

# **Dekarboxylázová aktivita bakterií izolovaných z přírodních sýrů**

Gabriela Mantlová

---

Bakalářská práce  
2010



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická

---

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická  
Ústav technologie a mikrobiologie potravin  
akademický rok: 2009/2010

## ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Gabriela MANTLOVÁ**  
Osobní číslo: **T07106**  
Studijní program: **B 2901 Chemie a technologie potravin**  
Studijní obor: **Chemie a technologie potravin**

Téma práce: **Dekarboxylázová aktivita bakterií izolovaných z přírodních sýrů**

Zásady pro vypracování:

1. Běžná mikroflóra sýra a možné kontaminace.
2. Bakterie mléčného kvašení.
3. Dekarboxylázová aktivita mikroorganismů.
4. Z přírodních sýrů izolujte, identifikujte a určete jejich dekarboxylázovou aktivitu.
5. Na základě zjištěných výsledků formulujte závěry.

Rozsah bakalářské práce:

Rozsah příloh:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná/elektronická**

Seznam odborné literatury:

[1] SEDLÁČEK, Ivo. Taxonomie prokaryot. 1. vyd. Brno : Masarykova univerzita, 2007. 270 s. ISBN 978-80-210-4207-0.

[2] ČERMÍNOVÁ, Nadě, et al. Čisté mlékařské kultury : výroba, kontrola, použití . 1. vyd. Praha : SNTL, 1984. 295 s.

[3] GÖRNER, FRIDRICH. Aplikovaná mikrobiológia požívatin : princípy mikrobiológie požívatin, potravinársky významné mikroorganizmy a ich skupiny, mikrobiológia potravinárskych výrob, ochorenia mikrobiálneho povodu, ktorých zárodky sú prenášané požívatinami. 1. vyd. Bratislava : Malé centrum, 2004. 528 s. ISBN 8096706497.

[4] Fox, Patrick F. Cheese chemistry, physics, and microbiology. 3rd edition. San Diego : Academic, 2004. 2 sv. ISBN 012263652X.

Vedoucí bakalářské práce:

**RNDr. Leona Buňková, Ph.D.**

Ústav technologie tuků, tenzidů a kosmetiky

Datum zadání bakalářské práce:

**11. února 2010**

Termín odevzdání bakalářské práce:

**31. května 2010**

Ve Zlíně dne 15. dubna 2010

doc. Ing. Petr Hlaváček, CSc.  
*děkan*



doc. Ing. Jan Hrabě, Ph.D.  
*ředitel ústavu*

## ABSTRAKT

Cílem této bakalářské práce bylo identifikovat mikrobiální původce biogenních aminů ve čtyřech vrstvách holandského sýra typu (Eidamská cihla). Pro identifikaci izolovaných bakterií byla použita fenotypová metoda a PCR metoda. Jako hlavní původci testovaných biogenních aminů v analyzovaných sýrech byli detekováni non-startertérové bakterie mléčného kvašení *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus*, komplex *Lactobacillus casei/paracasei* a *Lactobacillus plantarum*. U starterových bakterií *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* a *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* nebyla dekarboxylázová aktivita detekována.

Klíčová slova: sýr, biogenní aminy, bakterie mléčného kvašení, non-startérové bakterie mléčného kvašení, fenotypová charakteristika

## ABSTRACT

The aim of this work was to identify a microbial sources of biogenic amines in 4 layers of Dutch-type cheese (Edam cheese). For identification precursors of biogenic amines were used fenotyping analysis and the PCR fingerprinting. Within the cheeses analysed, non-starter lactic acid bacteria *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus casei/paracasei* and *Lactobacillus plantarum* were detected as the main producers of the biogenic amines tested. In starter bacteria *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* and *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* the decarboxylase activity tested was not detected.

Keywords:cheese, biogenic amines, lactic acid bacteria, non-starter lactic acid bacteria, phenotype characterization

## Poděkování

Ráda bych poděkovala vedoucí své bakalářské práce RNDr. Leoně Buňkové, Ph.D. za čas který mi věnovala, za trpělivost, cenné rady, připomínky, poskytnuté materiály a doporučené knihy pro zpracování mé práce a za metodické vedení praktické i teoretické části práce. Také bych chtěla poděkovat doc. Ing. Františku Buňkovi, Ph.D. za vedení a pomoc při práci na praktické části v laboratořích. A pracovníkům České sbírky mikroorganismů za pomoc při identifikaci mikroorganismů.

Příjmení a jméno: .....

Obor: .....

## PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

- beru na vědomí, že odevzdáním diplomové/bakalářské práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, bez ohledu na výsledek obhajoby <sup>1)</sup>;
- beru na vědomí, že diplomová/bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému dostupná k nahlédnutí, že jeden výtisk diplomové/bakalářské práce bude uložen na příslušném ústavu Fakulty technologické UTB ve Zlíně a jeden výtisk bude uložen u vedoucího práce;
- byl/a jsem seznámen/a s tím, že na moji diplomovou/bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3 <sup>2)</sup>;
- beru na vědomí, že podle § 60 <sup>3)</sup> odst. 1 autorského zákona má UTB ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- beru na vědomí, že podle § 60 <sup>3)</sup> odst. 2 a 3 mohu užít své dílo – diplomovou/bakalářskou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- beru na vědomí, že pokud bylo k vypracování diplomové/bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tedy pouze k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové/bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- beru na vědomí, že pokud je výstupem diplomové/bakalářské práce jakýkoliv softwarový produkt, považují se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Ve Zlíně .....

.....

---

(3) <sup>1)</sup> zákon č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, § 47 Zveřejňování závěrečných prací:

(1) Vysoká škola nevydělečně zveřejňuje disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce, u kterých proběhla obhajoba, včetně posudků oponentů a výsledku obhajoby prostřednictvím databáze kvalifikačních prací, kterou spravuje. Způsob zveřejnění stanoví vnitřní předpis vysoké školy.

(2) Disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce odevzdané uchazečem k obhajobě musí být též nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněny k nahlížení veřejnosti v místě určeném vnitřním předpisem vysoké školy nebo není-li tak určeno, v místě pracoviště vysoké školy, kde se má konat obhajoba práce. Každý si může ze zveřejněné práce pořizovat na své náklady výpisy, opisy nebo rozmnoženiny.

(3) Platí, že odevzdáním práce autor souhlasí se zveřejněním své práce podle tohoto zákona, bez ohledu na výsledek obhajoby.

(4) <sup>2)</sup> zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 35 odst. 3:

(5) Do práva autorského také nezasahuje škola nebo školské či vzdělávací zařízení, užije-li nikoli za účelem přímého nebo nepřímého hospodářského nebo obchodního prospěchu k výuce nebo k vlastní potřebě dílo vytvořené žákem nebo studentem ke splnění školních nebo studijních povinností vyplývajících z jeho právního vztahu ke škole nebo školskému či vzdělávacímu zařízení (školní dílo).

(6) <sup>3)</sup> zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 60 Školní dílo:

(1) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení mají za obvyklých podmínek právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla (§ 35 odst. 3). Odpírá-li autor takového díla udělit svolení bez vážného důvodu, mohou se tyto osoby domáhat nahrazení chybějícího projevu jeho vůle u soudu. Ustanovení § 35 odst. 3 zůstává nedotčeno.

(2) Není-li sjednáno jinak, může autor školního díla své dílo užít či poskytnout jinému licenci, není-li to v rozporu s oprávněnými zájmy školy nebo školského či vzdělávacího zařízení.

(3) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení jsou oprávněny požadovat, aby jim autor školního díla z výdělku jím dosaženého v souvislosti s užitím díla či poskytnutím licence podle odstavce 2 přiměřeně přispěl na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložily, a to podle okolností až do jejich skutečné výše; přitom se přihlédne k výši výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

# OBSAH

ÚVOD.....	5
<b>I TEORETICKÁ ČÁST .....</b>	<b>6</b>
<b>1 SÝRY .....</b>	<b>7</b>
1.1 VÝROBA TVRDÝCH SÝRŮ S NÍZKODOHŘÍVANOU SÝŘENINOU.....	7
1.2 VYUŽÍVANÉ BAKTERIÁLNÍ KULTURY K VÝROBĚ SÝRŮ HOLANDSKÉHO TYPU.....	9
1.2.1 Fermentace sacharidů.....	9
1.2.2 Fermentace bílkovin.....	10
1.3 FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ VÝSLEDNÉ VLASTNOSTI SÝRŮ.....	11
1.4 CHYBY SÝRŮ ZPŮSOBENÉ MIKROORGANISMY .....	12
1.4.1 Plísně jako možné příčiny chyb sýrů .....	13
1.4.2 Kvasinky jako možné příčiny mikrobiálních chyb .....	14
1.4.3 Nežádoucí tvorba plynu v sýrech.....	14
1.4.4 Chyby barvy sýrů .....	16
<b>2 MLÉČNÉ KVAŠENÍ .....</b>	<b>17</b>
2.1 KVAŠENÍ HOMOFERMENTATIVNÍ .....	18
2.2 KVAŠENÍ HETEROFERMENTATIVNÍ .....	18
2.3 MLÉČNÉ KVAŠENÍ USKUTEČŇOVANÉ DRUHEM <i>BIFIDOBACTERIUM BIFIDUM</i> .....	21
<b>3 BAKTERIE MLÉČNÉHO KVAŠENÍ.....</b>	<b>22</b>
3.1 TAXONOMIE .....	22
3.2 ŘÁD <i>LACTOBACILLALES</i> .....	22
3.2.1 Čeleď <i>Lactobacillaceae</i> .....	22
3.2.1.1 Rod <i>Lactobacillus</i> .....	22
3.2.1.2 Rod <i>Pediococcus</i> .....	24
3.2.2 Čeleď <i>Aerococcaceae</i> .....	24
3.2.2.1 Rod <i>Aerococcus</i> .....	25
3.2.3 Čeleď <i>Carnobacteriaceae</i> .....	25
3.2.3.1 Rod <i>Carnobacterium</i> .....	25
3.2.4 Čeleď <i>Enterococcaceae</i> .....	25
3.2.4.1 Rod <i>Enterococcus</i> .....	26
3.2.4.2 Rod <i>Tetragenococcus</i> .....	26
3.2.4.3 Rod <i>Vagococcus</i> .....	26
3.2.5 Čeleď <i>Leuconostocaceae</i> .....	27
3.2.5.1 Rod <i>Leuconostoc</i> .....	27
3.2.5.2 Rod <i>Oenococcus</i> .....	27
3.2.5.3 Rod <i>Weissella</i> .....	28
3.2.6 Čeleď <i>Streptococaceae</i> .....	28
3.2.6.1 Rod <i>Streptococcus</i> .....	28
3.2.6.2 Rod <i>Lactococcus</i> .....	29
3.3 ŘÁD <i>ACTINOMYCETALES</i> .....	30
3.3.1 Čeleď <i>Bifidobacteriaceae</i> .....	30
3.3.1.1 Rod <i>Bifidobacterium</i> .....	30
<b>4 ČISTÉ MLÉKAŘSKÉ KULTURY .....</b>	<b>31</b>



4.1	VÝZNAM ČISTÝCH MLÉKAŘSKÝCH KULTUR.....	31
4.2	STARTÉROVÉ BAKTERIE .....	31
4.3	NON-STARTÉRY .....	32
<b>5</b>	<b>DEKARBOXYLÁZOVÁ AKTIVITA MIKROORGANISMŮ .....</b>	<b>33</b>
5.1	VZNIK HISTAMINU .....	34
5.2	VZNIK TYRAMINU.....	34
5.3	VZNIK KADAVERINU.....	34
5.4	VZNIK PUTRESCINU .....	35
<b>II</b>	<b>PRAKTICKÁ ČÁST .....</b>	<b>36</b>
<b>6</b>	<b>CÍLE PRÁCE .....</b>	<b>37</b>
<b>7</b>	<b>MATERIÁL A METODIKA .....</b>	<b>38</b>
7.1	VZORKY .....	38
7.2	KULTIVAČNÍ PŮDY .....	38
7.3	VLASTNÍ STANOVENÍ – MIKROBIOLOGICKÁ ANALÝZA.....	40
7.3.1	Barvení podle Grama .....	41
7.3.2	Tvorba katalasy .....	41
7.3.3	Detekce produkce biogenních aminů .....	41
7.3.4	Biochemické testy API 50 CH .....	42
7.3.5	Identifikace metodou rep-PCR.....	43
7.4	CHROMATOGRAFICKÁ DETEKCE BIOGENNÍCH AMINŮ .....	44
<b>8</b>	<b>VÝSLEDKY A DISKUZE .....</b>	<b>45</b>
8.1	STANOVENÍ POČTU BAKTERIÍ.....	45
8.2	IDENTIFIKACE BAKTERIÍ .....	46
8.3	DETEKCE PRODUKCE BIOGENNÍCH AMINŮ .....	48
<b>9</b>	<b>SOUHRNNÁ DISKUZE .....</b>	<b>50</b>
	<b>ZÁVĚR .....</b>	<b>52</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....</b>	<b>53</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK .....</b>	<b>58</b>
	<b>SEZNAM OBRÁZKŮ .....</b>	<b>59</b>
	<b>SEZNAM TABULEK.....</b>	<b>60</b>
	<b>SEZNAM PŘÍLOH.....</b>	<b>61</b>

## ÚVOD

Mikroorganismy svou činností ovlivňují mimo jiné i zdravotní nezávadnost potravin. Jejich činností mohou ve fermentovaných potravinách vznikat biogenní aminy. Biogenní aminy jsou nízkomolekulární dusíkaté látky s biologickou aktivitou, která se uplatňuje v lidském metabolismu.

