus plantarum RIBM 89 při teplotě 30 °C</i>	29
4.4.2	<i>Vliv nisinu na produkci tyraminu u kmene Lactiplantibacillus plantarum RIBM 89 při teplotě 12 °C</i>	30
4.4.3	<i>Vliv nisinu na produkci tyraminu u kmene Latilactobacillus curvatus T3 při teplotě 30 °C</i>	32
4.4.4	<i>Vliv nisinu na produkci tyraminu u kmene Latilactobacillus curvatus T3 při teplotě 12 °C</i>	33
5.	SOUHRNNÁ DISKUZE	34
6.	ZÁVĚR	39
7.	PŘÍNOS PRO VĚDU A PRAXI	41
8.	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	42
9.	SEZNAM OBRÁZKŮ A TABULEK	49
10.	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	50
11.	CURRICULUM VITAE	51
12.	PUBLIKAČNÍ ČINNOST	53

1. SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

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. 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 (Marková a Králová, 2004; EFSA, 2011; Ahmad et al., 2020).

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 BA 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 BA, 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 spojených 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 BA 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).

1.2 Toxicita BA

1.2.1 Toxicita histaminu

Mezi nejvíce toxické biogenní aminy patří jednoznačně histamin (HIM). Histaminové otravy pak lze považovat jednoznačně mezi nejzávažnější. Histamin se v lidském těle nachází především v žirných 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).

Intoxikace HIM (tzv. „scombroid poisoning“) jsou často spojovány, jak již anglický název napovídá, s konzumací ryb čeledi *Scombridae* a *Scorpaenidae* (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 HIM spočívají v široké škále nespecifických gastrointestinálních a extraintestinálních symptomů v důsledku distribuce čtyř výše popsaných 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 specificita a složitá variabilita symptomů nepochybně přispívají k obtížné diagnostice intoxikace HIM.

1.2.2 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).

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 Možnosti snížení biogenních aminů

1.3.1 Snižování BA za použití ionizujícího záření

Ozařování potravin je jednou z technik konzervace potravin. 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). 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).

1.3.2 Mikroorganismy 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*, *Epicoccum nigrum*, *Fusarium sporum*, *Penicillium citrinum*, *P. roqueforti* a *Phoma* sp.). Degradční schopnost těchto mikroorganismů je umožněna přítomností nejčastěji aminooxidáz (Adachi et al., 1966; Murooka et al., 1979; Leuschner et al., 1998; Yogadina et al., 2002; Zaman et al., 2010; Niu et al., 2019). Bakteriální aminooxidázy katalyzují oxidativní deaminaci BA na příslušné aldehydy, amoniak a peroxid vodíku (Yogadina et al., 2002).

1.3.3 Využití protektivní kultur a jejich antimikrobiálních látek ke snížení tvorby BA

V současné době je věnována velká pozornost antibakteriálním látkám produkovanými bakteriemi mléčného kvašení (BMK). 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).

Bakteriociny

Do této skupiny řadíme širokou škálu ribozomálně syntetizovaných extracelulárně uvolněných látek peptidové nebo proteinové povahy. Bakteriociny produkované BMK 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).

Nisin

Nisin (nisin A) je nízkomolekulární polypeptid tvořený 34 aminokyselinovými zbytky (AMK). Obsahuje 5 cyklických struktur: jeden lanthionový a čtyři β -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 (nisin A, Z, F, Q, O, U, P, J a H; Reiners et al., 2020).

V současnosti je nisin jediný bakteriocin gram pozitivních bakterií, který byl schválený EFSA, Světovou zdravotnickou organizací a Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv ve Spojených státech 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 (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).

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; Punyaappa-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. Tvorba pórů o velikosti 2 až 2,5 nm vede k pasivnímu odtoku tzv. malých molekul (ionty draslíku, hořčíku a fosforu, aminokyseliny a molekuly ATP) z buňky. Zhroucení PMF vede ke smrti buňky v důsledku zastavení všech biosyntetických procesů a vyčerpání ATP (Bemena et al., 2014; Dishinger et al., 2014).

1.3.4 Využití rostlinných antimikrobiálních látek ke snížení BA

V poslední době řada studií poukazuje na možné využití esenciálních olejů k redukci BA v potravinách, zejména u produktů rybolovu (Cai et al., 2015; Huang et al., 2017; Křížek et al., 2018). 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. Aplikace éterických olejů z máty peprné, hřebíčku a římského kmínu na filé bubeníku amerického 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 také vedlo ke zlepšení sensorické kvality a snížení akumulace kadaverinu a putrescinu v této surovině během skladování při 4 °C (Huang et al., 2017). Na druhou stranu 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. Proto se doporučuje 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).

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 Použité mikroorganizmy

Celkem bylo testováno 22 protektivních kultur získaných ze Sbírký mlékařských mikroorganismů Laktoflora® (Cultures Collection of Dairy Microorganisms; CCDM):

- producenti nisinu: 12 kmenů *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* (kultivace: 30 ± 1 °C, aerobně, M17 médium, Merck, Německo),
- producenti BLIS: 2 kmeny *Lactobacillus acidophilus*, 4 kmeny *Lactobacillus gasseri*, 3 kmeny *Lactobacillus helveticus* a 1 kmen *Enterococcus faecium* (kultivace: 37 ± 1 °C, aerobně nebo anaerobně, MRS – de Man, Rogosa and Sharpe bujón; Merck, Německo).

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:

- 17 kmenů *Levilactobacillus brevis* (izoláty ze sýrů, piva a z masa)
- 8 kmenů *Latilactobacillus curvatus* (izoláty ze sýrů),
- 4 kmeny *Lactiplantibacillus plantarum* (izoláty ze sýrů a piva),
- 3 kmeny *Lacticaseibacillus casei/paracasei* (izoláty ze sýrů a piva),
- 3 kmeny *Lacticaseibacillus paracasei* (izoláty ze sýrů),
- 1 kmen *Latilactobacillus sakei* (izolát z masa),
- 2 kmeny *Streptococcus salivarius* (izoláty z masa),
- 2 kmeny *Leuconostoc mesenteroides* (izoláty z masa),
- 1 kmen *Leuconostoc pseudomesenteroides* (izolát ze sýrů),
- 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*; izoláty z masa a ze sýrů),
- 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*; izoláty z masa).

Testované laktobacily byly kultivovány v MRS médiu za anaerobních podmínek při teplotě 37 ± 1 °C, mléčné koky v médiu M17 za aerobních podmínek při teplotě 30 ± 1 °C a testované stafylokoky v Mueller-Hinton (HiMedia, Indie) médiu za aerobních podmínek při teplotě 37 ± 1 °C.

3.2 Metodika Experimentů I a II

V rámci Experimentu I byl proveden počáteční skrínig citlivosti 103 kmenů s dekarboxylázovou aktivitou izolovaných z potravin na metabolity protektivních kultur. Dále v Experimentu II, který navazoval na Experiment I, byla zkoumána antimikrobiální aktivita komerčního nisinu vůči 21 kmenům BMK. 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 24h kultury testovaného protektivního kmene bylo zaočkováno do 20 ml bujónu MRS nebo M17 a kultivováno po dobu 48 h za optimálních podmínek dle doporučení poskytovatele kultur a výsledků z přípravné fáze (pro větší přehlednost nejsou uvedeny v této práci). Po 48h kultivaci byly buňky odstraněny centrifugací při 10 000 ot/min po dobu 15 minut a při teplotě 15 ± 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 µm 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 µm a rozplněn do sterilních zkumavek a zamražen při teplotě -18 °C pro pozdější využití.

3.2.3 Jamková difúzní metoda

Při skrínigu antimikrobiální aktivity CFS z protektivních kultur byly testované dekarboxyláza-pozitivní kmene kultivovány za optimálních podmínek uvedených v kapitole 3.1. Po 24h kultivaci byla bakteriální suspenze naředěna desítkovým ředěním (10^{-1} – 10^{-4}) a 1 ml příslušného ředění byl naočkován přelivem na 2 Petriho misky. Při testování antimikrobiální aktivity nisinu byla z 24h 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 µl CFS z příslušné protektivní kultury nebo příslušná koncentraci nisinu. 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 indikátorový kmen 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 a IV

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). Dále 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 těchto protektivních kmenů, jejich supernatantů (CFS) a nisinu na produkci TYM testovanými kmeny T3 a RIBM 89 byl sledován v závislosti na teplotě kultivace (30 ± 1 °C a 12 ± 1 °C). Rovněž byl zkoumán vliv přidavku protektivních kultur, jejich CFS a nisinu k producentům TYM v různých časových intervalech kultivace. Během kultivace při teplotě 30 ± 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 ± 1 °C bylo dávkování uskutečněno 0. den (začátek experimentu), dále v 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 µl 24h kultury s tyrozin-dekarboxylázovou aktivitou. První série zkumavek pouze s naočkováným tyramin-produkujícím kmenem (bez protektivní kultury, CFS a nisinu) sloužila jako kontrolní vzorky. K další sérii zkumavek se zaočkováným BA-produkujícím kmenem byla přidávána v jednotlivých časech 24h protektivní kultura v objemu 100 µl. K třetí sérii zkumavek se zaočkováným BA-produkujícím kmenem byl přidáván v jednotlivých časech CFS protektivní kultury v objemu 500 µl. K další sérii zkumavek se zaočkováným BA-produkujícím kmenem 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 ± 1 °C probíhala 72 h a při teplotě 12 ± 1 °C 16 dní. Odběry vzorků pro stanovení koncentrace TYM a stanovení počtu mikroorganismů byly realizovány při 30 ± 1 °C 0. (hned po zaočkování), 2., 5., 9., 12., 24., 48. a 72. hodinu kultivace. Při teplotě 12 ± 1 °C byly vzorky odebírány 0. (hned po zaočkování), 2., 4., 7., 9., 11., 14. a 16. den kultivace. Metodika stanovení koncentrace TYM je dále popsána v kapitole 3.4 a stanovení počtu mikroorganismů v kapitole 3.5.