Přirozeně se biogenní aminy vyskytují ve fermentovaných potravinách, kde k jejich produkci přispívají startérové i non-startérové bakterie.

Biogenní aminy mají v metabolismu člověka významné fyziologické funkce, ale při příjmu potravin s nadměrnou koncentrací těchto látek může u citlivých jedinců dojít k alimentární intoxikaci. Stanovení hranice toxicity biogenních aminů pro lidský organismus je těžké, protože závisí na mnoha faktorech jako je například schopnost organismu tyto látky detoxikovat.

Pro vznik biogenních aminů je nutný obsah volných aminokyselin, přítomnost bakterií tvořících enzym dekarboxylasu a vhodné podmínky pro rozvoj těchto bakterií. Sýry eidamského typu, na které je tato práce zaměřena, všechny výše zmíněné podmínky splňují.

Sýry mohou obsahovat řádově jednotky až stovky miligramů biogenních aminů. Množství je mimo jiné závislé také na použití startérových bakterií mléčného kvašení a možné přítomnosti non-startérových bakterií mléčného kvašení.

## I. TEORETICKÁ ČÁST

## 1 SÝRY

Sýry představují tradiční produkty, které člověk poznal již před 8000 lety [1]. Sýr je mléčný výrobek vyrobený srážením mléčné bílkoviny z mléka působením syřidla nebo jiných koagulačních činidel, prokysáním a oddělením podílu syrovátky. Patří k nejhodnotnějším potravinám z pohledu svého složení. Z nutričního hlediska jsou sýry plnohodnotné výrobky obsahující všechny esenciální aminokyseliny [2]. Sýry tedy v sobě koncentrují základní složky sušiny mléka, především kasein a mléčný tuk [1].

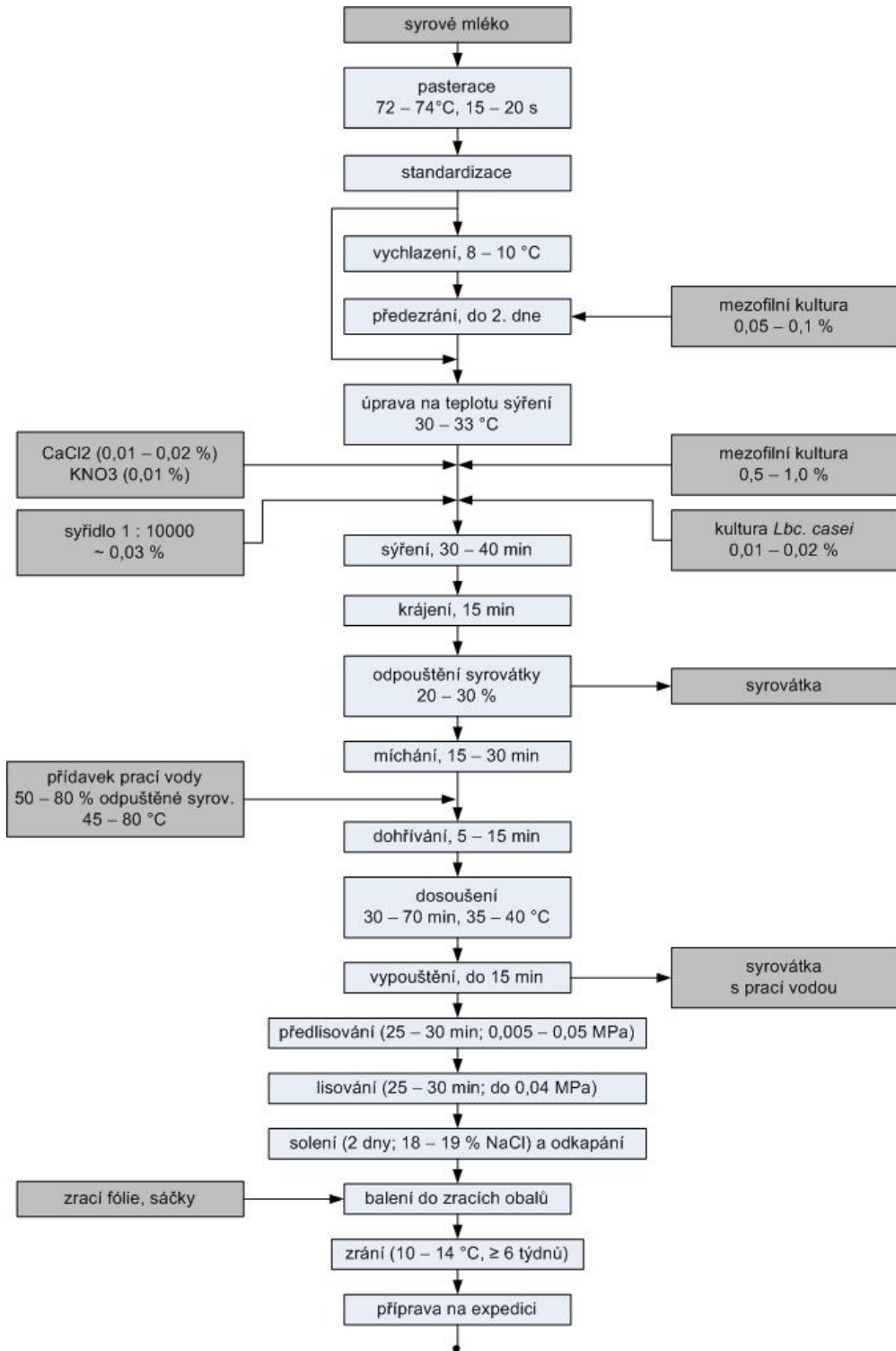
Při zrání sýrů se účastní vhodné bakterie, plísně a kvasinky a složky syřidla, které způsobují pro ten který druh sýra charakteristické mikrobiologické, chemické a fyzikální změny jejich složek [3].

### 1.1 Výroba tvrdých sýrů s nízkodohřívanou sýřeninou

Mezi sýry s nízkodohřívanou sýřeninou patří sýry eidamského typu, které jsou původem z Holandska [1]. Pro poměrně jednoduché technologie jsou vyráběné na celém světě [3]. Typické pro tuto skupinu sýrů je dohřívání a dosušení sýřeniny při teplotě 34 – 42 °C [1].

Výroba sýrů je poměrně složitý proces, který zahrnuje řadu kroků a biochemických přeměn. Ke koagulaci dochází působením enzymového preparátu nebo v důsledku změny pH do oblasti blízké izoelektrickému bodu kaseinu, často jde o kombinaci obou postupů [1].

Sýry jsou vyráběny ve tvaru bochníku, cihly, koule, salámu nebo bloku, obvykle s obsahem sušiny 43 – 60 %, obsahem tuku v sušině 20 – 60 % a obsahem soli 1,5 – 3,5 %. Konzistence sýrů je měkká, pružná, celistvá a soudržná. Zrání probíhá po dobu 4 – 8 týdnů při teplotách 6 – 12 °C a při relativní vlhkosti vzduchu kolem 80 %. Pokud sýry zrají v obalech z plastických hmot, není nutné sýry ošetřovat ani obracet, kontroluje se pouze průběh zrání jejich zrání [2].



Obr. 1: Schéma výroby sýrů eidamského typu [1]

## 1.2 Využívané bakteriální kultury k výrobě sýrů holandského typu

Při výrobě sýrů holandského typu se uplatňují zejména kultury mezofilních bakterií mléčného kvašení *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*, *Lc. lactis* ssp. *cremoris* a *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *cremoris*. Poslední dva druhy fermentují i citran za vzniku kyseliny octové, diacetylu a CO<sub>2</sub>. V některých sýrárnách přidávají do mléka i kulturu mezofilního laktobacila *Lactobacillus casei*, který má svou výraznější proteolytickou aktivitou urychlit jejich zrání [3].

Rozmnožování a primární metabolismus bakterií mléčného kvašení je velmi rychlý a je ukončený za 5 až 6 hodin po přidání zákysové kultury do sýrařského mléka. Za tu dobu se uskuteční 4 až 5 dělení buněk a zfermentuje se asi 50 % laktosy přítomné v mléce, další fermentace probíhá i po dobu solení zformované sýřeniny. Aromatvorné bakterie zfermentují za 24 hodin asi 80 % citranu, což přispívá k optimální tvorbě ok. Na řezu sýru holandské cihly bývá optimálně 5 až 6 ok velikosti hrášku [3, 43].

Zrání probíhá 6 až 8 týdnů. Na začátku zrání probíhá současně i solení sýrů. Po něm mladé sýry zrají asi týden při asi 12 °C a další 2 až 3 týdny při vyšší teplotě 18 °C a zbytek času dozrávají při nižší teplotě. Jednotliví sýraři si tyto časy a teploty podle nabytých zkušeností upravují do jisté míry individuálně [3, 43].

### 1.2.1 Fermentace sacharidů

Fermentační aktivita zákysových bakteriálních kultur mléčného kvašení se uplatňuje zejména ve dvou směrech: fermentace laktosy a citranu a fermentace bílkovin [3].

Fermentace sacharidů mezofilními zákysovémi bakteriemi mléčného kvašení ukazuje tabulka 1. Fermentace laktosy a produkty její látkové přeměny mají vliv na chuť, konzistenci, trvanlivost, barvu, obsah vody a tvorbu kůry sýrů. Fermentace citranu na kyselinu octovou a diacetyl působí na tvorbu chuti, a je současně jedním z faktorů tvorby ok v sýrovém těstě produkcí CO<sub>2</sub> [3].

Fermentace sacharidů se uskutečňuje bakteriemi mezofilních zákyků, zejména jejich kyselinotvornými a aromatvornými druhy a kmeny *Lactococcus lactis* a *Lc. lactis* ssp. *cremoris*. Jde o homofermentativní bakterie, a proto tvoří z laktosy prakticky jen kyselinu mléčnou. *Lc. lactis* biovar *diacetylactis* je také homofermentativní bakterie mléčného kvašení, ale má navíc vlastnost, že fermentuje citran na kyselinu octovou a diacetyl, který ve významné míře určuje chuť mladých sýrů holandského typu. Aromatvorný

*Leuconostoc mesenteroides* ssp. *cremoris* je heterofermentativní a produkuje z laktosy vedle kyseliny mléčné i malé množství etanolu a oxidu uhličitého a z citranu tvoří taktéž CO<sub>2</sub>, kyselinu octovou a diacetyl [3, 42, 43].

Tab. 1: Fermentace sacharidů mléka bakteriemi mezofilních zákysů při výrobě sýrů s nízkodohřívanou sýřeninou [3]

Mezofilní zákysové bakterie	Průběh fermentace
<i>Lactococcus lactis</i>	Laktóza → kyselina mléčná
<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>cremoris</i>	
<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> biovar <i>diacetylactis</i>	
<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> biovar <i>diacetylactis</i>	Citran → CO <sub>2</sub> + kyselina octová + diacetyl
<i>Leuconostoc</i> ssp.	Citran → CO <sub>2</sub> + kyselina octová + diacetyl
	Laktóza → CO <sub>2</sub> + kyselina mléčná + ethanol

*Lc. lactis* biovar *diacetylactis* tvoří někdy z aminokyseliny treoninu acetaldehyd. V zákysech mezofilních bakterií mléčného kvašení není acetaldehyd vítaný, protože způsobuje jim nepřírozenou jogurtovou chuť. *Ln. mesenteroides* ssp. *cremoris*, který je složkou aromatické skupiny bakterií mezofilního zákysu pro výrobu sýrů holandského typu, má i tu přirozenou vlastnost, že vzniklý acetaldehyd rozkládá, čím tuto chybu zákysu eliminuje [3].

### 1.2.2 Fermentace bílkovin

Štěpení bílkovin a další přeměny štěpných produktů probíhají po dobu zrání sýrů. Fermentace bílkovin má významný vliv na tvorbu chutnosti sýra, na jejich konzistenci, na snížení vodní aktivity, jako i na barvu starších sýrů [3, 43].

Bílkoviny jsou štěpené proteolytickými enzymy bakterií mléčného kvašení, ale také proteolytickými enzymy syřidla [3].

Primární proteolýza probíhá působením syřidlového enzymu chymozinu, přičemž z molekuly  $\alpha_{s1}$ -kaseinu vznikají velké peptidy  $\alpha_{s1}$ -SN. Sekundární proteolýza na malé peptidy probíhá působením proteináz buněčné stěny laktokoků. Malé peptidy jsou dále štěpené na aminokyseliny peptidázami a spolu s aminokyselinami určují ve významné míře chuť sýrů [3].

Celý proces lze znázornit rovnicí:

$\alpha_{s1}$ -kasein  $\rightarrow$  (chymozin)  $\rightarrow$   $\alpha_{s1}$ -SN  $\rightarrow$  (proteinázy buněčných stěn)  $\rightarrow$   $\alpha_{s1}$ -SN  $\rightarrow$  (peptidázy)  $\rightarrow$  aminokyseliny [3].

### 1.3 Faktory ovlivňující výsledné vlastnosti sýrů

Na trvanlivost sýrů působí pozitivně snížená hodnota pH, obsah kyseliny mléčné a tvorba bakteriocinů. Rychlost kvašení sýřeniny musí být vzhledem k průběhu zrání a na jakost vyrobených sýrů optimální. Určuje dosažení nejvhodnější hodnoty pH, od které závisí optimální obsah vody v mladém sýru a tento určuje spolu s teplotou dohřívání a dosušování sýřeniny, obsahem soli v sýru a s proteolytickou aktivitou zákysu konečné vlastnosti sýrů. Tyto faktory nepůsobí izolovaně, ale navzájem se ovlivňují [3].

Rychlost kvašení sýřeniny se reguluje aktivitou a množstvím zákysu přidaného do mléka. V optimálním případě má kyselost sýřeniny dosáhnout za 4 hodiny hodnotu pH = 5,8. V této fázi probíhá kvašení nejintenzivněji. Podle aktivity zákysu se přidává 0,4 až 0,75 % zákysu. Pro urychlení proteolýzy se může přidat i 0,01 až 0,02 % kultury *Lactobacillus casei* [3].

Při optimální rychlosti kvašení se dosáhne hodnota pH 5,8 za 4 hodiny a obsah volné vody v sýřenině má za 5,5 hodiny dosáhnout asi 46 %. Při zvýšeném obsahu vody v sýřenině je sýr náchylný na vznik chyb, jako jsou kyselá, hořká nebo slaná chuť a měkká až lepkavá konzistence, vznik trhlin v těstě a nehladký povrch. Naopak sýr se sníženým obsahem vody před jeho solením je náchylný na vznik nevýrazné až nasládlé chuti, vazké až suché konzistence a suché kůry [3].

Aktivitu zákysových bakterií velmi ovlivňuje teplota dohřívání a dosoušení sýřeniny. Optimální růstová teplota mezofilních bakterií je mezi 28 až 32 °C. Teplota dohřívání a dosoušení zrna však bývá 36 až 40 °C a působí podle rychlosti vytužování zrna půl až jednu hodinu. Růst mezofilních zákysových bakterií je už při 35 °C zpomalen. Teplota dosoušení je jedním z nejdůležitějších činitelů, které určují poměr mezi streptokoky a laktobacily. Pokud v holandských sýrech probíhá zrání převážně působením laktobacilů a ne mezofilních streptokoků, nedosáhne sýr typickou chuť a konzistenci. Aktivita mezofilních zákysových bakterií, čili maximální tvorba kyselosti sýřeniny se dosahuje při teplotách 36 až 40 °C. Tato skutečnost kvašení při dosoušení zrna významně neovlivňuje nebo



koliduje s omezeným růstem zákysových bakterií, a proto je možné očekávat, že kvašení se při 36 °C a vyšších teplotách zpomaluje [3].

Mezofilní zákysové bakterie mléčného kvašení nesnáší v prostředí vyšší koncentrace soli, a tím vyšší hodnoty  $a_w$ . Přitom úměrně s difúzí soli ze slané koupele do zformovaného sýra klesá aktivita zákysových bakterií [3].

V místech sýrů s dočasně vyšším obsahem soli (v povrchových vrstvách sýra stýkajících se s slanou koupelí) se fermentace zastaví úplně. Proto je důležité, aby se sýry nevkládaly do solné koupele předčasně, dokud je v nich ještě významnější množství laktosy. Zbytkový obsah laktosy v kůře sýra může způsobit jejich chyby [3].

Faktory jako teplota a obsah soli, mají vliv i na proteolytickou činnost zákysových bakterií. Zvýšená teplota, zvýšená hodnota pH a nízký obsah soli stimulují zrací pochody. U těchto faktorů však není možné větší variabilita, protože mají vliv i na konzistenci a možné pozdní nadouvání vlivem klostridií [3].

#### 1.4 Chyby sýrů způsobené mikroorganismy

Při výrobě sýrů se může vyskytnout řada chyb. Tyto chyby mohou být technologické, fyzikální (mechanické) a nebo biologické, přesněji mikrobiální příčiny [3].

Chyby sýrů mohou být způsobené:

- plísněmi,
- kvasinkami,
- nežádoucí tvorbou plynu,
- nežádoucí barvou sýra [3].

Pokud jsou chyby zapříčiněny mikroorganismy, je třeba najít jejich zdroj a v zásadě uplatňovat následující opatření:

- Vyloučit nežádoucí mikroorganismy z mléka dodržováním hygienických podmínek a hygienického prostředí při jeho získávání, rychlým a účinným chlazením mléka po jeho nadojení nebo zkrácením času mezi nadojením mléka a jeho zpracováním na sýry.
- Pokud se nepředpokládá výroba sýrů ze syrového mléka, zabezpečit jeho účinnou pasteraci.

- Zabránit dekontaminaci pasterovaného mléka a vytvořit hygienické podmínky a stav při výrobě sýrů podle požadavků správné výrobní a hygienické praxe.
- Při výrobě sýrů zabezpečit také podmínky, které zaručí optimální množení a metabolismus požadovaných kultur a zabránit rozmnožování a metabolismu nežádoucích mikroorganismů dodržováním přiměřených teplot, požadovaných hodnot pH, správného obsahu soli, zabezpečení fermentace veškeré laktosy v mladých sýrech za vhodnou dobu.
- Realizovat účinné sanitační opatření výrobního nářadí a zařízení a účinné preventivní ovládání nebezpečí systému HACCP [3].

Mnohé bakterie mohou tvořit biofilm. Jde o bakterie se schopností přilnout na vlhkém a hydrofobním povrchu nářadí a zařízení. Přítomnost biofilmů na kontaktním povrchu technologických celků v zemědělské prvovýrobě i mlékárenském průmyslu představuje prokazatelné zdravotní riziko. Důvodem je skutečnost, že vedle zdravotně nevýznamných mohou obsahovat i patogenní mikroorganismy, které mohou sekundárně kontaminovat produkované výrobky [38]. Svou biochemickou činností vytvářejí organické polymery, ve kterých mohou vegetovat další žádoucí nebo nežádoucí mikroorganismy. Při sanitaci se musí dbát především na účinné rozrušení a odstranění biofilmu z příslušného povrchu mechanickými a chemickými procesy [3].

#### 1.4.1 Plísně jako možné příčiny chyb sýrů

Vzdušné plísně či jejich spory jsou na prachových částicích vzduchu všudypřítomné. Na klíčení a růst má vliv kromě vlhkosti i vzdušný kyslík a dostupné živiny. S prachovými částicemi a s vodnými kapičkami, které jim slouží jako vektor přenosu, se šíří v prostředí. Ve vlhkých místech a na vlhkých stěnách, kterých je v mlékárně dostatek, se usazují. Pokud se závčas vhodnými postupy neodstraní, jejich spory se dostávají na sýry a za nepříznivých podmínek mohou způsobit plesnivění jejich povrchu. V současnosti sýry, které pro své zrání nepotřebují kyslík, se po solení a osušení balí do fólií a nebo se potahují látkami, které na nich vytvoří částečně nepropustný povlak. Tyto fólie nebo povlaky zabraňují plesnivění nebo je růst plísní limitován přístupem vzdušného kyslíku. Panuje názor, že nejčastěji se na povrchu sýrů vyskytují kontaminující plísně *Penicillium*. *Penicillium commune* má být v tomto směru nejrozšířenější mikromycetou. Z ovzduší sýrárny se nejčastěji izolovali a identifikovali *Penicillium* sp. a *Aspergillus* sp [3, 37].

Na ošetření povrchu sýra se jako konzervační látky používají sorban draselný a natamycin. Rezistentní kmeny rodu *Penicillium* metabolizují natamycin za vzniku 1,3-pentadienu, který u sýru způsobuje petrolejový zápach [3].

#### 1.4.2 Kvasinky jako možné příčiny mikrobiálních chyb

Zjištění nežádoucích kvasinek na povrchu zrajících sýrů je poměrně jednoduché. Přispívá k tomu jejich výrazná metabolická aktivita typická tvorbou CO<sub>2</sub> a alkoholu. Kvasinky mají i lipolytické vlastnosti, hydrolýzou tuku uvolňují mastné kyseliny a mohou způsobit žluklou chuť. Výskyt kontaminujících kvasinek na povrchu sýra bývá provázen osliznutím. K této chybě se může přidružit hniloba způsobená proteolytickými bakteriemi z rodu *Pseudomonas* [3].

Hlavní příčinou výskytu kontaminujících kvasinek a jiných mikroorganismů na povrchu sýru je nepřiměřená vlhkost jejich povrchu. Tento způsob může nastat z více příčin. Při zrání sýrů probíhá proteolýza bílkovin, přičemž se může ze sýra uvolnit voda původních bílkovin. Z teplotních příčin může docházet u sýrů i k jejich pocení. Na povrchu vzniká vlhkost, která není čistou vodou, ale obsahuje řadu živin pro mikroorganismy rozpustné peptidy, aminokyseliny, minerální látky. Pokud se toto nahromadí mezi povrchem sýra a jeho obalový materiál, vzniká ideální prostředí pro růst kontaminujících mikroorganismů, mezi jinými i kvasinek [3].

Významným zdrojem kontaminujících kvasinek jsou solné koupele. Nejčastěji bývají izolované kvasinky *Candida* spp., *Yarrowia lipolytica*, *Kluyveromyces marxianus*, *Geotrichum candidum*, *Debaromyces hansenii* a *Pichia* spp. [3].

#### 1.4.3 Nežádoucí tvorba plynu v sýrech

U tvrdých a polotvrdých sýrů s tvorbou ok v těstě se záměrně vytvářejí podmínky na jejich vznik pomocí bakteriálních kultur propionového kvašení a heterofermentativních mezofilních bakterií mléčného kvašení. Naproti tomu někdy vznikají u tvrdých a polotvrdých sýrů nežádoucí oka nebo trhliny způsobené kontaminujícími aerobními bakteriemi. V tomto případě se rozeznává nejčastěji tzv. včasné a pozdní nadouvání sýrů [3].

Včasné nadouvání sýrů s nízkodohříváním sýřeninou způsobují nejčastěji fakultativně anaerobní bakterie ze skupiny koliformních, *Enterobacter aerogenes* a *Escherichia coli*. Jde o bakterie, které se sekundárně nacházejí ve vnějším prostředí a považují se mezi jinými za indikátory správně vykonané sanitace potravinářského nářadí a zařízení [3, 37].

Tyto bakterie se v mléce dobře rozmnožují za fermentace laktosy jako dostupného zdroje energie a uhlíku na kyselinu mléčnou, plyny, oxid uhličitý a vodík. Pokud použitý zákys nebyl dostatečně aktivní a v mléce bylo větší počáteční množství plynotvorných bakterií ze skupiny koliformních a mladý sýr pomalu kysne, mohou se v něm množit plynotvorné bakterie a způsobit v něm včasné nadouvání [3].

Významným podporujícím faktorem vzniku včasného nadouvání sýrů aerobními bakteriemi ze skupiny koliformních je skutečnost, že sýřenina se při výrobě těchto sýrů ohřívá na teploty 36 až 40 °C, což jsou optimální teploty růstu těchto plynotvorných bakterií. Vznik včasného nadouvání je takovým rizikem, že je oficiálně povoleno proti němu používat i chemikálie. Do mléka na výrobu sýrů je povoleno přidat 20 až 25 g dusičnanu draselného na 100 litrů mléka. Koliformní bakterie redukují dusičnanový ion na dusitanový ( $\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^-$ ), který má být pro koliformní bakterie toxický, a proto znemožňuje jejich plynotvorbu [3].

Pozdní nadouvání se vyskytuje nejvíce u těch sýrů, kde se sýřenina při jejich výrobě dohřívá na vyšší teploty 52 až 56 °C, což trvá asi 45 min. Předpokládá se, že při těchto teplotách a časech plynotvorné bakterie ze skupiny koliformních jsou devitalizované nebo natolik oslabené, že nejsou schopné metabolismu. Laktosa je zpravidla už zfermentovaná kyselinami bakteriemi. Vzniklá kyselina mléčná je přítomná v převážné míře ve formě laktátu vápenatého. Nežádoucími plynotvornými bakteriemi jsou v tomto případě plynotvorné anaerobní sporotvorné bakterie *Clostridium tyrobutyricum*, které mají schopnost fermentovat laktáty za vzniku oxidu uhličitého a vodíku [3].

Další chyba způsobená klostridii je tzv. bílá hniloba. Tu v sýrech způsobují převážně proteolytické klostridie *C. sporogenes* a *C. putrefaciens*. Způsobují intenzivní proteolýzu, který se v sýrech vyznačuje tvorbou bílých, dobře ohraničených hnilobných ložisek s tmavším středem. Při fermentaci hmoty sýrů těmito bakteriemi vzniká i kyselina máselná, která se vyznačuje intenzivním zápachem [3, 37].

Kromě včasného a pozdního nadouvání sýrů může nežádoucí plynotvorbu způsobit i jiné mikroorganismy a faktory. Rozeznávají se přitom formy plynotvorby jako trhliny, drobné okrouhlé oka, tzv. síťovitost a vlastní nadouvání pozorovatelné kromě velkých nepravidelných ok i na základě vyklenutí povrchu nebo boků sýra [3].

Dalšími méně významnými organismy přispívajícími k nežádoucí plynotvorně v sýrech je katabolismus aminokyselin nezákyslovými laktobacily a propionibakteriemi.

Udává se že i dekarboxylace aminokyseliny glutamové za vzniku CO<sub>2</sub> a 4-aminomáselné kyseliny může být významným zdrojem tvorby ok a trhlin v sýrech vyráběných obzvláště za pomoci termofilních zákysových bakterií obsahujících *Streptococcus thermophilus* a *Lactobacillus helveticus* [3].