3.4 Stanovení množství tyraminu v Experimentech III – IV pomocí HPLC/UV

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). 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 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).

3.5 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.

3.6 Statistické hodnocení získaných dat

Výsledky skríningu antimikrobiálního působení protektivních kmenů na růst testovaných producentů biogenních aminů a taktéž 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. HLAVNÍ VÝSLEDKY PRÁCE

4.1 Výsledky Experimentu I

Největší inhibiční účinek z testovaných CFS byl pozorován u supernatantů z nisín-produkujících kmenů *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*, kdy se u jedenácti 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) projevil inhibiční účinek na alespoň 1 testovaný indikátorový kmen. Všechny kmeny *Levilactobacillus* (*L.*) *brevis* byly různou měrou citlivé vůči působení CFS 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 CFS z *Lc. lactis* ssp. *lactis* CCDM 686 a CCDM 689. Průměry inhibičních zón detekovaných u těchto CFS jsou uvedeny v Tab. 1.

Obdobně všechny kmeny *Latilactobacillus* (*Lat.*) *curvatus* (8/8, izoláty ze sýrů) vykazovaly citlivost vůči stejným CFS jako kultury *L. brevis*, nejvíce pak na již zmíněné CFS z kmenů CCDM 686 (13,0–18,0 mm) a CCDM 689 (od 13 do 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 5 z 9 zmíněných CFS ($P < 0,05$). Konkrétně se jednalo o CFS 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 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 (od 12,3 do 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 ($P > 0,05$).

Tab. 1 – Inhibiční účinek CFS z kmenů *Lc. lactis ssp. lactis* CCDM 686 a CCDM 689 na kmeny BMK [údaje jsou vyjádřeny jako průměry inhibičních zón v mm ze dvou měření \pm 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 \pm 0,7	14,0 \pm 0,0	<i>Lc. casei/paracasei</i> RIBM 113	14,5 \pm 0,7	15,3 \pm 0,4
<i>L. brevis</i> B125	11,0 \pm 0,0	13,5 \pm 0,7	<i>Lat. curvatus</i> T2	15,0 \pm 0,0	15,5 \pm 0,7
<i>L. brevis</i> RIBM 16	13,0 \pm 0,0	14,5 \pm 0,7	<i>Lat. curvatus</i> T3	18,0 \pm 0,0	17,5 \pm 0,7
<i>L. brevis</i> RIBM 20	13,0 \pm 0,0	14,3 \pm 0,4	<i>Lat. curvatus</i> T8	14,3 \pm 0,4	14,0 \pm 0,0
<i>L. brevis</i> RIBM 33	15,0 \pm 0,0	15,5 \pm 0,7	<i>Lat. curvatus</i> T15	15,0 \pm 0,0	13,5 \pm 0,7
<i>L. brevis</i> RIBM 50	15,0 \pm 0,0	15,0 \pm 0,0	<i>Lat. curvatus</i> T36	15,0 \pm 0,0	15,0 \pm 0,0
<i>L. brevis</i> RIBM 62	15,3 \pm 0,4	15,3 \pm 0,4	<i>Lat. curvatus</i> T37	13,0 \pm 0,0	14,3 \pm 0,4
<i>L. brevis</i> RIBM 67	15,3 \pm 0,4	15,0 \pm 0,0	<i>Lat. curvatus</i> T41	13,5 \pm 0,7	14,0 \pm 0,0
<i>L. brevis</i> RIBM 68	15,0 \pm 0,0	15,3 \pm 0,4	<i>Lat. curvatus</i> AI-3	13,0 \pm 0,0	13,0 \pm 0,0
<i>L. brevis</i> RIBM 69	15,3 \pm 0,4	15,0 \pm 0,0	<i>Lat. sakei</i> B103	11,5 \pm 0,7	14,0 \pm 0,0
<i>L. brevis</i> RIBM 70	15,3 \pm 0,4	15,0 \pm 0,0	<i>Lac. plantarum</i> AI-7	14,0 \pm 0,0	13,5 \pm 0,7
<i>L. brevis</i> RIBM 72	15,0 \pm 0,0	15,3 \pm 0,4	<i>Lac. plantarum</i> RIBM 89	17,3 \pm 0,4	16,5 \pm 0,7
<i>L. brevis</i> RIBM 78	15,0 \pm 0,0	15,0 \pm 0,0	<i>Lac. plantarum</i> RIBM 94	10,5 \pm 0,7	10,0 \pm 0,0
<i>L. brevis</i> RIBM 93	15,0 \pm 0,0	15,0 \pm 0,0	<i>Lac. plantarum</i> RIBM 96	15,0 \pm 0,0	15,3 \pm 0,4
<i>L. brevis</i> RIBM 98	15,3 \pm 0,4	15,3 \pm 0,4			
<i>L. brevis</i> RIBM 101	15,3 \pm 0,4	15,0 \pm 0,0			
<i>L. brevis</i> RIBM 111	14,5 \pm 0,7	15,0 \pm 0,0			
<i>Lc. casei/paracasei</i> AIV-11	13,5 \pm 0,7	14,0 \pm 0,0			
<i>Lc. casei/paracasei</i> AIV-13	14,5 \pm 0,0	14,5 \pm 0,0			

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

Různou citlivost vůči CFS 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 CFS 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 a 15,3 mm). Oproti tomu kmeny *Lc. paracasei* (T50–T52) byly rezistentní vůči působení CFS z laktokoků. Dále také nebyla pozorována antimikrobiální aktivita testovaných CFS na kmeny *Leuconostoc mesenteroides* (B170 a B171), *Leuc. pseudomesenteroides* (T63) a *Streptococcus salivarius* (B150).

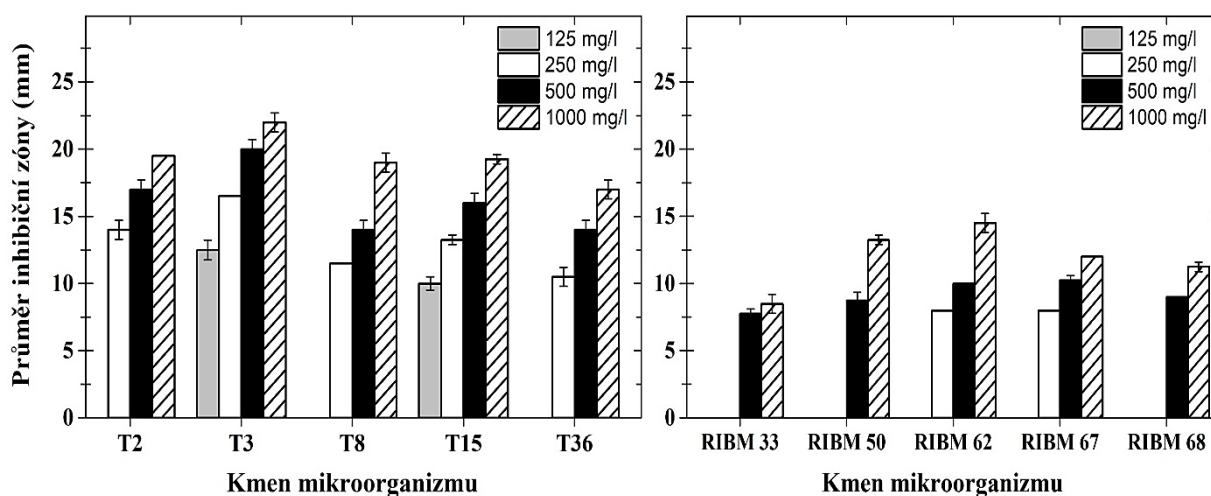
Devět z dvanácti testovaných CFS z laktokoků (CFS z kmene CCDM 71, CCDM 414, CCDM 418, CCDM 670, CCDM 686, CCDM 689, CCDM 695, CCDM 698 a CCDM 731) projevilo inhibiční účinek na alespoň 1 indikátorový kmen z rodu *Enterococcus* nebo *Staphylococcus*. V případě kmenů enterokoků inhibiční účinek prokázaly CFS 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 7 z 9 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. 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 CFS. 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), *E. faecalis* B131 (1/3) a *E. hirae* B122 (1/4). 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 ($P < 0,05$).

Z testovaných kmenů stafylokoků 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), přičemž CFS z kmene CCDM 414 inhiboval i růst kmene *S. hominis* S7. Průměry inhibičních zón se pohybovaly v rozmezí 9,5–10,5 mm.