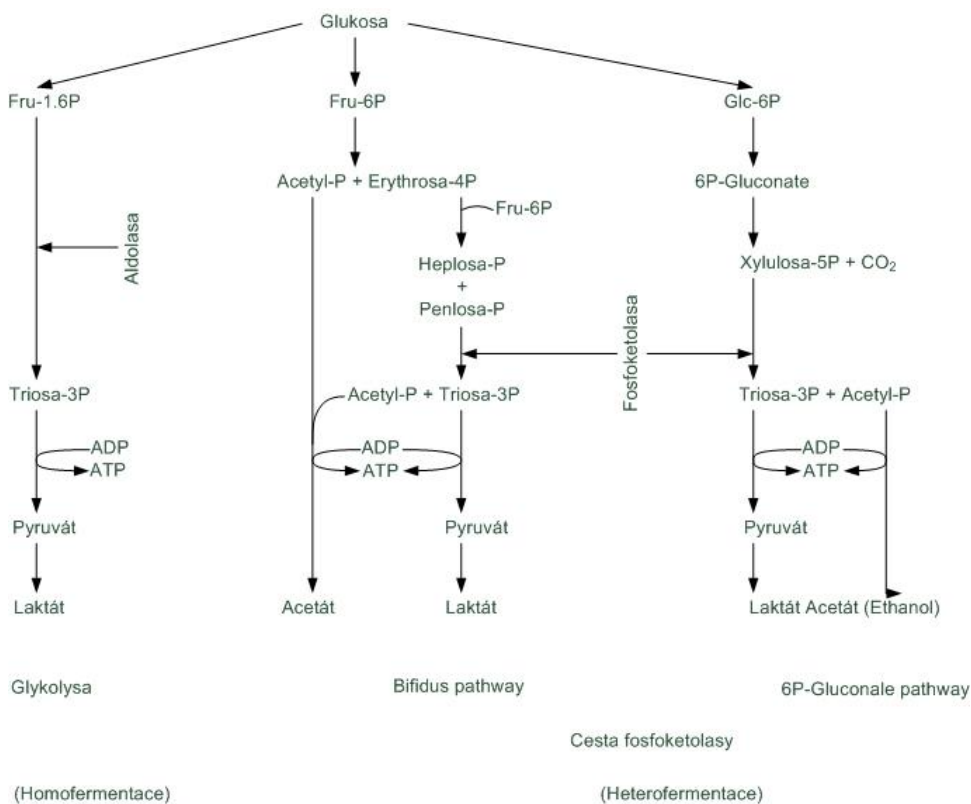
#### 1.4.4 Chyby barvy sýrů

Barva sýrů je jedním z významných senzorických znaků. Změna barvy je možná slunečním světlem nebo oxidací projevující se vznikem různých skvrn. Barva sýra může i blednout vlivem kyselého prostředí, přičemž se opět navrátí, pokud hodnota pH se vlivem zrání sýra zvýší. Hnědé nebo červené skvrny mohou být způsobeny „divokými“ propionibakteriemi *Propionibacterium thoenii* a *P. jensenii*. Bílé skvrny a změknutí sýřeniny v místech skvrn byly zjištěné v souvislosti s nadměrným výskytem enterokoků a kvasinek [3].

## 2 MLÉČNÉ KVAŠENÍ

Mléčné kvašení zahrnuje metabolismus sacharidů bakteriemi mléčného kvašení, které může být charakterizováno jako homofermentativní nebo heterofermentativní. Nemůžeme ale o každém organismu říci, že metabolizuje sacharidy na kyselinu mléčnou s vyloučením všech ostatních produktů [7].

Mléčné kvašení probíhá anaerobně. Při mléčném kvašení je pyruvát vzniklý glykolosou redukován v laktát, tj. anion kyseliny mléčné ( $\alpha$ -hydroperoxypropionové)  $\text{CH}_3\text{-CHOH-COO}^-$  působením laktátdehydrogenasy s NADH [6].



Obr. 2: Možné cesty metabolismu glukosy [6]

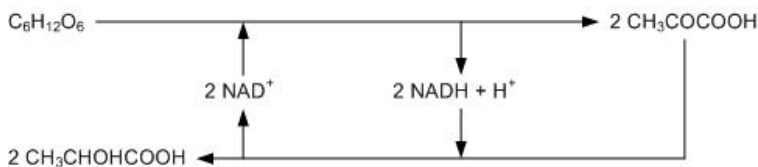
V diagramu je glukosa znázorněna jako startovací bod, ačkoli se do těchto cest s příslušnými modifikacemi může promítnout jakákoli metabolizovaná hexosa. EMP cesta glykolytické fermentace je charakterizována klíčovou rolí aldolasy v porovnání s fosfoketolasou jako klíčovým enzymem v ostatních dvou cestách. Produktem glykolisy je CO<sub>2</sub>, laktát, acetát a v některých případech i etanol. Využívají ji heterofermentativní mikroorganismy, kromě bifidobakterií, které využívají vlastní cesty [7].

## 2.1 Kvašení homofermentativní

Při tomto kvašení vzniká jako konečný produkt pouze kyselina mléčná. Jako substrát se zde uplatňují hlavně hexosy, jejichž fermentace probíhá po dráze známé jako glykolysa. Sled reakcí této dráhy je až do vzniku kyseliny pyrohroznové stejný jako při etanolovém kvašení. Konečnou fází tohoto procesu představuje přeměna kyseliny pyrohroznové na kyselinu mléčnou. Reakce je katalyzována NAD-laktátdehydrogenasou, která přenáší vodík odnímaný při dehydrogenaci triosofosfátu na kyselinu pyrohroznovou [8].

Energetický výtěžek tohoto kvašení tvoří 2 ATP a jeho účinnost je kolem 32 %. Může vznikat D (–) nebo L (+) kyselina mléčná [8].

Sumární rovnice:  $C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2 CH_3CHOHCOOH$



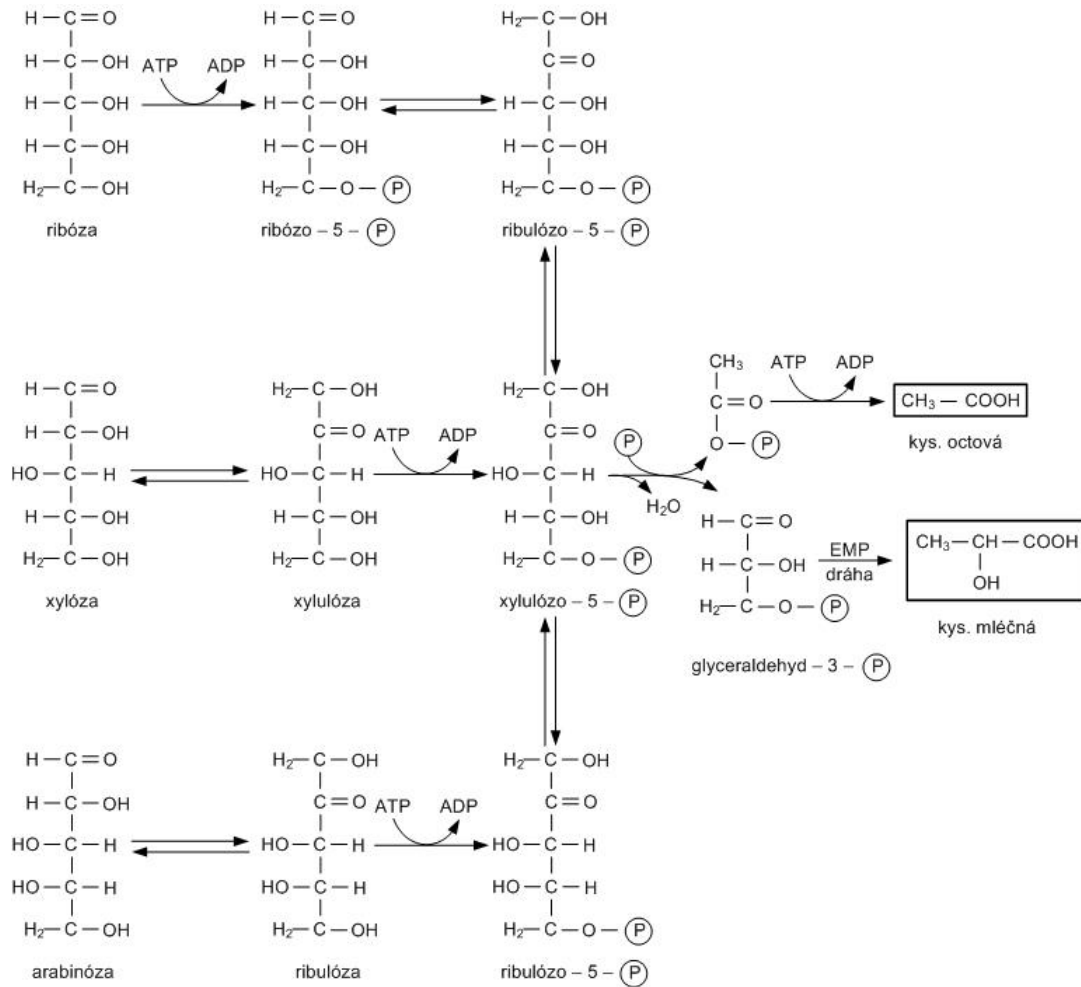
Obr. 3: Vznik kyseliny mléčné z hexosy [8]

## 2.2 Kvašení heterofermentativní

Heterofermentativní kvašení je charakterizováno tím, že vedle kyseliny mléčné při něm vznikají ještě další konečné produkty. Nejčastěji to bývá kyselina octová, etanol, vodík, a oxid uhličitý. U většiny původců toho kvašení chybějí základní enzymy glykolytické dráhy. Štěpení hexos u nich proto probíhá po tzv. fosfoketolase dráze. Tato dráha vychází z hexosomonofosfátového cyklu, v němž je glukosa-6-fosfát přeměňována na kyselinu fosfoglukonovou. Její dekarboxylací vzniká ribulosa-5-fosfát, který přechází na xylulosu-5-fosfát. Tento sacharid je účinkem fosfoketolasy štěpen na 3-fosfoglyceraldehyd a acetylfosfát. Glyceraldehydfosfát vstupuje do dalších fází glykolytické dráhy, kde je přeměňován až na kyselinu mléčnou, kdežto acetylfosfát je přes acetaldehyd redukován na etanol [8].

Jsou-li substrátem pentosy, jsou zkvašovány za tvorby kyseliny mléčné a octové.

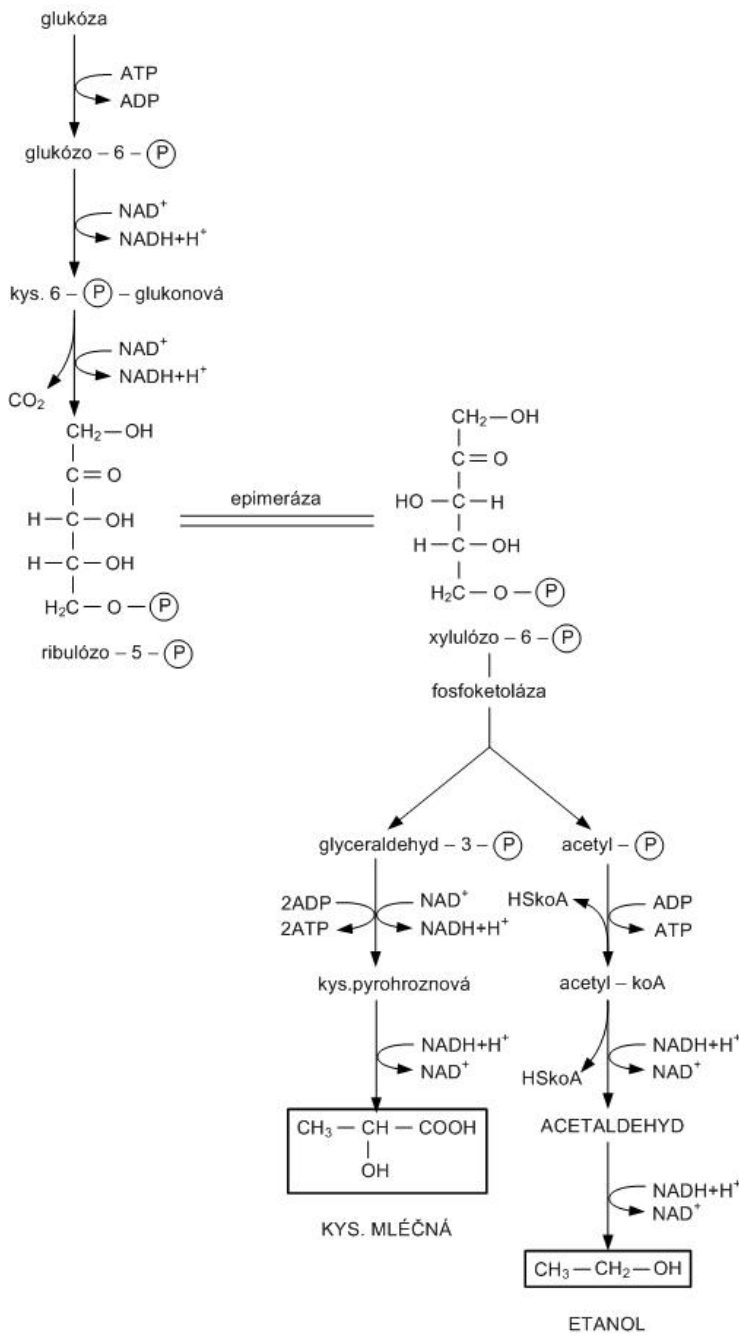
Sumární rovnice:  $C_5H_{10}O_5 \rightarrow CH_3CHOHCOOH + CH_3COOH$



Obr. 4: Heterofermentativní zkvašování pentos [8]



Jsou li substrátem hexosy, jsou zkvašovány za tvorby kyseliny mléčné, etanol a oxid uhličitý.



Obr. 5: Heterofermentativní zkvašování hexos [8]



Energetická bilance u fosfoketolásové dráhy je obdobná jako u glykolysy. Energetický výtěžek činí 2 ATP na 1 mol hexosy nebo pentosy [8].