4.2 Výsledky Experimentu II

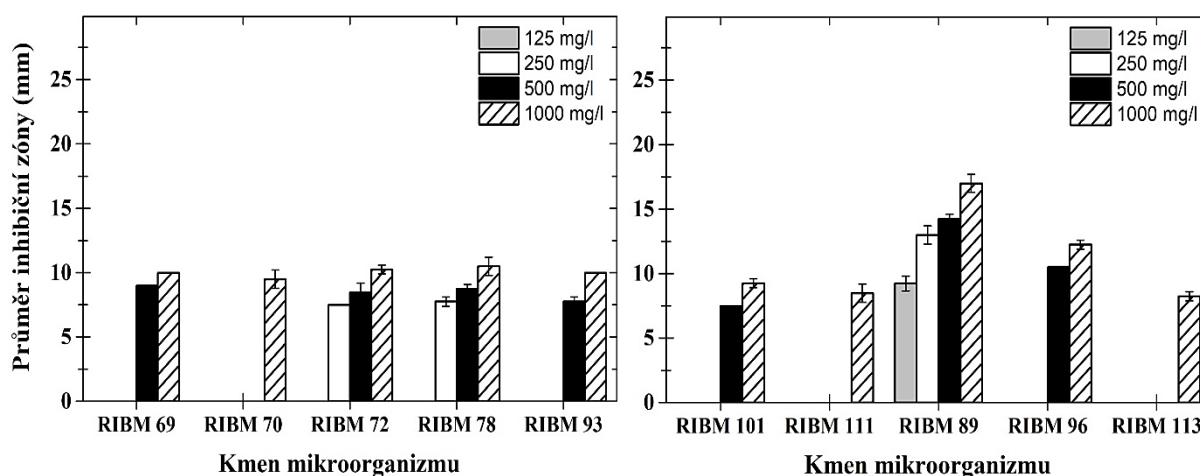
V rámci tohoto experimentu byla zkoumána antimikrobiální aktivita komerčního přípravku nisinu vůči 21 kmenům (13 kmenů *L. brevis*, 5 kmenů *Lat. curvatus*, 2 kmeny *Lac. plantarum* a 1 kmen *Lc. casei/paracasei*), které vykazovaly významnou citlivost vůči CFS z testovaných kmenů *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* (producenti nisinu). Ze získaných výsledků je patrné (Obr. 1–Obr. 2), že přípravek nisinu v nejnižší testované koncentraci (62,5 mg/l) neinhiboval žádný z vyšetřovaných kmenů BMK. V případě vyšetřovaných kmenů *Latilactobacillus curvatus* 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 (Obr. 1). U kultury T3 byly naměřeny inhibiční zóny o průměrech 12,5–22,0 mm a u kultury T15 inhibiční zóny o průměrech 10,0 až 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 až 14,0 mm až při aplikaci přípravku nisinu v koncentraci 250 mg/l.



Obr. 1: Antimikrobiální působení nisinu na kmeny *Lat. curvatus* (T2, T3, T8, T15 a T36) a na kmeny *L. brevis* (RIBM 33, RIBM 50, RIBM 62, RIBM 67 a RIBM 68).

Obdobně jako kmeny *Lat. curvatus* prokázaly testované kmeny *Levilactobacillus brevis* (izoláty z piva) různou citlivost vůči působení nisinu. Inhibiční účinek přípravku nisinu byl pozorován u 12 ze 13 kmenů *L. brevis* (Obr. 1–Obr. 2). 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 nisinů než kmeny *Lactilactobacillus curvatus*.



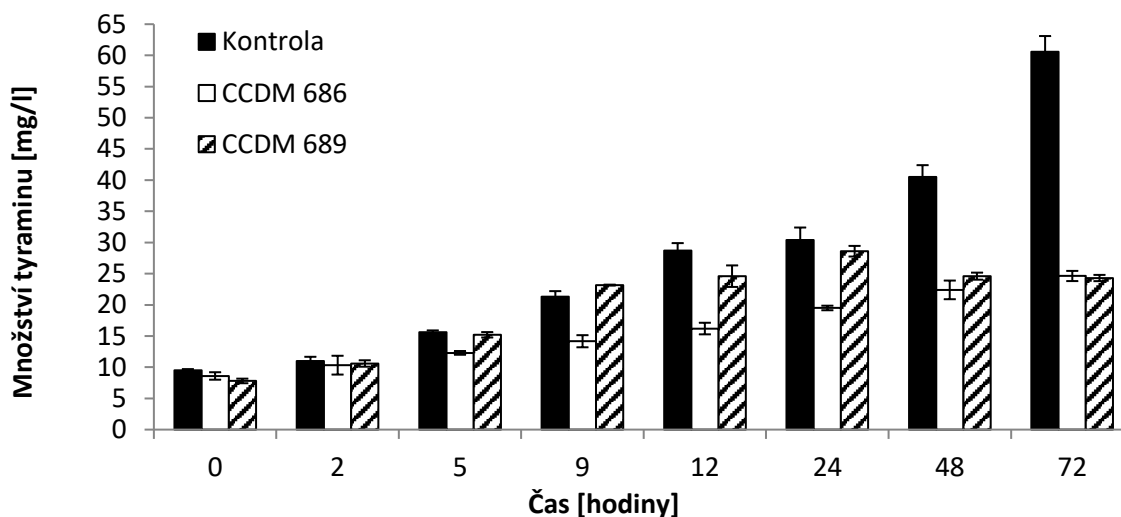
Obr. 2: Antimikrobiální působení nisinů na kmeny *L. brevis* (RIBM 69, RIBM 70, RIBM 72, RIBM 78, RIBM 93, RIBM 101 a RIBM 111) a *Lac. plantarum* (RIBM 89 a RIBM 96) a *Lc. casei/paracasei* (RIBM 113).

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 ($P < 0,05$). Poslední zkoumaný kmen *Lacticaseibacillus casei/paracasei* RIBM 113 vykazoval citlivost až při nejvyšší testované koncentraci (1000 mg/l) přípravku nisinů. 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 nisinů.

4.3 Výsledky Experimentu III

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

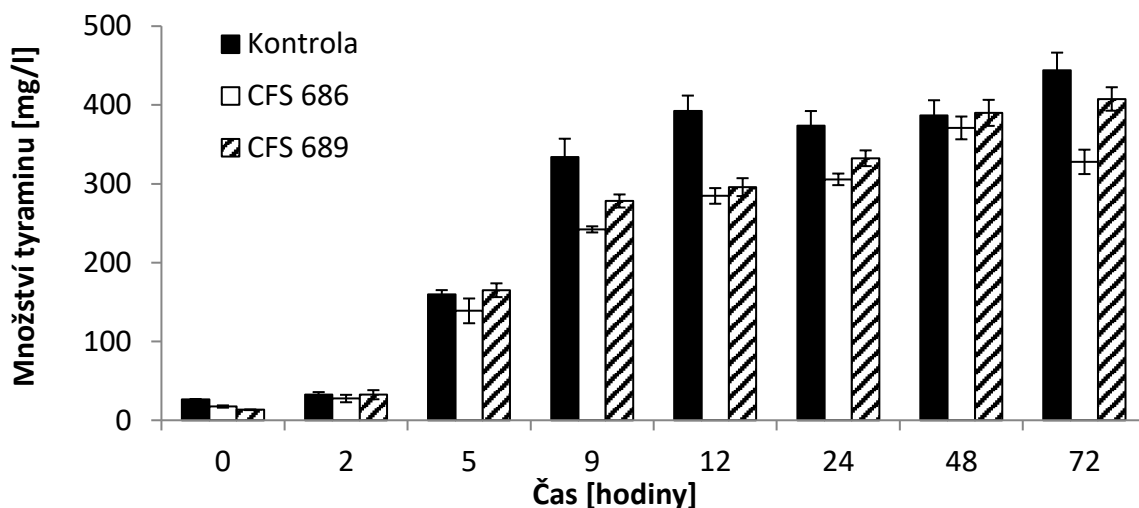
Z grafu na Obr. 3 je patrné, že dekarboxylázová aktivita kmene *Lactiplantibacillus plantarum* RIBM 89 v přítomnosti kmene *Lc. lactis* ssp. *lactis* CCDM 689 nebyla výrazně ovlivněna až do 24. hodiny kultivace. Detekovaná množství TYM v těchto vzorcích byla srovnatelná ($P > 0,05$) jako v kontrole. Nicméně produkce TYM se v přítomnosti kmene CCDM 689 v dalších hodinách kultivace nezvyšovala a na konci doby kultivace byl TYM 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. Inokulace kultury CCDM 686 ke kmenu RIBM 89 po 2 a 5 h kultivace tohoto kmene vedla k inhibici produkce TYM o 60 % ($24,5 \pm 0,6$ mg/l) a 63 % ($22,6 \pm 0,4$ mg/l) porovnáním s kontrolou. 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 kontrole. Výraznější snížení obsahu TYM (o 79 %) bylo detekováno po zaočkování kultury CCDM 689 po 5. hodině kultivace kmene RIBM 89 ($P < 0,05$).



Obr. 3: Vývoj produkce TYM kmenem *Lac. plantarum* RIBM 89 v přítomnosti *Lc. lactis* ssp. *lactis* CCDM 686 a CCDM 689 při teplotě 30 °C (čas inokulace 0 h).

Co se týká vlivu supernatantů protektivních kultur (CFS 686 a CFS 689), 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 (Obr. 4). Koncentrace TYM 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 TYM ($P > 0,05$). 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, signifikantnější snížení množství TYM bylo detekováno až po aplikaci CFS 689 po 12. hodině kultivace buněk kmene RIBM 89 ($P < 0,05$). Na konci 72h kultivace bylo sledováno snížení o 29 % srovnáním s kontrolou. V ostatních časech aplikace CFS 689 nebyl zaznamenán vliv na snížení produkce TYM.

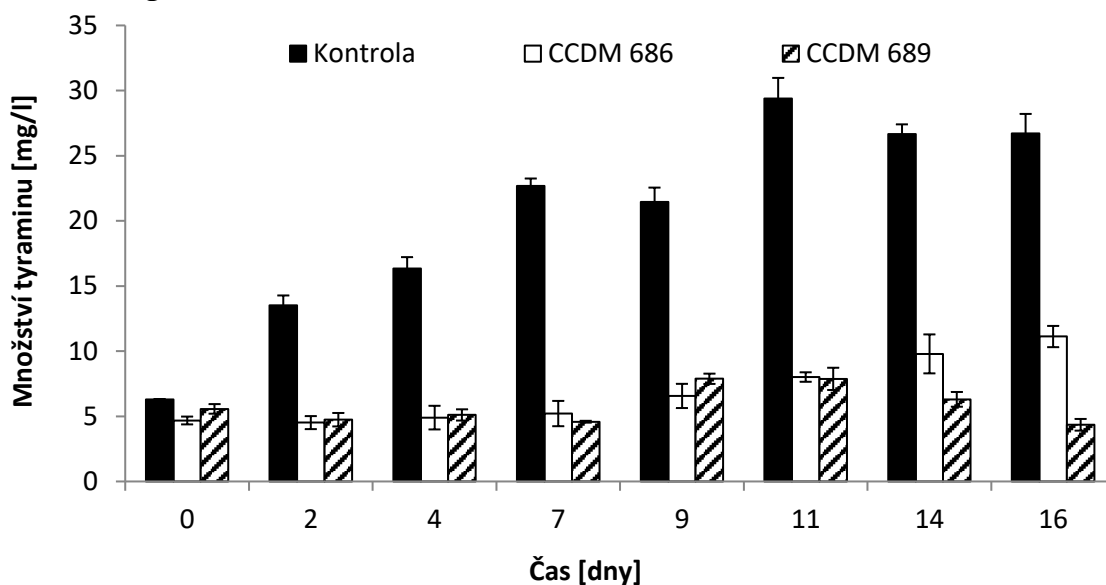


Obr. 4: Vývoj produkce TYM kmenem *Lac. plantarum* RIBM 89 po přidavku CFS z *Lc. lactis* ssp. *lactis* CCDM 686 (CFS 686) a CFS z *Lc. lactis* ssp. *lactis* CCDM 689 (CFS 689) při teplotě 30 °C (čas inokulace 0 h).

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

Porovnáme-li množství vyprodukovaného TYM v kontrolních vzorcích při teplotě 30 °C a při teplotě 12 °C, lze pozorovat signifikantní snížení produkce TYM 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 (Obr. 3) a v kontrolním vzorku pro CFS v množství $444,2 \pm 22,2$ mg/l (Obr. 4). Naproti tomu po 16 dnech kultivace při 12 °C bylo detekované množství TYM v kontrolním vzorku pro protektivní kultury 2x nižší ($26,7 \pm 1,5$ mg/l; Obr. 5) a ve vzorku pro CFS 3x nižší ($130,7 \pm 3,9$ mg/l; Obr. 6). Z výsledků uvedených na Obr. 5 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 TYM 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.

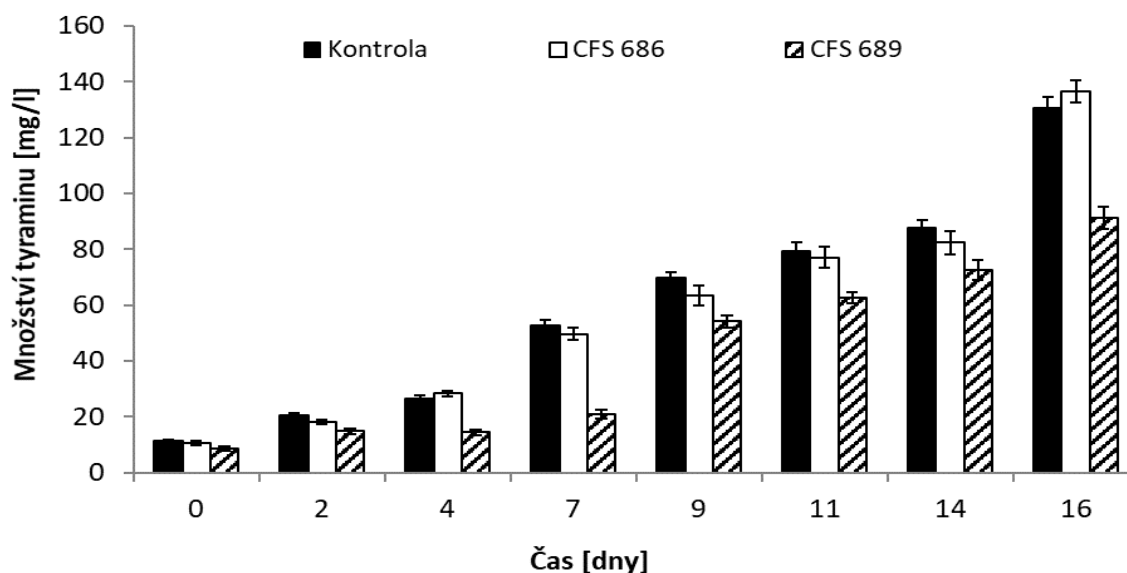


Obr. 5: Vývoj produkce TYM kmenem *Lac. plantarum* RIBM 89 v přítomnosti *Lc. lactis* ssp. *lactis* CCDM 686 a CCDM 689 při teplotě 12 °C (čas inokulace 0. den).

Přídavek kultury CCDM 686 a CCDM 689 v dalších dnech kultivace kmene RIBM 89 vedl k poklesu účinku těchto protektivních kultur na produkci TYM ($P < 0,05$). Inokulace kmenů CCDM 686 a CCDM 689 po 4 dnech kultivace vedla k snížení produkce TYM o zhruba 48 %. V dalším čase inokulace (7. den kultivace) snížení produkce TYM byla zaznamenána pouze po přidavku kultury CCDM 686, kdy na konci doby kultivace bylo detekováno o 34 % nižší množství TYM ($17,6 \pm 0,9$ mg/l) než v kontrole.

Vliv přídavku CFS 686 a CFS 689 na začátku kultivace na produkci TYM kmenem RIBM 89 je zobrazen na Obr. 6. V obou sériích lze pozorovat, že obsah sledovaného biogenního aminu se úměrně navyšoval s dobou kultivace. Avšak v případě vzorků s přídavkem 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 přídavkem CFS 686 byly během celé doby kultivace zjištěny srovnatelné hodnoty TYM jako u kontrolních vzorků ($P > 0,05$).

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 přídavku tohoto CFS 9. den kultivace, 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 přídavku CFS). Nicméně k největšímu poklesu produkce TYM došlo ve vzorku, kde byl tento CFS 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.



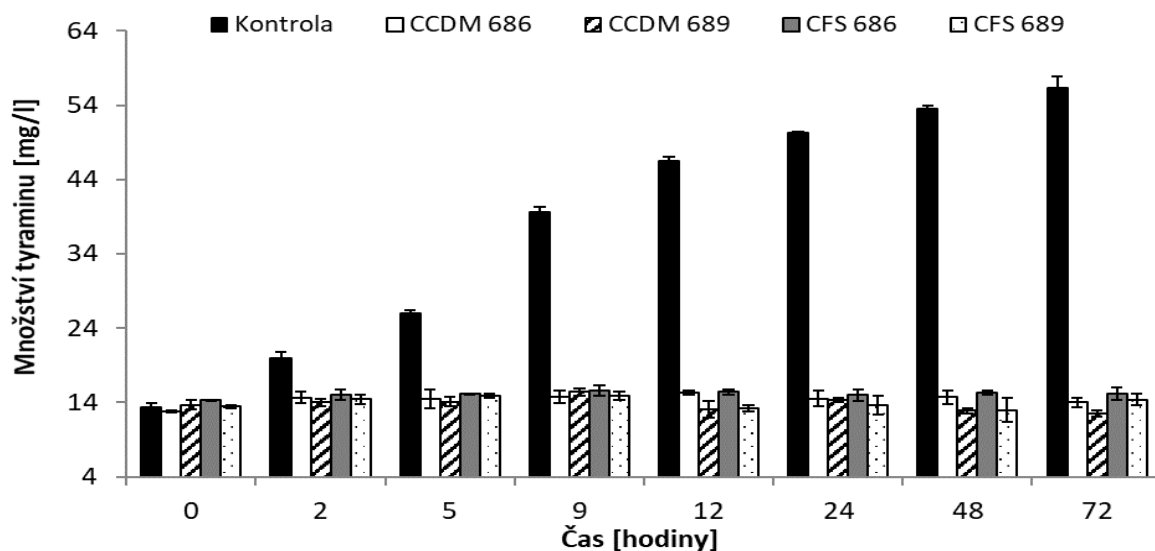
Obr. 6: Vývoj produkce TYM kmenem *Lac. plantarum* RIBM 89 po přidavku CFS 686 a CFS 689 při teplotě 12 °C (čas inokulace 0. den).