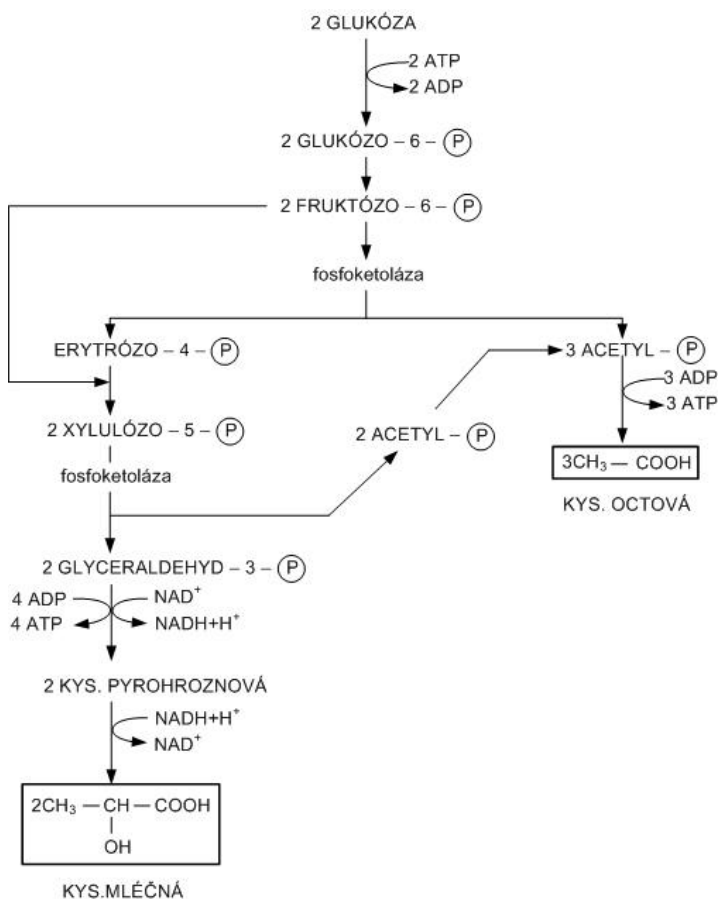
### 2.3 Mléčné kvašení uskutečňované druhem *Bifidobacterium bifidum*

Bakterie rodu *Bifidobacterium* mají odlišný mechanismus heterofermentativního zkvašování glukosy, rovněž po fosfoketolase dráze. Tato bakterie postrádá aldolasu i glukosu-6-fosfodehydrogenasu, obsahuje však dvě aktivní fosfoketolasy. První katalyzuje štěpení fruktos-6-fosfátu na erytroso-4-fosfát a druhá vznik acetyl-fosfátu z xyluloso-5-fosfátu. Glycerinaldehyd je cestou glykolysy přeměněn přes kyselinu pyrohroznovou na kyselinu mléčnou, kdežto acetyl-fosfát přechází na kyselinu octovou podle schématu na obrázku 6 [8].

Sumární rovnice:



Energeticky je tento proces výhodnější než výše zmíněné možnosti mléčného kvašení, neboť ze dvou molekul hexosy vzniká 5 molekul ATP [8].



Obr. 6: Heterofermentativní kvašení uskutečňované Bifidobakteriemi [8]

### 3 BAKTERIE MLÉČNÉHO KVAŠENÍ

Tradičně jsou bakterie mléčného kvašení (BMK) definovány jako bakterie, u nichž v metabolismu sacharidů vzniká kyselina mléčná jako jediný nebo hlavní konečný produkt metabolismu. Dlouhou dobu se rozlišovalo, které bakterie splňují toto kritérium a mají být zařazeny do této skupiny [7].

#### 3.1 Taxonomie

Taxonomické revize těchto rodů a popis rodů nových znamená, že BMK mohou, v jejich širší fyziologické definici, zahrnovat přibližně 20 rodů [9].

Nicméně z praktického, technologicko-potravinářského úhlu pohledu, jsou za hlavní BMK považovány následující rody *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* a *Weissella* [9].

Rod *Bifidobacterium* je v některých textech často považován za pravou BMK a sdílí některé jejich typické vlastnosti, ale je fylogeneticky nepříbuzný a má jedinečný způsob fermentace cukrů [9].

#### 3.2 Řád *Lactobacillales*

Řád obsahuje grampozitivní bakterie kmene *Firmicutes* zařazené do sedmi čeledí. Jejich charakteristickým znakem je produkce kyseliny mléčné jako hlavního metabolitu při fermentaci cukrů. Řada zástupců se využívá při výrobě nejrůznějších fermentovaných potravin. Naproti tomu některé druhy mohou být podmíněně či striktně patogenní [4].

##### 3.2.1 Čeleď *Lactobacillaceae*

Jde o pravidelné, nesporulující grampozitivní tyčinky nebo koky. Nepigmentující, mezofilní, chemoorganotrofní, rostou pouze na kompletním médiu [4].

##### 3.2.1.1 Rod *Lactobacillus*

Buňky mají tvar pravidelných tyčinek. Jsou obvykle delší, občas také kokovité, uspořádané v palisádách nebo krátkých řetězcích. Jsou pouze zřídka pohyblivé peritrichálními bičíky. Fakultativně anaerobní, občas mikroaerofilní (slabý růst na vzduchu, ale lepší růst při redukované koncentraci kyslíku), někteří zástupci vyžadují při izolaci anaerobní podmínky. Obecně platí, že přítomnost 5 % CO<sub>2</sub> podporuje růst laktobacilů. Neredukují

nitráty, ani nehydroxylyjí želatinu a jsou kataláza negativní. Optimální růstová teplota je 30 až 40 °C a optimum pH obvykle mezi 5,4 až 6,4. Bývají náročné na přítomnost vitaminů v prostředí. Jsou široce rozšířené v prostředí, obzvláště v nejrůznějších potravinách živočišného nebo rostlinného původu (i startovací kultury), v nápojích, v čisté i znečištěné vodě, kysaném zelí, silážích. Běžně osídlují gastrointestinální trakt ptáků a savců a vaginu savců. Tvoří část normální ústní flóry mnoha teplokrevných živočichů včetně člověka. Pouze vzácně jsou patogenní. Mají poměrně termorezistentní vegetativní buňky. Na základě konečných produktů fermentace cukrů je možno dělit laktobacily do tří skupin [4, 11]:

- I. skupina jsou obligátně homofermentativní. Hexosy fermentují výhradně na kyselinu mléčnou a pentosy ani glukonát nefermentují.
  - *Lb. delbruckii* subsp. *delbruckii* – vyskytují se ve fermentovaném rostlinném materiálu,
  - *Lb. delbruckii* subsp. *lactis* – bývá izolován z mléka, sýru, granulovaného krmiva,
  - *Lb. delbruckii* subsp. *bulgaricus* – používá se k výrobě jogurtů (startér) a sýrů,
  - *Lb. acidophilus* – vyskytuje se ve střevním traktu člověka a zvířat, v ústech a vagině člověka,
  - *Lb. helveticus* – bývá izolován ze syrového mléka, používá se jako startér při výrobě sýrů.
- II. skupina jsou fakultativně heterofermentativní laktobacily. Hexosy fermentují na kyselinu mléčnou, či na směs kyseliny mléčné, octové, mravenčí a etanolu. Pentosy fermentují na kyselinu mléčnou a octovou.
  - *Lb. casei* – nachází se v mléce, sýrech, potravinách, prostředí a i klinickém materiálu,
  - *Lb. plantarum* – je běžně přítomný v potravinách, prostředí, fermentovaném rostlinném materiálu, klinickém materiálu,
  - *Lb. sake* – původně izolován jsou startér pro sake, dále zjištěn v kyselém zelí a v jiných fermentovaných rostlinných materiálech a v potravinách.

- III. skupina zahrnuje obligátně heterofermentativní laktobacily. Hexosy fermentují na kyselinu mléčnou, octovou (etanol) a CO<sub>2</sub>. Pentosy fermentují na kyselinu mléčnou a octovou.
  - *Lb. buchneri* – přítomen v mléce, sýrech, fermentovaném rostlinném materiálu, v lidských ústech,
  - *Lb. fermentum* – výskyt v mléčných výrobcích, fermentovaném rostlinném materiálu, stočným kalu, ústech a stolici člověka,
  - *Lb. kefir* – izolován z kefiru [4, 11].

### 3.2.1.2 Rod *Pediococcus*

Sférické buňky, které nikdy nejsou prodloužené, tvořící tetrády, vzácně jednotlivě nebo ve dvojicích (nikdy ne v řetězcích). Jsou nepohyblivé, fakultativně anaerobní (některé kmeny jsou inhibovány při aerobní kultivaci). Vyžadují nutričně bohatá média a fermentovatelné cukry – mono- a disacharidy. Glukosa je fermentovaná za současné produkce kyseliny, ale ne plynu; hlavním produktem je laktát. Jsou přirozeně rezistentní k vankomycinu. Jsou katalasa negativní a neredukují nitráty. Optimální růstová teplota je 25 až 40 °C. Vyskytují se hojně na rostlinném materiálu a v potravinách i nápojích. Obecně jsou chápány jako nepatogenní pro rostliny či živočichy, i když ojediněle jsou izolovány z klinického materiálu. Někdy souhrnně označovány jakou „mléčné koky“ [4, 11].

- *P. damnosus* – vyskytuje se v prostředí pivovarů, v nápojích (pivo, víno, mošt),
- *P. dextrinicus* – běžně izolován ve fermentovaných potravinách jako je siláž, okurky nebo olivy,
- *P. acidilactici* – nachází se v rostlinném materiálu, mléce, mléčných výrobcích, humánním klinickém materiálu, bývá také izolován jako non-startérová bakterie v sýru čedar [4, 12, 19].

### 3.2.2 Čeleď *Aerococcaceae*

Většina rodů této čeledi byla popsána v posledních letech. Řada zástupců se nachází v klinickém materiálu jako infekční agens [4].

### 3.2.2.1 Rod *Aerococcus*

Sférické buňky tvořící tetrády, nepohyblivé, fakultativně anaerobní (lepší růst je při nižší koncentraci kyslíku – mikroaerofilní), slabě rostou anaerobně nebo na vzduchu. Vykazují slabou biochemickou aktivitu. Za anaerobních podmínek produkují  $H_2O_2$ . Na krevním agaru tvoří viridaci (hemolýza s nazelenalým nádechem). Mají respiratorní metabolismus. Katalasa je negativní nebo slabá. Tvoří kyselinu z různých cukrů, neredukují nitráty a mají pozitivní hippurátový test. Rostou při 10 °C, ale ne při 45 °C; optimální růstová teplota je 30 °C. Jsou schopné růst v 10% NaCl a ve 40% žluči, či při pH 9,6. Patří mezi běžné vzduchem roznášené organismy v nemocnicích.

- *A. viridans* – je běžný původce humánních infekcí (endokarditida, meningitida), saprofyt, patogenní pro mořské živočichy,
- *A. urinae* – izolován z infekcí močových cest [4, 6].

### 3.2.3 Čeleď *Carnobacteriaceae*

Jde o pravidelné, nesporulující bakterie. Buňky jsou tvaru koků (i ovoidních) a tyčinek. Nepigmentují, mezofilní, chemoorganotrofní, rostou pouze na kompletním médiu [4].

#### 3.2.3.1 Rod *Carnobacterium*

Tvoří rovné štíhlé drobné tyčinky vyskytující se jednotlivě nebo po dvou, občas v krátkých řetízích. Buňky mohou být pohyblivé. Jsou heterofermentativní a anaerobně fermentují z glukosy kyselinu mléčnou a další mastné kyseliny. Buňky rostou při 10 °C, ale ne při 45 °C, optimální teplota je 30 °C. Je katalasa negativní a neredukuje nitráty.

- *C. divergens* – vyskytuje se ve vakuově baleném mase skladované při chladničkové teplotě [4, 13].

### 3.2.4 Čeleď *Enterococcaceae*

Obsahuje koky i krátké tyčinky, jsou zde řazeny druhy vyskytující se přirozeně v prostředí i podmíněně patogenní bakterie [4, 20].

### 3.2.4.1 Rod *Enterococcus*

Enterokoky jsou sférické nebo ovoidní buňky vyskytují se po dvou, ve shlucích nebo krátkých řetízcích. Netvoří endospory ani pouzdra. Jsou fakultativně aerobní, chemoorganotrofní (vyžadují nutričně bohatá média). Hlavním produktem fermentace je kyselina mléčná bez tvorby plynu. Jsou katalasa negativní, na krevním agaru často viridující ( $\alpha$ -hemolýza). Většinou rostou jak při 10 °C, tak i při 45 °C. Rostou také v přítomnosti 6,5 % NaCl nebo 40% žluče v médiu a při pH 9,6. Enterokoky jsou poměrně odolné organismy vyskytující se v širokém rozmezí v životním prostředí jako je půda, voda, rostliny, a trávicí trakt horkokrevných zvířat a v klinickém materiálu. Občas způsobují pyogenní infekce. Někdy bývají souhrnně označovány jako „mléčné koky“.

- *E. durans* – nachází se v prostředí, potravinách mající za základ mléko (sýr),
- *E. faecalis* a *E. faecium* – přirozeně se vyskytují ve střevech člověka a zvířat a jsou indikátory fekálního znečištění vod [4, 17].

### 3.2.4.2 Rod *Tetragenococcus*

Tvoří sférické koky v tetrádách, občas ovoidní tvar, jsou nepohyblivé. Jsou chemoorganotrofní, fakultativně anaerobní, fermentující glukosu (bez tvorby plynu) a některé další monosacharidy. Hlavním konečným produktem metabolismu glukosy je L (+)-laktát. Jsou katalasa a oxidasa negativní, nerostou při 10 °C ani při 45 °C. Jsou nepatogenní, halotolerantní (5 až 10 % NaCl), vyskytují se v prostředí se zvýšenou salinitou (potraviny, solné roztoky), ojediněle i v humánním klinickém materiálu.

- *T. halophilus* – využívá se při kvasném procesu výroby sojové omáčky [4, 14].

### 3.2.4.3 Rod *Vagococcus*

Buňky tohoto rodu jsou kulaté, oválné, nebo tvaru krátkých tyčinek; vyskytují se jednotlivě, po dvojicích popřípadě v řetízcích. Nesporulující, některé druhy jsou pohyblivé pomocí peritrichálních bičíků. Fakultativně anaerobní, chemoorganotrofní s fermentorním metabolismem. Z mnoha cukrů produkují kyselinu, ale bez tvorby plynu. Katalasa negativní, neredukují nitráty. Optimální růstová teplota je 25 až 35 °C. Izolovány především z vody, dále z lososovitých ryb.

- *V. fluvialis* – vyskytuje se v kuřecím feces a ve vodě [4, 15].

### 3.2.5 Čeleď *Leuconostocaceae*

Tyčinky i koky, které netvoří spory. Zástupci jsou anaerobní nebo aerotolerantní. Charakteristický je heterofermentativní metabolismus [4, 5].

#### 3.2.5.1 Rod *Leuconostoc*

Jedná se o heterofermentativní koky, které jsou někdy oválné nebo mohou tvořit krátké tyčinky vyskytující se v párech nebo řetízcích. Jsou nepohyblivé a nesporulující. Růst je pomalý a vytváří malé kolonie, které mohou být na médiích obsahující sacharosu mukózní. Jsou fakultativně anaerobní, chemoorganotrofní. Jsou přirozeně rezistentní k vankomycinu. Optimální růstová teplota je 20 až 30 °C. Rostou při 10 °C, ale ne při 45 °C. Glukosu fermentují za produkce kyseliny i plynu. Jsou katalasa negativní, nehydrolyzují arginin, jsou indol negativní, nehemolytické a neredukují nitráty. Jsou široce rozšířeny na rostlinách a v mléčných produktech, běžně přítomni i v jiných potravinách. Obecně jsou považovány za nepatogenní pro rostliny či živočichy, ale některé druhy byly izolovány z humánních zdrojů. Někdy souhrnně označovány jako „mléčné koky“.

- *Ln. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* – vyskytuje se na fermentovaných rostlinách, občas bývá izolován z klinického materiálu,
- *Ln. mesenteroides* subsp. *dextranicum* – bývá izolován z mléka a mléčných výrobků,
- *Ln. mesenteroides* subsp. *cremoris* – vyskytuje se v mléce a mléčných výrobcích [4, 12].

#### 3.2.5.2 Rod *Oenococcus*

Elipsoidní až sférické koky vyskytují se obvykle po dvou a v řetízcích, jsou nepohyblivé a nesporulující. Jsou chemoorganotrofní, fakultativně anaerobní, katalasa a oxidasa negativní, neproteolytické, nehemolytické a acidofilní. Rostou při pH 3,5 až 4,8; rostou v přítomnosti 10% etanolu v médiu. Růst v tekutém médiu je pomalý, růst na agaru je podpořen atmosférou s 10 % CO<sub>2</sub>. Růstová teplota je 20 až 30 °C s optimem 22 °C. Glukosa je fermentovaná na D-kyselinu mléčnou, CO<sub>2</sub> a etanol nebo acetát. Mohou produkovat extracelulární polysacharidy.

- *O. oeni* – jde o acidofilní bakterii, je hlavní bakterií používanou k indukci jablečno-mléčného kvašení při výrobě vína [4, 16].



### 3.2.5.3 Rod *Weissella*

Krátké tyčinky se zakulacenými či zúženými konci nebo mohou mít kokovitý tvar (čočkovitý); vyskytují se jednotlivě, po dvou nebo v krátkých řetězcích. Jsou nepohyblivé, nesporulující. Jsou chemoorganotrofní, heterofermentativní s malou produkcí plynu. Jsou acidobutyrické (schopné přežít za kyselých podmínek), pomalu rostoucí. Katalasa a oxidasa negativní, rostou při 15 °C, ale ne při 45 °C. Nacházejí se ve fermentovaných potravinách, v půdě a také klinickém materiálu.

- *W. viridescens* – vyskytuje se v masných výrobcích a pasterovaném mléce [4, 31].

### 3.2.6 Čeleď *Streptococaceae*

Buňky jsou sférické nebo ovoidní, vyskytující se po dvou nebo v řetězcích rozmanité délky. Jsou nepohyblivé a netvoří endospory. Jsou chemoorganotrofní a metabolismus je fermentorní, z cukrů tvoří kyselinu mléčnou, octovou, mravenčí, etanol a CO<sub>2</sub>. Metabolismus je fakultativně anaerobní, katalasa negativní. Mohou být nutričně náročné, vyžadují komplexní médium. Čeleď zahrnuje patogenní, saprofytické i biotechnologicky využívané druhy [4].

#### 3.2.6.1 Rod *Streptococcus*

Buňky jsou sférické nebo ovoidní, vyskytující se ve dvojicích nebo řetězcích. Pokud rostou v tekutém médiu, mohou být prodlouženy v ose řetězku do protáhlého tvaru. Nejsou pohyblivé, jsou fakultativně anaerobní, nesporulující. Některé druhy tvoří pouzdra. Jsou chemoorganotrofní, vyžadují nutričně bohatá média a někdy i 5% CO<sub>2</sub>. Metabolismus je fermentorní, produkují převážně laktát, ale ne plyn. Jsou katalasa negativní, α i β-hemolytické. Rostou v rozmezí teplot 25 až 45 °C s optimem 37 °C. Nerostou při 10 °C. Streptokoky jsou komenzály nebo parazity obratlovců. Některé druhy jsou patogenní. Řada druhů se běžně vyskytuje v prostředí jako saprofyt. Velmi často jsou děleny do čtyř skupin [4, 18]:

- I. skupina jsou pyogenní β-hemolytické streptokoky.
  - *S. pyogenes* – je patogenní pro člověka, nejčastější příčina angín,
  - *S. agalactiae* – nachází se v humánním a veterinárním klinickém materiálu.

- II. skupina jsou orální streptokoky (druhově nejpočetnější).
  - *S. pneumoniae* – pneumokok, jde o lidský patogen,
  - *S. salivarius* – přirozeně osídluje ústa člověka i zvířat, vyskytuje se v klinickém materiálu,
  - *S. mutans* – na povrch zubů, v ústní dutině a klinickém materiálu.
- III. skupina jsou ostatní anaerobní streptokoky – skupina streptokoků vyžadující striktně anaerobní podmínky, rostou při 37 °C až 45 °C, ale ne při 20 °C.
  - *S. hansenii* – koky po dvou a v řetízcích, izolovány ze stolice člověka.
- IV. skupina jsou ostatní streptokoky.
  - *S. acidominimus* – především se nachází ve veterinárním materiálu,
  - *S. bovis* – vyskytuje se v trávicím traktu domestikovaných býložravců,
  - *S. thermophilus* – využití jako startovací kultury při výrobě celé řady fermentovaných mléčných výrobků jako například jogurt [4, 18].

### 3.2.6.2 Rod *Lactococcus*

Buňky jsou sférické nebo ovoidní, vyskytující se po dvou nebo v krátkých řetízcích. Netvoří spory, jsou nepohyblivé a bez pouzder. Jsou fakultativně anaerobní a chemoorganotrofní. Vyžadují množství cukrů. Při fermentaci nevzniká plyn. Je katalasa a oxidasa negativní, optimální růstová teplota je 37 °C, rostou při 10 °C, ale ne při 45 °C a také nerostou při 6,5% NaCl. Mohou být  $\alpha$ -hemolytické. Vyskytují se v mléčných výrobcích, rostlinném materiálu a potravinách obecně. Souhrnně jsou označovány jako „mléčné koky“.

- *Lc. lactis* subsp. *lactis* – přirozeně se nachází v mléce, mléčných výrobcích, potravinách,
- *Lc. lactis* subsp. *cremoris* – přirozeně se nachází v mléce, mléčných výrobcích, potravinách [4, 6].

### 3.3 Řád *Actinomycetales*

Patří do kmene *Actinobacteria*. Jde o bakterie – aktinomycety, zahrnující širokou skupinu bakterií často tvořících vlákna, které mohou setrvávat jako stabilní mycelium nebo se rozpadat [4].

#### 3.3.1 Čeleď *Bifidobacteriaceae*

Zahrnuje gramnegativní, gramvariabilní, grampozitivní pleomorfní tyčinky, které jsou fakultativně až striktně anaerobní. Je to morfologicky i ekologicky značně rozmanitá skupina. Nachází se v ústní dutině, trávicím traktu a v klinickém materiálu [4].

##### 3.3.1.1 Rod *Bifidobacterium*

Bifidobakterie tvoří tyčinky s velmi rozmanitým tvarem, obvykle mírně zakřivené a kyjovité a často ztluštěné či s náznaky větvení. Mohou být uspořádány jednotlivě, po dvou, ve „V“ seskupení, nebo „Y“, občas v řetízcích, palisádách nebo růžicích. Jsou grampozitivní, často nepravidelně obarvené, nepohyblivé, nesporulující, neacidorezistentní, anaerobní (některé druhy mohou růst na vzduchu s doplňkem 10% CO<sub>2</sub>). Nerostou pod hodnotou pH 4,5 ani nad pH 8,5. Jsou chemoorganotrofní a aktivně fermentují řadu cukrů za produkce převážně kyseliny octové a mléčné. Kyselinu octovou ani propionovou netvoří. Katalasa je negativní, vzácně může být pozitivní (při růstu na vzduchu s doplňkem 10 % CO<sub>2</sub>). Obvykle vyžadují různé vitaminy. Optimální růstová teplota je v rozmezí 37 až 41 °C. Charakteristickým enzymem rodu je fruktoso-6-fosfát-fosfoketolasa. Bifidobakterie jsou prospěšnou součástí střevní mikroflóry (u kojenců představují až 90 %), kde pomáhají udržovat rovnováhu a znesnadňují jiným patogenním mikroorganismům pomnožení ve střevech. Tyto bakterie jsou navíc vybaveny mechanismy, kterými detoxikují škodlivé složky tráveniny [4, 6].

- *B. bifidum* – nachází se v potravinách a v klinickém materiálu,
- *B. adolescentis* – výskyt u člověka [4].

## 4 ČISTÉ MLÉKAŘSKÉ KULTURY

Čisté mlékařské kultury jsou (ČMK) vybrané a vyšlechtěné mikroorganismy záměrně přidávané do mléka nebo smetany s cílem vyvolat určité specifické změny ve vzhledu, konzistenci, obsahu, chuti i dalších vlastností daného mléčného výrobku [10].

Pojem „čisté mlékařské kultury“ je však nutno si vykládat pouze technicky. Nejde totiž o čisté kultury v pravém slova smyslu tohoto pojmu, ani o absolutní druhovou čistotu kultur, ale o jejich pojmové odlišení od dříve používaných přírodních kyšek neznámého mikrobiologického složení. ČMK jsou složeny ze známých a žádoucích mikroorganismů. V jednom typu směsné ČMK bývá obsaženo i několik druhů mikroorganismů. Většinou různých druhů bakterií mléčného kvašení nebo jiných užitečných bakterií, kvasinek či plísní [10].

### 4.1 Význam čistých mlékařských kultur

Čisté mlékařské kultury hrají významnou roli při výrobě fermentovaných mléčných výrobků. Význam je zejména [37]:

- Zdravotní – je prokázáno že ČMK způsobují dieteticko-léčebné účinky mlékařských výrobků. Jde o zvýšení výživové hodnoty těch výrobků, u nichž dochází k přeměně bílkovin mléka na stravitelnější formy. Bakterie mléčného kvašení obsažené v ČMK tvoří kyselinu mléčnou, která tlumí rozvoj nežádoucí hnilobné mikroflóry. Zvláště jsou významné ty mikroby, které mají schopnost implantace v lidském střevním traktu.
- Technologický – zaváděním vybraných druhů mikroorganismů do pasterovaného mléka se zajistí žádané biochemické procesy nutné k dosažení specifických vlastností jednotlivých výrobků.
- Ekonomický – používání ČMK dává předpoklad k dosažení dobré, standardní jakosti výrobků. Snižuje se zmetkovitost ve výrobě a zvyšuje se hospodárnost výroby. ČMK umožňují také rozšiřování sortimentu výroby [37].

### 4.2 Startérové bakterie

Startérové bakterie jsou především bakterie mléčného kvašení přidávané do mléka pro výrobu sýrů. Jejich primárním úkolem je zkvašováním laktosu produkovat kyselinu

mléčnou. Dále se mohou přidávat bakterie kvůli produkci antimikrobiálních látek (bakteriocinů), které inhibují jiné, nežádoucí organismy, které mohou být obsaženy v sýru [15].

BMK použity jako startérové jsou klasifikovány do dvou skupin – mezofilní a termofilní – v závislosti na jejich schopnosti produkovat kyselinu za různých teplot [15].

Primární funkcí startérových bakterií je vyrábět dostatečné množství kyseliny v průběhu výroby sýra pro snížení pH mléka na požadovanou úroveň. Také přispívají ke zrání sýrů, jejich enzymy se podílí na proteolýze, lipolýze a konverzi aminokyselin a sensoricky aktivních látek [19].