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

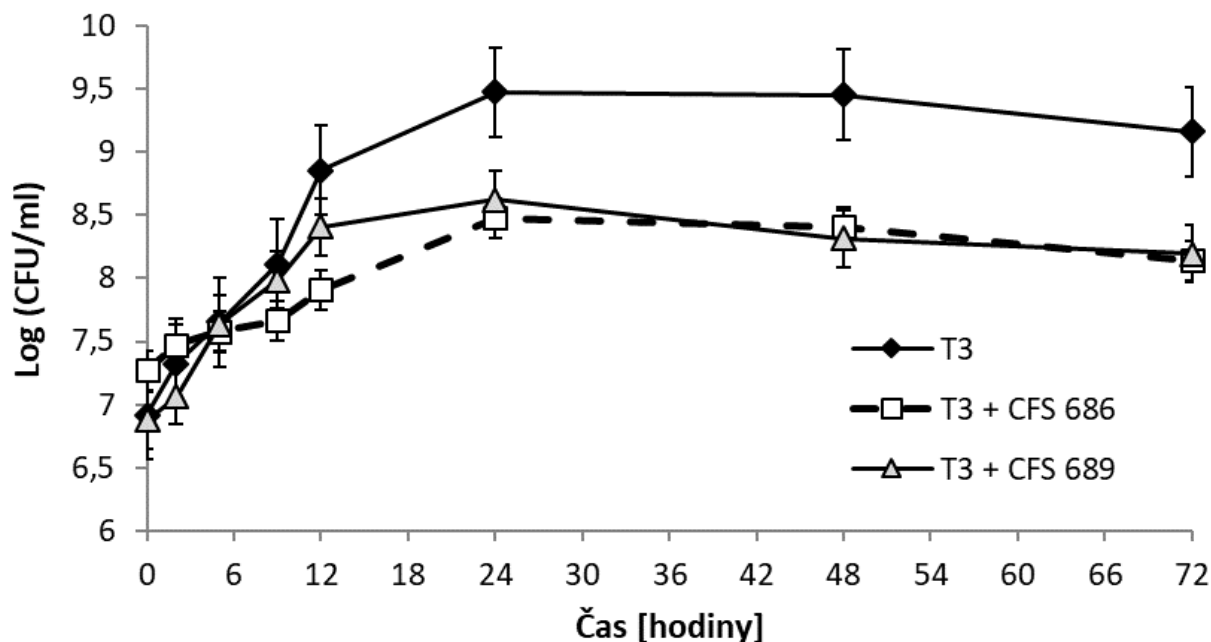
V přítomnosti protektivní kultury CCDM 686 největší produkce TYM kmenem *Latilactobacillus curvatus* T3 nastala po 12 h kultivace, kdy byl detekován v množství $15,3 \pm 0,3$ mg/l. Stejné množství TYM ($15,4 \pm 0,5$ mg/l) bylo kmenem T3 vyprodukováno již po 9. hodinách kultivace v přítomnosti kultury CCDM 689 (Obr. 7). V obou sériích vzorků se obsah TYM v dalších hodinách kultivace nezvyšoval. Na konci doby kultivace byla detekována ve vzorcích s přidavkem 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 h kultivace kmene T3 nebyl zaznamenán statisticky významný rozdíl v produkci TYM od předchozí série vzorků, kde byly kmeny zaočkovány v čase 0 h ($P > 0,05$). Inokulace protektivní kultury CCDM 686 ke kmene T3 po 5 h kultivace vedla k poklesu produkce TYM o 58 % v porovnání s kontrolou a o 61 % v případě kultivace kmene T3 s kulturou CCDM 689.

Z Obr. 7 je patrné, že vyprodukováná množství TYM kmenem T3 v přítomnosti CFS protektivních kultur jsou signifikantně nižší již od 2. hodiny kultivace až do konce experimentu oproti kontrole ($P < 0,05$). Obsah TYM po 72 h 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. 8 je možné vyvodit, 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.

Snížení účinků supernatantů se projevilo 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 protektivních kultur a jejich CFS v pozdější fázi růstu kmene T3 (tedy po 9., 12. a 24. hodinách kultivace) nebyl zaznamenán vliv na tyrozin-dekarboxylázovou aktivitu tohoto kmene.



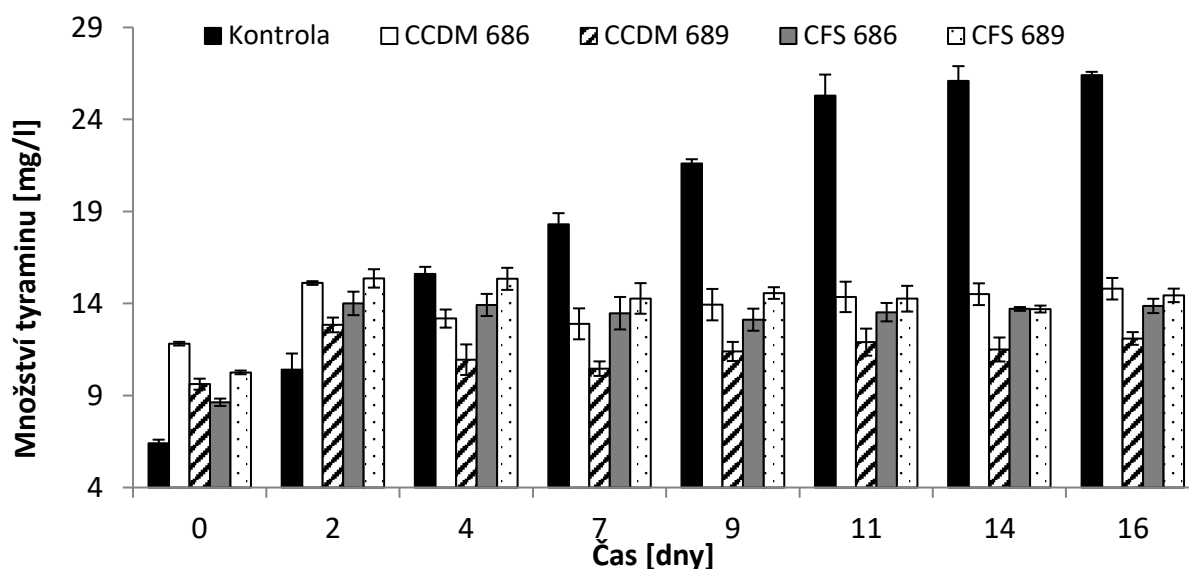
Obr. 7: Vývoj produkce TYM kmenem *Latilactobacillus curvatus* T3 v přítomnosti *Lc. lactis* ssp. *lactis* CCDM 686 a CCDM 689 a jejich supernatantů (CFS 686 a CFS 689) při teplotě 30 °C (čas inokulace 0 h).



Obr. 8: 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) byl v kontrolních vzorcích TYM detekován v množství $6,4 \pm 0,2$ mg/l. Jeho obsah se mírně navyšoval až do 14. dne a do konce 16. denní kultivace stagnoval na množství 26,4 mg/l (Obr. 9). 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 TYM 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). Kinetika produkce sledovaného BA byla srovnatelná i po inokulaci protektivních kmenů po 2 a 4 dnech kultivace kmene T3 ($P > 0,05$).



Obr. 9: Vývoj produkce TYM kmenem *Lat. curvatus* T3 v přítomnosti *Lc. lactis* ssp. *lactis* CCDM 686 a CCDM 689 a jejich supernatantů (CFS 686 a CFS 689) při teplotě 12 °C (čas inokulace 0. den).

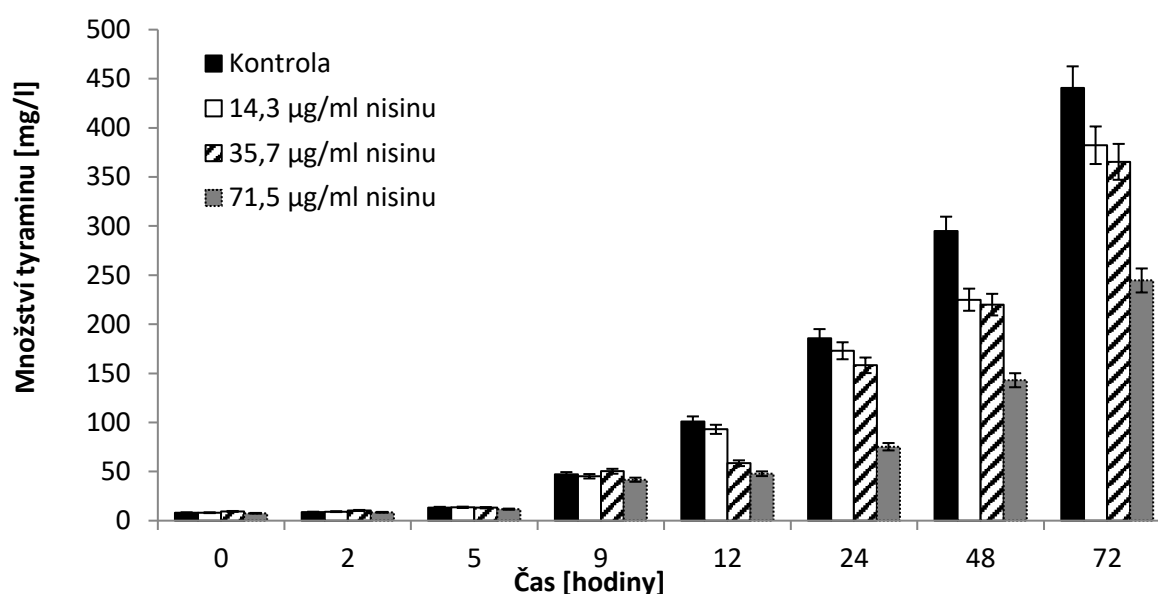
Rovněž přidavek CFS protektivních kultur měl u tohoto dekarboxyláza-pozitivního kmene nezanedbatelný vliv na snížení produkce TYM, pokud byly CFS aplikovány do 7. dne kultivace (začátek stacionární fáze růstu). Aplikace CFS 686 a CFS 689 na začátku kultivace (0. den) vedla k redukcí TYM o 47 % v případě CFS 686 a v případě CFS 689 byla zaznamenána redukce TYM o 45 % porovnáním s kontrolou. Srovnatelné výsledky produkce TYM, respektive redukce TYM, byly zjištěny i po přidavcích CFS 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 ($P > 0,05$).