### 4.3 Non-startéry

V sýru mohou být přítomné také tzv. non-startérové mléčné bakterie (NSLAB). Jedná se o mikroorganismy, které jsou přirozeně přítomny v syrovém mléce a přežívají pasterizaci nebo se do mléka dostávají sekundární kontaminací (post-pasterizační kontaminace). Nemusí však způsobovat kažení mléčných výrobků. Naopak tyto bakterie mohou pomoci zlepšit organoleptické vlastnosti výsledného produktu a z tohoto důvodu se ještě na některých místech využívá v určité míře k výrobě sýrů spontánní mikroflóra z prostředí [15].

Převládající non-startérové bakterie mléčného kvašení v sýrech jsou nejčastěji laktobacily (*Lactobacillus casei* subsp. *casei*, subsp. *pseudoplantarum* nebo subsp. *rhamnosus*, *Lb. brevis*) a *Pediococcus* (např. *Pediococcus pentosaceus*). Non-startérové mikroorganismy se mohou nacházet také na povrchu, příkladem mohou být kvasinky *Geotrichum candidum*, nebo bakterie *Brevibacterium linens* a druhy bakterie *Micrococcus* [15].

NSLAB jsou významnou součástí mikrobiální populace při zrání všech variant zrajících sýrů. S výjimkou leukonostoků nejsou NSLAB záměrně přidávány jako součást startovací kultury nebo jako sekundární doplněk kultury, ale jsou náhodnou kontaminací, která následně roste během dozrávání. V průběhu výroby sýrů většinou nepřispívají k produkci kyseliny, ale mají vliv na rozvoj chuti při zrání sýrů. Hlavními bakteriálními skupinami non-startérů jsou laktobacily, leukonostoky, pediokoky a enterokoky [19].

Je však nutno zajistit zdravotní nezávadnost výsledného produktu, protože tyto kultury nejsou mnohdy prověřeny a mohou se podílet např. na tvorbě biogenních aminů nebo jiných látek, které mohou mít na lidský organizmus nežádoucí účinky [20, 21, 22].

## 5 DEKARBOXYLÁZOVÁ AKTIVITA MIKROORGANISMŮ

Dekarboxylace je reakce, při které se odštěpuje oxid uhličitý ze substrátu. Proces je katalyzovaný enzymy ze třídy lyas (dekarboxylasa). Působením dekarboxylas aminokyselin vznikají aminy, které mají obvykle významné fyziologické účinky, a proto se také označují jako biogenní aminy [24, 25].

Biogenní aminy jsou dusíkaté nízkomolekulární organické báze, které jsou tvořeny v průběhu metabolických procesů, zejména ve fermentovaných potravinách. Vyskytují se v různých potravinách jako jsou: rybí produkty, maso, masné výrobky, sýry, suché salámy, nealkoholické i alkoholické (víno, pivo) nápoje a jiné fermentované potraviny [23, 27, 28, 29].

Hlavními biogenními aminy vyskytující se v potravinách jsou histamin, tyramin, putrescin, kadaverin. Spotřeba potravin s vysokými koncentracemi těchto biogenních aminů mohou mít toxické účinky pro ty spotřebitele, jejichž organismus má sníženou schopnost tvořit enzymy (monoaminoxidasy a diaminoxidasy) odpovědné za detoxikaci biogenních aminů. Alkohol zvyšuje nežádoucí účinky biogenních aminů. Histamin může způsobovat bolesti hlavy, nízký krevní tlak, krvácení, otoky, průjem. Tyramin způsobuje hypertenze. Kadaverin a putrescin mohou zhoršovat účinky histaminu a tyraminu [28, 29].

V sýrech se nejvíce vyskytuje histamin a tyramin. Schopnost různých mikroorganismů produkovat biogenní aminy se značně liší. Schopnost tvořit biogenní aminy mají rody *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* [30].

K urychlení zrání sýrů jsou přidávány proteolytické enzymy nebo proteolytické startovací kultury. Degradační produkty proteolysy navyšují koncentraci peptidů a aminokyselin. Peptidy a aminokyseliny slouží jako prekurzory pro tvorbu aminů v přítomnosti dekarboxylasa pozitivních mikroorganismů [31].

K přítomnosti a akumulaci biogenních aminů přispívají faktory [32, 33]:

- dostupnost volných aminokyselin,
- vhodné pH,
- aktivita vody,
- koncentrace solí,
- teplota a čas zrání,
- výskyt bakteriální mikroflóry a její hustota,

- synergické efekty mezi jednotlivými mikroorganismy,
- přítomnost dekarboxylasa pozitivních mikroorganismů [32, 33].

Schopnost tvorby biogenních aminů byl popsán u několika skupin mikroorganismů, zejména *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* ssp., *Enterococcus* a několik dalších bakterií mléčného kvašení [26, 34].

## 5.1 Vznik histaminu

Dekarboxylace histidinu na histamin je z největší pravděpodobnosti způsobena mikroorganismem *Lactobacillus buchneri*. Tento mikroorganismus způsobuje kažení potravin a jeho přítomnost tedy není žádoucí [28, 31]. V menších množstvích je tento biogenní amin produkován také mikroorganismy *Lb. fermentum*, *Lb. helveticus*, *Lactococcus lactis* a *Enterococcus faecium*. Tyto mikroorganismy byly izolovány z švýcarského sýra [35].

Kromě bakterií mléčného kvašení mohou být producenty histaminu i další bakterie. Z gramnegativních bakterií to jsou např. *Morganella morganii*, *Photobacterium phosphoreum*, *Enterobacter aerogenes*, *Raoultella planticola*. Tyto mikroorganismy se vyskytují při kažení ryb [28]. Mezi grampozitivní bakterie schopné přeměňovat histitin na histamin lze zařadit bakterie mléčného kvašení nebo bakterie působící kažení potravin. *Clostridium perfringens*, *Oenococcus oeni*, *Lb. buchneri*, *Lb. hilgardii*, *Tetragenococcus muriaticus* a další [28].

Produkce histaminu se po 24 hodinové inkubaci při 10 °C zpomalovala a úplně se zastavila při 5 °C. Při 1 °C nebyla zaznamenána produkce histaminu mikroorganismy *Hafnia*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas* sp. [34].

## 5.2 Vznik tyraminu

Mezi bakterie produkující tyramin lze zařadit *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Cornobacterium*. V laboratorních podmínkách byla dokázána produkce tyraminu těmito rody bakterií *Pseudomonas*, *Proteus*, *Enterococcus*, *Lactococcus* [34].

## 5.3 Vznik kadaverinu

Biogenní amin kadaverin vzniká dekarboxylací lysinu. Mikroorganismy uskutečňující tuto proměnu jsou např. zástupci čeledi *Enterobacteriaceae* (*Escherichia coli*, *Hafnia alvei*, *Salmonella enterica*, *S. typhimurium*, *Shigella flexneri*), *Vibrio vulnificus*, *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *Bacillus halodurans*, *B. subtilis*, *Clostridium perfringens*,

*Cl. acetobutylicum*, *Listeria monocytogenes*, *L. innocua*, *Staphylococcus epidermidis*, *S. aureus* [28].

*Klebsiella pneumoniae* po 24 hodinové kultivaci produkovala více kadaverinu při 20 °C než při 10 °C [34].

#### 5.4 Vznik putrescinu

Biogenní amin putrescin vzniká dekarboxylací ornitinu. Jeho produkce byla zaznamenána u mnohých bakterií, mezi které lze uvést *Escherichia coli*, *Haemophilus influenzae*, *Salmonella typhimurium*, *Yersinia pestis*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Shigella flexneri* [36]. V holandském sýru identifikovali tyto grampozitivní producenty tyraminu: *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus*, *Lb. helveticus*, *Enterococcus durans*, *E. faecalis*, *E. casseliflavus*.

Produkce putrescinu mikroorganismem *Enterobacter cloacae* byla zjištěna při 20 °C po 24 hodinách inkubace. Při 10 °C produkce putrescinu nebyla zaznamenána [34].



## **II. PRAKTICKÁ ČÁST**

## 6 CÍLE PRÁCE

Cílem této bakalářské práce bylo identifikovat bakterie ve vzorcích sýrů a detekovat jejich dekarboxylázovou aktivitu (vznik biogenních aminů). Vzorkem byly sýry holandského typu – eidamská cihla.

Cílem teoretické části bylo vypracovat literární rešerši na téma:

- technologie výroby sýrů holandského typu,
- využití bakteriálních kultur pro výrobu sýrů,
- biochemických přeměn a procesů zrání sýrů,
- bakterie mléčného kvašení – čisté mlékařské kultury i non-startérové bakterie,
- dekarboxylázová aktivita bakterií vyskytujících se v sýrech.

Cílem praktické části bylo:

- zachytit mikroorganismy ve čtyřech vrstvách přírodních sýrů holandského typu,
- označit potenciální producenty biogenních aminů a tyto identifikovat,
- detekovat množství vyprodukovaných biogenních aminů izolovanými bakteriemi,
- na základě teoretické části a výsledků praktické části formulovat závěry a doporučení.

## 7 MATERIÁL A METODIKA

### 7.1 Vzorky

Vzorkem byly cihly eidamského sýra se složením 50 % w/w sušiny a 30 % w/w tuku v sušině. Velikost cihly byla 1,2 – 1,4 kg s rozměry 9 x 9 x 14 cm. Sýry byly získány od producenta z České republiky. Vzorky sýrů byly rozděleny do 3 skupin. Část vzorků byla ze zracího sklepa a přemístěna do lednice ( $5 \pm 1$  °C) po 3 týdnech (23. den; dále označeno 3W). Po 34 dnech (od počátku výroby) byla další skupina sýrů odebrána ze zracího sklepa do lednice ( $5 \pm 1$  °C), kde proběhlo další skladování (dále označeno jako 5W). Celou dobu pokusu zůstala ve zracím sklepě zbývající část cihel (označeno jako C).

Dalším analyzovaným vzorkem byla startérová kultura v podobě provozního zákysu pro výrobu tohoto sýru.

### 7.2 Kultivační půdy

#### M17 agar

M17 (Oxid) .....	67,25 g
Glukóza (Lach-Ner) .....	5,00 g
Laktóza (Lach-Ner).....	5,00 g
Agar .....	14,25 g
Voda.....	1000,00 ml

Příprava: Příslušná navážka půdy a ostatních složek, byla rozpuštěna ve stanoveném množství destilované vody a po sterilaci v autoklávu (121 °C, 20 min) rozlita na Petriho misky.

#### Slanetz & Bartley Medium

Tryptosa .....	20,00 g
Kvasničný extrakt .....	5,00 g
Dextrosa .....	2,00 g
Hydrogenuhlíčitán (di)draselný .....	4,00 g
Azid sodný .....	0,40 g
Trifenyltetrazolium chlorid.....	0,10 g
Agar .....	15,00 g
Voda.....	1000,00 ml

Příprava: Příslušná navážka půdy byla opatrně zahřáta ve stanoveném množství destilované vody až do úplného rozpuštění. Poté byla zchlazena ve vodní lázni na 50 °C a nalita na Petriho misky.

### **Plate Count Agar**

Enzymatický hydrolyzát kaseinu .....5,00 g  
Kvasničný extrakt .....2,50 g  
Glukosa .....1,00 g  
Agar .....15,00 g  
Voda.....1000,00 ml

Příprava: Příslušná navážka půdy byla rozpuštěna ve stanoveném množství destilované vody a po sterilaci v autoklávu (121 °C, 20 min) rozlita na Petriho misky.

### **Anaerobic agar**

Enzymatický hydrolyzát kaseinu .....20,00 g  
Chlorid sodný.....5,00 g  
Dextrosa .....10,00 g  
Tioglykolan sodný .....2,00 g  
Hydroxymethansulfinan sodný .....1,00 g  
Methylenová modř .....0,002 g  
Agar .....20,00 g  
Voda.....1000,00 ml

Příprava: Příslušná navážka půdy byla rozpuštěna ve stanoveném množství destilované vody a po sterilaci v autoklávu (121 °C, 20 min) rozlita na Petriho misky.

### **Violet Red Bile Agar**

Masový pepton.....7,00 g  
Kvasničný extrakt .....3,00 g  
Směs žlučových solí.....1,50 g  
Lakosa .....10,00 g  
Chlorid sodný.....5,00 g  
Neutrální čern .....0,03 g  
Krystalová violet' .....00,002 g

Agar ..... 15,00 g  
Voda..... 1000,00 ml

Příprava: Příslušná navážka půdy byla rozpuštěna ve stanoveném množství destilované vody a po sterilaci v autoklávu (121 °C, 20 min) rozlita na Petriho misky.

### **MRS agar**

Masový pepton..... 10,00 g  
Hovězí extrakt..... 8,00 g  
Kvasničný extrakt ..... 5,00 g  
Glukosa ..... 20,00 g  
Polysorbát 80 ..... 1,00 g  
Citran amonný..... 2,00 g  
Octan sodný ..... 5,00 g  
Heptahydrát síranu hořečnatého ..... 0,20 g  
Tetrahydrát síranu manganatého..... 0,05 g  
Hydrogenfosforečnan (di)draselný ... 2,00 g  
Agar ..... 12,00 g  
Voda..... 1000,00 ml

Příprava: Příslušná navážka půdy byla rozpuštěna ve stanoveném množství destilované vody a po sterilaci v autoklávu (121 °C, 20 min) rozlita na Petriho misky.

## **7.3 Vlastní stanovení – mikrobiologická analýza**

Mikrobiologická analýza vzorků sýrů byla provedena po 49 a 98 dnech (od začátku výroby) zrání/skladování eidamských sýrů. Analyzovány byly vždy vzorky všech tří režimů zrání/skladování (tj. C, 3W i 5W).

Z analyzovaných cihel byl asepticky vykrojen středový pás (9 x 9 x 2 cm) a byl rozdělen na 4 vrstvy (I, II, III, IV). Vrstva I byla 7 mm od okraje, dalších 14 mm byla vrstva II, dalších 14 mm vrstva III a zbylý střed tvořil vrstvu IV.