4.4 Výsledky Experimentu IV

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

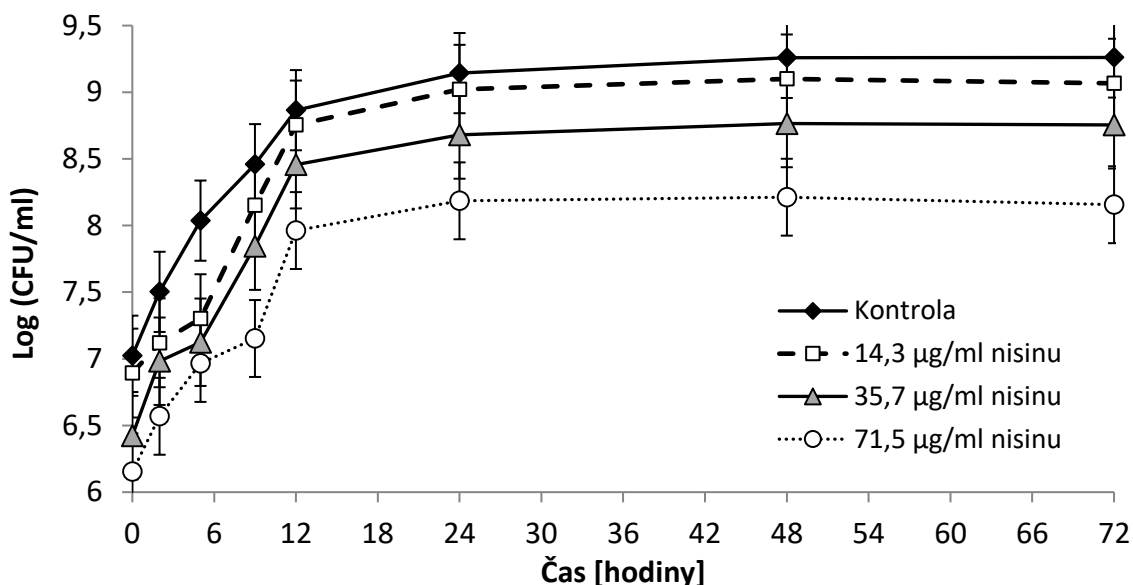
Z Obr. 10 je patrné, že nisin ani v 1 testované koncentraci neměl výrazný vliv na produkci TYM až do 12. hodiny kultivace kmene RIBM 89 ($P > 0,05$). Od 12. hodiny kultivace lze ve všech vzorcích s přidavkem nisinů pozorovat nižší obsah TYM. Nicméně s dobou kultivace se ve všech vzorcích zvyšoval obsah TYM. Tento trend lze vysvětlit faktem, že aplikované koncentrace nisinů byly subletální. Tudiž nedošlo k usmrcení všech buněk kmene RIBM 89, a to ani v nevyšší testované koncentraci nisinů, ale dochází pouze ke snížení počtu buněk schopných dekarboxylace tyrozinu (Obr. 11). S tímto korespondují i nižší detekovaná množství TYM v těchto vzorcích na konci 72h kultivace. Účinek nisinů 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 nisinů (71,5 $\mu\text{g/ml}$), a to snížení o 44 % porovnáním s kontrolou ($P < 0,05$).



Obr. 10: Vliv nisinů na produkci TYM kmenem *Lactiplantibacillus plantarum* RIBM 89 při teplotě 30 °C (čas aplikace 0 h).

Největší snížení v dalším čase aplikace nisinů (po 2 h kultivace kmene RIBM 89) bylo zaznamenáno ve vzorcích s nejvyšší testovanou koncentrací nisinů. 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 nisinů o koncentraci 35,7 $\mu\text{g/ml}$ došlo k poklesu TYM o 29 % a nisin v nejnižší zkoumané koncentraci

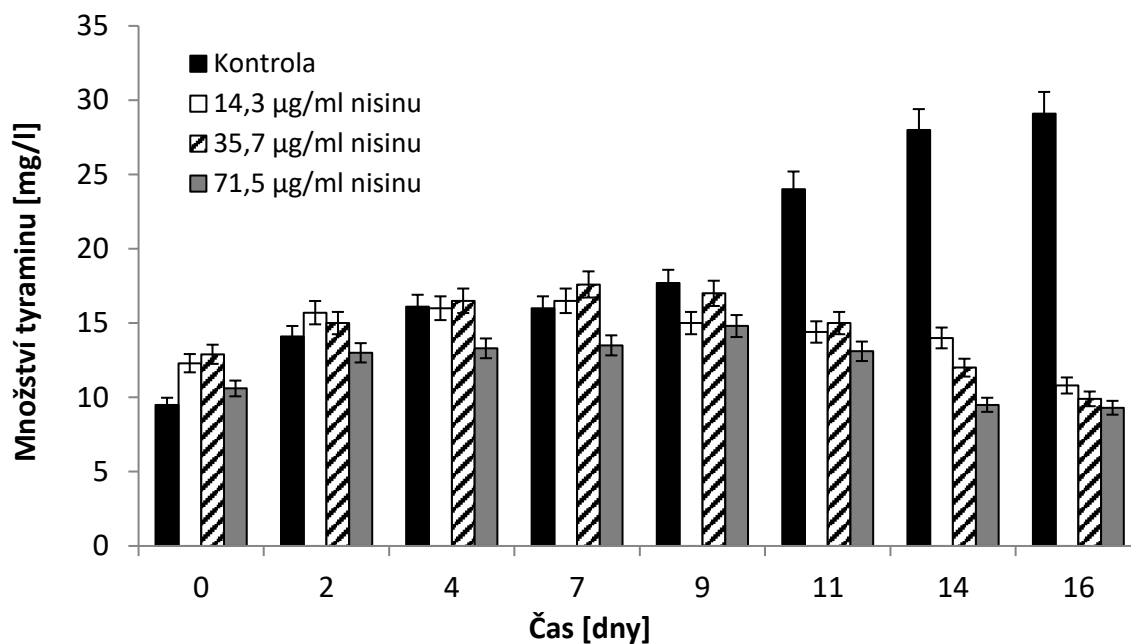
snížil produkci TYM o 12 %. Srovnatelné snížení produkce TYM (23 % a 19 %) bylo pozorováno i ve vzorcích se stejnými koncentracemi nisinu, ale aplikovaných po 5 h kultivace kmene RIBM 89. Statisticky významné snížení účinku nisinu na produkci, respektive redukci, TYM oproti předchozímu času aplikace (2 h) bylo pak sledováno pouze v nejvyšší testované koncentraci ($P < 0,05$). Přesto byla zjištěna redukce obsahu TYM o 42 % porovnáním s kontrolou. 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. 11: Vliv nisinu na růst kmene *Lactiplantibacillus plantarum* RIBM 89 při teplotě 30 °C (čas aplikace 0 h).

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

Dekarboxylázová aktivita kmene RIBM 89 byla výrazně ovlivněna kombinací nízké teploty a přítomností nisinu ve všech časech aplikace ($P < 0,05$). Účinek nisinu aplikovaného na začátku kultivace kmene RIBM 89 (0. den; Obr. 12) 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 ($P > 0,05$). V případě aplikace nisinu v nejnižší testované koncentraci (14,3 µg/ml) v dalších dnech kultivace kmene RIBM 89 (tedy 2., 4., a 7. den kultivace) lze sledovat srovnatelný vliv na produkci TYM ($P > 0,05$). 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 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 a v druhém případě o 45% snížení.



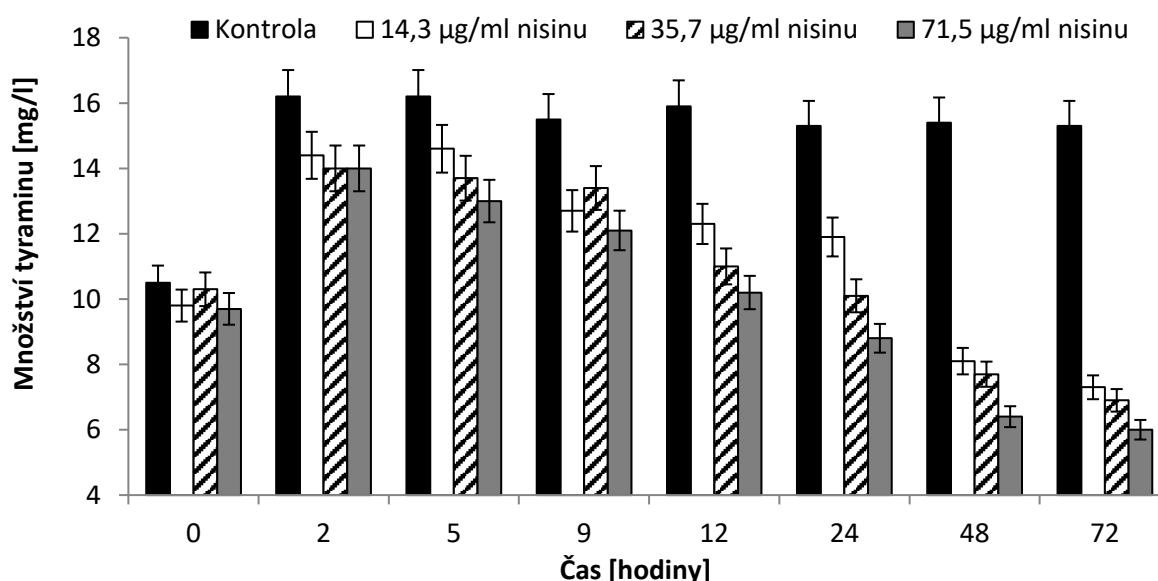
Obr. 12: Vliv nisinu na produkci tyraminu kmenem *Lactiplantibacillus plantarum* RIBM 89 při teplotě 12 °C (čas aplikace 0. den).

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 (začátek exponenciální a začátek stacionární fáze růstu kmene RIBM 89), bylo pozorováno snížení produkce TYM v závislosti na koncentraci nisinu. Při přidavku nisinu o koncentraci 35,7 µg/ml 2. den kultivace byl detekován o 59 % nižší obsah TYM v porovnání 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 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 přidavkem nisinu o koncentraci 35,7 µg/ml byla

o 64 % nižší oproti kontrole a ve vzorcích s přidavkem nisinu o koncentraci 71,5 µg/ml o 50 % nižší než v kontrolním vzorku.

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

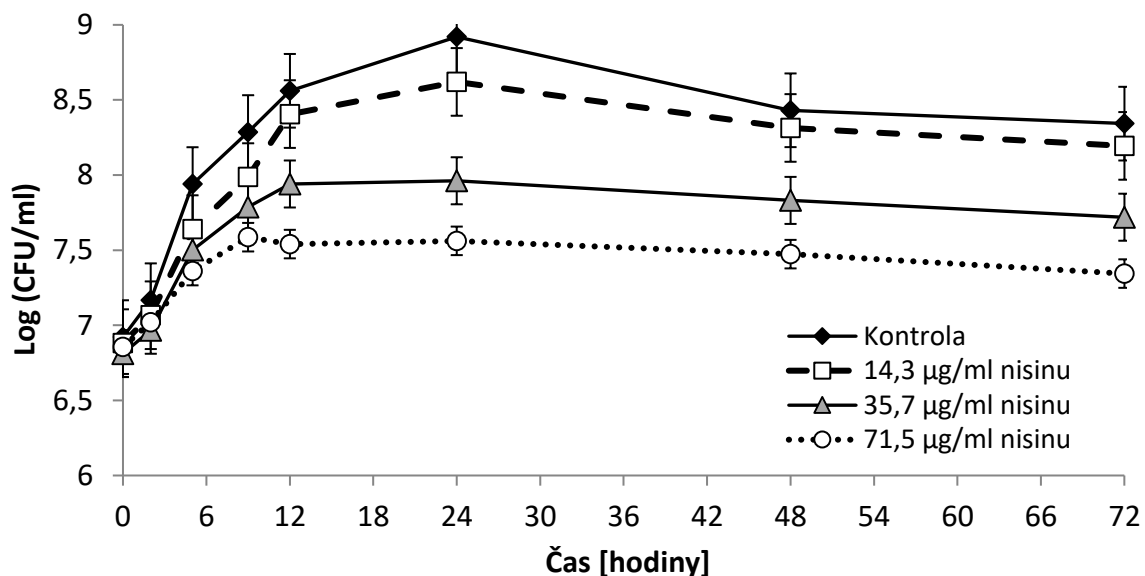
Celková produkce tyraminu kmenem *Latilactobacillus curvatus* T3, oproti kmenu *Lactiplantibacillus plantarum* RIBM 89, byla výrazně nižší ($P < 0,05$). Tento fakt může souviset s nižšími počty CFU/ml detekovaných v kontrolních vzorcích u kmene T3 (6,9–8,3 log CFU/ml; Obr. 14) oproti počtům zjištěným v kontrolních vzorcích u kultury RIBM 89 (7,0–9,3 log CFU/ml; Obr. 12). Maximální vyprodukované množství TYM v kontrolních vzorcích nepřesáhlo $16,2 \pm 0,8$ mg/l (Obr. 13). Přídavek nisinu ve všech koncentracích, které byly zaočkovány spolu s produkčním kmenem T3 v čase 0 h, snížil dekarboxylázovou aktivitu tohoto kmene. 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 přidavkem 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 přidavku nisinu.



Obr. 13: Vliv nisinu na produkci tyraminu kmenem *Latilactobacillus curvatus* T3 při teplotě 30 °C (čas aplikace 0 h).

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. 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 ($P > 0,05$). Co se týká přidavku bakteriocinu v dalších koncentracích, aplikace nisinu o koncentraci $14,3 \mu\text{g/ml}$ 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 $35,7 \mu\text{g/ml}$ 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.

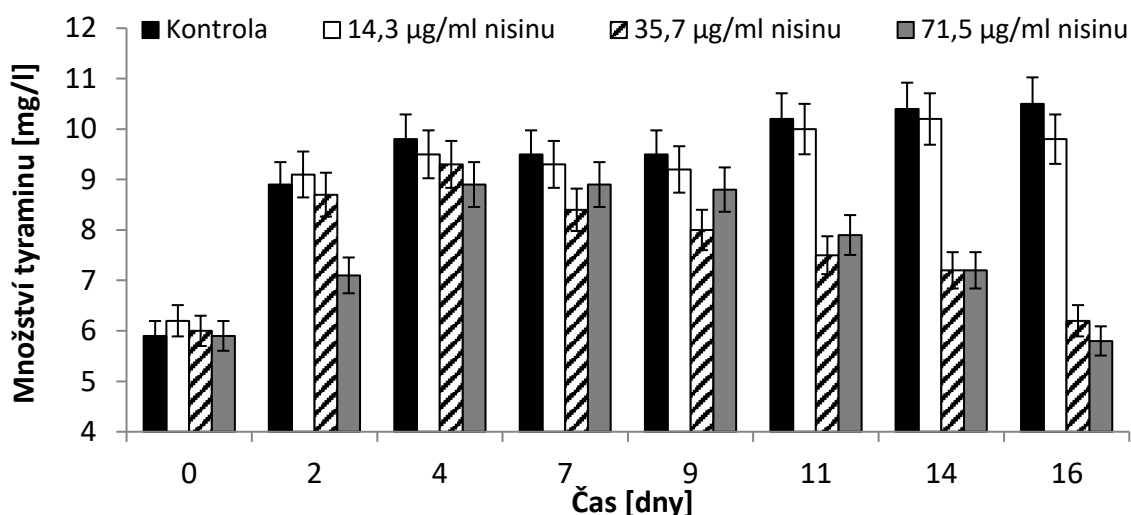


Obr. 14: Vliv nisinu na růst kmene *Lat. curvatus* T3 při teplotě 30 °C (čas aplikace 0 h).

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. Přídavek nisinu na začátku kultivace kmene *Lat. curvatus* T3 (0. den) měl významný vliv na snížení produkce TYM pouze ve 2 nejvyšších testovaných koncentracích (Obr. 15). 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.

Co se týká účinku nisinu v dalších časech aplikace, nisin v koncentraci $14,3 \mu\text{g/ml}$, kromě času aplikace 4. a 7. den, neměl statisticky významný vliv na produkci TYM ($P > 0,05$). Ve vzorcích, kde byl nisin v této koncentraci aplikovaný 4. den kultivace, bylo pozorováno na konci kultivace snížení TYM o 25 % a při aplikaci 7. den pak o 19 % oproti kontrole.



Obr. 15: Vliv nisinu na produkci tyraminu kmenem *Lactobacillus curvatus* T3 při teplotě 12 °C (čas aplikace 0. den).

Rovněž u další zkoumané koncentrace nisinu (35,7 µg/ml), lze pozorovat vliv času aplikace bakteriocinu k rostoucím buňkám kmene T3. Pokud byl přidán nisin v exponenciální až počáteční stacionární fázi růstu kmene T3 (2. a 4. den kultivace), bylo pozorováno výraznější snížení obsahu TYM 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. Vliv nisinu v nejvyšší testované koncentraci na produkci TYM byl srovnatelný ($P > 0,05$) až na jednu výjimku. Tou 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.

5. SOUHRNNÁ DISKUZE

Empirické využívání divokých mikroorganismů a jejich metabolitů pro prodloužení údržnosti 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 screening 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). 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 matic a nápojů. Největší antimikrobiální aktivita byla pozorována u zkoumaných CFS bakterií schopných produkovat nisin, kmenů *Lc. 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 testované 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 CFS 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 *Lat. 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 *Lac. 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 *Lc. 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 *Lc. 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 CFS z laktokoků. Oproti tomu z 26 testovaných stafylokoků pouze 3 kmeny prokázaly citlivost vůči alespoň jednomu CFS z laktokoků, konkrétně vůči CFS z kmene *Lc. lactis* ssp. *lactis* CCDM 414 a z kmene CCDM 418. Oba CFS 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 *Lc. lactis* ssp. *lactis* biovar. *diacetylactis* CCDM 686 a CCDM 689, jejich supernatantů a komerčního nisinu na produkci tyraminu u *Lactilactobacillus 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 při této teplotě. 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 *L. 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 vyprodukováno 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 přidavek 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 přísadků protektivních kultur, jejich CFS a nisinu v různých časech kultivace BA-produkčních kmenů. Z dosažených výsledků je patrný vliv času přísadků 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 přísadky 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 matici.

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 tyrozin-dekarboxylázovou aktivitou.

Na základě získaných výsledků lze vyvodit tyto závěry:

- V případě testování antimikrobiální aktivity supernatantů z protektivních kultur byl největší inhibiční účinek pozorován u CFS z nisin-produkujících kmenů *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*, kdy 11 z 12 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.
- 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 CFS 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

zaočkování v prvních 4 časech aplikace, tzn. při teplotě kultivace 30 °C: přídatky v čase 0, 2, 5 a 9 h; při kultivaci v teplotě 12 °C: přídatky 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 přídatků nisinu.

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

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

- 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>
- 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>
- 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>
- 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>
- 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., 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.* 76, 6231–6238. <https://doi.org/10.1128/AEM.00827-10>
- 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>
- 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 Reggiano 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)
- 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)
- 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>
- 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, 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. 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>
- 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>
- 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>
- 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>
- 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>
- 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>
- 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*) filets 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>
- Chen, H. a D.G. Hoover, 2003. Bacteriocins and their food applications. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.*, roč. 2, s. 82–100.
- 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>
- 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.* 67, 1522–1528. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2002.tb10316.x>
- 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)
- 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>
- 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>
- 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)
- 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.* 11, 98–112. <https://doi.org/10.4236/fns.2020.112009>
- 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.* 157, 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.

- Martuscelli, M., Crudele, M.A., Gardini, F., Suzzi, G., 2000. Biogenic amine formation and oxidation by *Staphylococcus xylosum* strains from artisanal fermented sausages. *Lett. Appl. Microbiol.*, roč. 31, s. 228–232. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2000.00796.x>
- 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>
- 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>
- 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.
- 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>
- 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>
- 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., Wiriyaagulopas, 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>
- 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>
- 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>
- 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>
- 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>
- 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)
- 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.
- 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>
- 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>
- 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>

- 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>
- 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

<i>Obr. 1: Antimikrobiální působení nisinu na kmeny <i>Lat. curvatus</i> (T2, T3, T8, T15 a T36) a na kmeny <i>L. brevis</i> (RIBM 33, RIBM 50, RIBM 62, RIBM 67 a RIBM 68).</i>	21
<i>Obr. 2: Antimikrobiální působení nisinu na kmeny <i>L. brevis</i> (RIBM 69, RIBM 70, RIBM 72, RIBM 78, RIBM 93, RIBM 101 a RIBM 111) a <i>Lac. plantarum</i> (RIBM 89 a RIBM 96) a <i>Lc. casei/paracasei</i> (RIBM 113).</i>	22
<i>Obr. 3: Vývoj produkce TYM kmenem <i>Lac. plantarum</i> RIBM 89 v přítomnosti <i>Lc. lactis ssp. lactis</i> CCDM 686 a CCDM 689 při teplotě 30 °C (čas inokulace 0 h).....</i>	23
<i>Obr. 4: Vývoj produkce TYM kmenem <i>Lac. plantarum</i> RIBM 89 po přidavku CFS z <i>Lc. lactis ssp. lactis</i> CCDM 686 (CFS 686) a CFS z <i>Lc. lactis ssp. lactis</i> CCDM 689 (CFS 689) při teplotě 30 °C (čas inokulace 0 h).....</i>	24
<i>Obr. 5: Vývoj produkce TYM kmenem <i>Lac. plantarum</i> RIBM 89 v přítomnosti <i>Lc. lactis ssp. lactis</i> CCDM 686 a CCDM 689 při teplotě 12 °C (čas inokulace 0. den).....</i>	25
<i>Obr. 6: Vývoj produkce TYM kmenem <i>Lac. plantarum</i> RIBM 89 po přidavku CFS 686 a CFS 689 při teplotě 12 °C (čas inokulace 0. den).....</i>	26
<i>Obr. 7: Vývoj produkce TYM kmenem <i>Latilactobacillus curvatus</i> T3 v přítomnosti <i>Lc. lactis ssp. lactis</i> CCDM 686 a CCDM 689 a jejich supernatantů (CFS 686 a CFS 689) při teplotě 30 °C (čas inokulace 0 h).</i>	27
<i>Obr. 8: Růst kultury <i>Latilactobacillus curvatus</i> T3 v kultivačním médiu po aplikaci supernatantů kultury CCDM 686 a CCDM 689 v čase 0 h (teplota kultivace 30 °C)..</i>	27
<i>Obr. 9: Vývoj produkce TYM kmenem <i>Lat. curvatus</i> T3 v přítomnosti <i>Lc. lactis ssp. lactis</i> CCDM 686 a CCDM 689 a jejich supernatantů (CFS 686 a CFS 689) při teplotě 12 °C (čas inokulace 0. den).....</i>	28
<i>Obr. 10: Vliv nisinu na produkci TYM kmenem <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> RIBM 89 při teplotě 30 °C (čas aplikace 0 h).....</i>	29
<i>Obr. 11: Vliv nisinu na růst kmene <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> RIBM 89 při teplotě 30 °C (čas aplikace 0 h).</i>	30
<i>Obr. 12: Vliv nisinu na produkci tyraminu kmenem <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> RIBM 89 při teplotě 12 °C (čas aplikace 0. den).</i>	31
<i>Obr. 13: Vliv nisinu na produkci tyraminu kmenem <i>Latilactobacillus curvatus</i> T3 při teplotě 30 °C (čas aplikace 0 h).</i>	32
<i>Obr. 14: Vliv nisinu na růst kmene <i>Lat. curvatus</i> T3 při teplotě 30 °C (čas aplikace 0 h).</i>	33
<i>Obr. 15: Vliv nisinu na produkci tyraminu kmenem <i>Latilactobacillus curvatus</i> T3 při teplotě 12 °C (čas aplikace 0. den).....</i>	34

Seznam tabulek

<i>Tab. 1 – Inhibiční účinek CFS z kmenů <i>Lc. lactis ssp. lactis</i> CCDM 686 a CCDM 689 na kmeny BMK [údaje jsou vyjádřeny jako průměry inhibičních zón v mm ze dvou měření ± SD včetně velikosti jamky o průměru 6,5 mm]</i>	19
--	----

10. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AMK	Aminokyseliny
ATP	Adenosintrifosfát
BA	Biogenní aminy
BIOHAZ	Vědecký panel pro biologická rizika
BLIS	Látky podobné bakteriocinům
BMK	Bakterie mléčného kvašení
CCDM	Cultures Collection of Dairy Microorganisms
CFS	Bezbuňečný supernatant
EFSA	Evropský úřad pro bezpečnost potravin
FDA	Úřad pro kontrolu potravin a léčiv
GRAS	Všeobecně považovaný za bezpečný
HIM	Histamin
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie
MAO	Monoaminoxidáza
MAOI	Inhibitory enzymu monoaminoxidáza
MH	Mueller-Hinton agar/bujón
MRS	De Man, Rogosa a Sharpe agar/bujón
PHE	2-fenyletylamin
PLP	Pyridoxal-5-fosfát
PMF	Proton motive force
TDC	Tyrozindekarboxyláza
TRM	Tryptamin
TYM	Tyramin

11. CURRICULUM VITAE

OSOBNÍ ÚDAJE

Jméno a příjmení: Khatantuul Purevdorj
Email: purevdorj@utb.cz

PRACOVNÍ ZKUŠENOSTI

2018–dosud Akademičtý pracovník na Ústavu inženýrství ochrany životního prostředí, Fakulta technologická, UTB ve Zlíně

2017–2018 Lektor kroužku Věda nás baví

06–08/2017 Dvuměsíční pracovní stáž – Polytechnic Institute of Beja, Portugalsko, téma: Characterization of different kefir product's micro-biotype.

09–11/2016 Dvuměsíční 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>. (IF₂₀₁₉ = 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>. (IF₂₀₁₉ = 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>. (IF₂₀₁₉ = 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). (IF₂₀₁₉ = 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, Tatranské Matliare, Slovensko, 2019, 131 s. ISBN 978-80-973411-0-7.

BUŇKOVÁ, L., **K. PUREVDORJ**, Š. BENEŠ, L. BERČÍKOVÁ, A. DLABAJOVÁ, P. PLEVA a F. BUŇKA. *Potravinářsky významné mikroorganizmy a jejich schopnost degradace biogenních aminů*. In: Sborník 28. kongres Československej spoločnosti mikrobiologickej, Tatranské Matliare, Slovensko, 2019, 131 s. ISBN 978-80-973411-0-7.

Ing. Khatantuul Purevdorj, Ph.D.

**Možnosti redukce biogenních aminů produkovaných
mikroorganismy**

Strategies to reduce biogenic amines produced by microorganisms

Teze disertační práce

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

Náklad: vyšlo elektronicky

Sazba: autor

Publikace neprošla jazykovou ani redakční úpravou.

Rok vydání 2021

Pořadí vydání: první

ISBN 978-80-7678-016-3