Z takto připravených sýrů byl asepticky odebrán vzorek. 10 g sýra do 90 ml sterilního fyziologického roztoku a byla provedena patnáctiminutová homogenizace ve stomacheru. Z takto připravené suspenze bylo pro rutinní kontrolu očkováno na příslušné půdy (VČŽL pro stanovení možné přítomnosti koliformních bakterií, MRS pro stanovení bakterií mléčného kvašení, Slanetz-Bartley pro stanovení enterokoků, Anaerobic Agar

pro anaerobní sporuláty a Plate Count Agar pro celkové počty mikroorganismů) očkováno vždy 100  $\mu$ l suspenze zvoleného ředění.

Inkubace pro koliformní bakterie a enterokoky proběhla v termostatu s teplotou  $37 \pm 1$  °C po dobu 48 hodin. Bakterie mléčného kvašení, anaerobní sporuláty a celkové počty mikroorganismů byly inkubovány při teplotě  $30 \pm 1$  °C po dobu 48 – 72 hodin.

Stejným způsobem byla provedena mikrobiologická startérové kultury. Na základě informací od výrobce obsahovala bakterie *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* a *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* (Chr. Hansen, Nienburg/Weser, SRN).

Po kultivaci a nárůstu kolonií byly z Petriho misek vybrány odlišné kolonie bakterií pro další testy. Celkem bylo vyizolováno 8 různých kolonií ze zákysu, z vrstvy I první cihly 5 kolonií, z vrstvy IV celkem 8 kolonií. Z druhé cihly z I vrstvy bylo vybráno 13 kolonií a ze IV vrstvy 9 kolonií.

### 7.3.1 Barvení podle Grama

Teplem fixovaný nátěr inokula byl na podložním sklíčku převrstven krystalovou violetí a po 60 sekundách bylo barvivo slito a sklíčko krátce opláchnuto vodou. Následovalo moření Lugolovým roztokem po dobu 30 s a následně bylo barvivo opět slito a preparát byl krátce opláchnut vodou. Následně byl preparát po dobu 30 s odbarvován etanolem a na závěr byl dobarvován karbolfuchsinem po dobu 30 – 60 s.

Preparát byl opláchnut vodou a sklíčko osušeno filtračním papírem a ponechán na vzduchu doschnout. Takto připravené preparáty byly pozorovány mikroskopem v imerzním oleji.

### 7.3.2 Tvorba katalasy

Některé bakterie mají schopnost produkovat enzym katalasu, která rozkládá  $H_2O_2$  na vodu a molekulární kyslík. Na podložní sklo byl kápnut 3 %  $H_2O_2$ , do kterého byla pomocí očkovací kličky vnesena z agarové plotny testovaná kolonie 24 hodinové kultury. Pozitivní výsledek se projevil uvolňováním bublinek  $O_2$  bezprostředně po přidání kultury.

### 7.3.3 Detekce produkce biogenních aminů

Z vyizolovaných a purifikovaných bakterií byla zjišťována produkce biogenních aminů (histaminu, tyraminu, putrescinu a kadaverinu), nejprve pomocí skriningové kulti-vační metody za použití dekarboxylačního média podle Bover-Cid & Holzapfel [40].

Dekarboxylačního médium obsahovalo odpovídající aminokyseliny (histidin, tyrosin, lysin, arginin nebo ornitin) o koncentraci 1 % (w/w) a indikátor pH (bromkresol purpur).

**Složení kultivačního média pro detekci biogenních aminů:** hodnoty v g/100 ml média

Triton .....	0,5
Kvasničný extrakt .....	0,5
Masový extrakt .....	0,5
NaCl .....	0,25
glukosa .....	0,05
tween 80 .....	0,1
MgSO <sub>4</sub> .....	0,02
MnSO <sub>4</sub> .....	0,005
FeSO <sub>4</sub> .....	0,004
Citrát amonný .....	0,2
Thiamin .....	0,001
K <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> .....	0,2
CaCO <sub>3</sub> .....	0,01
Pyridoxal-5-fosfát .....	0,005
Příslušná aminokyselina .....	1,0
Bromkresol purpur .....	0,006
pH .....	5,3

Všechny chemikálie použité při přípravě dekarboxylázového média byly dodány společností Sigma Aldrich.

Testované bakterie byly kultivovány dvakrát v příslušných médiích (v souladu s médiem, ze kterého byly izolovány), které obsahovaly 0,1 % (w/w) odpovídající aminokyseliny a 0,005 % (w/w) pyridoxal-5-fosfátu. V dekarboxylázovém médiu byly izolované bakterie kultivované souběžně při teplotě  $37 \pm 1$  °C a  $30 \pm 1$  °C a výsledky byly posouzeny po 24, 48 a 72 hodinách. Pozitivní reakce se projevila v důsledku přítomnosti pH indikátoru změnou zbarvení ze žluté na fialovou.

#### 7.3.4 Biochemické testy API 50 CH

Bakterie izolované z provozního zákysu a dále bakterie, které byly pomocí skriningové kultivační metody označeny za potenciální producenty biogenních aminů, byly dále identifikovány pomocí biochemických testů API 50 CH a pomocí dalších doplňkových

testů, které jsou uvedeny níže. Identifikace byla provedena dle návodu výrobce ve spolupráci s Českou sbírkou mikroorganismů.

API 50 CH je standardizovaný systém 50 biochemických testů pro určování sacharidového metabolismu mikroorganismů.

#### API 50 CH a některé doplňující testy:

GLY – glycerol	MAL – D-maltosa
ERY – erythritol	LAC – D-laktosa
DARA – D-arabinosa	MEL – D-melibiosa
LARA – L-arabinosa	SAC – D-sacharosa
RIB – D-ribosa	TRE – D-trehalosa
DXYL – D-xyloza	INU – inulin
LXYL – L-xyloza	MLZ – D-melesitosa
ADO – D-adonitol	RAF – D-rafinosa
MDX – methyl- $\beta$ -D-xylopyranosa	AMD – amidon
GAL – D-galaktosa	GLYG – glykogen
GLU – D-glukosa	XLT – xylitol
FRU – D-fruktosa	GEN – gentiobinosa
MNE – D-manosa	TUR – D-turanosa
SBE – L-sorbosa	LYX – D-lyxosa
RHA – L-rhamnosa	TAG – D-tagatosa
DUL – dulcitol	DFUC – D-fukosa
INO – inositol	LFUC – L-fukosa
MAN – D-manitol	DARL – D-arabitol
SOR – D-sorbitol	LARL – L-arabitol
MDM – methyl- $\alpha$ -D-mannopyranosid	GNT – glukonát draselný
MDG – methyl- $\alpha$ -D-glukopyranosid	2KG – 2-ketoglukonát draselný
NAG – N-acetylglukosamin	5KG – 5-ketoglukonát draselný
AMY – amygdalin	GLG – produkce plynu z glukosy
ARB – arbutin	NH <sub>3</sub> – produkce amoniaku
ESC – eskulin	C15 – růst při teplotě 15 °C
SAL – salicin	C45 – růst při teplotě 45 °C
CEL – D-cellobiosa	

#### 7.3.5 Identifikace metodou rep-PCR

Metoda rep-PCR fingerprinting byla opět provedena ve spolupráci s Českou sbírkou mikroorganismů, a to v souladu s metodikou Švec et al. [41]. Amplikony byly syntetizovány za pomoci primeru (GTG)<sub>5</sub> (5'-GTG GTG GTG GTG GTG- 3').

Bakteriální DNA byla izolována metodou alkalické extrakce. PCR směs (v celkovém objemu 25  $\mu$ l) obsahovala 1  $\mu$ l buněčného lyzátu, 1  $\mu$ mol/l primeru (GTG)<sub>5</sub>, 200  $\mu$ mol/l každého dNTP, 2 U Taq DNA polymerasy a 2,5  $\mu$ l TermoPol reakčního pufru



(10 x koncentrovaného). PCR byla provedena v termocykleru T-personal (Biometra, SRN), na kterém byl nastaven následující program: počáteční denaturace při 94 °C po dobu 7 minut; následovalo 30 cyklů denaturace při 94 °C po dobu 1 minuty, nasednutí primerů (annealing) při 40 °C po dobu 1 minuty, a vlastní polymerační reakce při 65 °C 8 min. Poslední cyklus byl následován finální elongací při 65°C po 16 min.

Získané PCR produkty byly rozděleny horizontální elektroforézou pomocí 1,5% agarosového gelu (200 x 250 mm) v 0,5 x TBE pufru s konstantním napětím 60 V ( $\approx 1,7 \text{ V cm}^{-1}$ ) po dobu cca 16 hodin. Výsledné fingerpriny byly digitalizovány a zpracovány pomocí softwaru BioNumerics v.4.601. Obdržené rep-PCR profily byly porovnány s (GTG)<sub>5</sub>-PCR databází České sbírky mikroorganismů zahrnující zástupce kmenů *Lactobacillus*. Dendrogramy byly vypočteny pomocí Pearsonových korelačních koeficientů za použití metody numerické shlukové analýzy (UPGMA).

#### 7.4 Chromatografická detekce biogenních aminů

Médium po kultivaci bakterií bylo centrifugováno při 10 000 otáčkách za minutu po dobu 10 minut. Následně byla směs zfiltrována přes 0,45  $\mu\text{m}$  filtr 100  $\mu\text{l}$  takto připravené směsi bylo nastříknuto do analyzátoru aminokyselin AAA400 (Ingos, Praha, Česká republika), jehož součástí je kolona naplněná ionexem Ostion LG ANG (55 x 3,7 mm; Ingos, Praha, Česká republika). Detekce probíhala po postkolonové ninhydrinové derivatizaci spektrofotometrickým detektorem při 570 nm. Standardy biogenních aminů byly zakoupeny od Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). Každá směs byla analyzována minimálně dvakrát. Pokud byla koncentrace biogenních aminů ve směsi příliš vysoká, byl pro ředění použit dávkovací pufr. Stanovení probíhalo metodou dle Buňková a kol. (2009) a Hlobilová (2009) [44, 45].

## 8 VÝSLEDKY A DISKUZE

### 8.1 Stanovení počtu bakterií

Počty bakterií mléčného kvašení se v sýrech, které byly 49 dnů uloženy ve sklepe (C), pohybovaly v řádech  $10^7$  CFU/g, přičemž nejvíce jich bylo zjištěno v I. vrstvě, následně ve II. a méně ve IV. vrstvě (tabulka 2). V sýrech, které byly po 23 dnech přemístěny ze sklepa do lednice (3W), se počty pohybovaly v množství o jeden řád méně ( $10^6$  CFU/g) než v sýrech uložených po celou dobu experimentu ve zracím sklepe, což bylo způsobeno snížením teploty. Počty se opět směrem dovnitř sýra zmenšovaly. Sýry, které byly ze sklepa do lednice přemístěny po 38 dnech, obsahovaly počty bakterií řádově stejné (i když o něco nižší) jako sýry zrající po celou dobu ve sklepe. Opět se počty směrem dovnitř sýra zmenšovaly.

Tab. 2: Počty bakterií mléčného kvašení v jednotlivých vrstvách v závislosti na zrání/ skladování testovaných sýrů

Den odběru vzorku	Režim zrání/skladování	vrstva	Bakterie mléčného kvašení (log CFU/g)
49	C	I	$7.93 \pm 0.47$
		II	$7.61 \pm 0.38$
		IV	$7.48 \pm 0.32$
	3W	I	$6.78 \pm 0.42$
		II	$6.57 \pm 0.39$
		IV	$6.21 \pm 0.28$
	5W	I	$7.65 \pm 0.24$
		II	$7.42 \pm 0.36$
		IV	$7.31 \pm 0.22$
98	C	I	$6.91 \pm 0.39$
		II	$6.65 \pm 0.27$
		IV	$6.05 \pm 0.49$
	3W	I	$5.98 \pm 0.48$
		II	$5.56 \pm 0.59$
		IV	$5.28 \pm 0.21$
	5W	I	$6.22 \pm 0.42$
		II	$5.84 \pm 0.33$
		IV	$5.57 \pm 0.31$

Stejně stanovení proběhlo i po 98 dnech zrání/skladování sýrů. V tomto období počty bakterií mléčného kvašení ve všech testovaných sýrech i vrstvách poklesly oproti předchozímu stanovení zhruba o jeden řád. Počty bakterií mléčného kvašení byly opět

nejvyšší v sýrech uložených po celou dobu experimentu ve zracím sklepě (tabulka 2) a pohybovaly se v řádech  $10^6$  CFU/g. U sýrů, které byly po 3 týdnech přemístěny ze sklepa do lednice (3W) byly zjištěny počty BMK řádově  $10^5$ . Množství bakterií mléčného kvašení v sýrech uložených 5 týdnů ve sklepě (5W) bylo na rozmezí počtů zjištěných u sýrů uložených po celou dobu pokusu ve sklepě a sýrů přemístěných po 3 týdnech do lednice. Počty bakterií ze vzorků 3W byly vždy o řád nižší než počty BMK u sýrů označených C. Sýry 5W měly pro svou delší dobu skladování ve zracím sklepě počty více se blížící ke vzorkům C. Při každém stanovení byly počty ze všech vzorků uvnitř sýra nejnižší.

Během celého experimentu nebyly v žádném z analyzovaných vzorků sýrů na příslušných selektivních kultivačních půdách zachyceny koliformní bakterie, enterokoky ani anaerobní sporulující bakterie.

## 8.2 Identifikace bakterií

Všechny vybrané kolonie pro tyto testy (viz. kapitola 7.3.) byly označeny jako grampozitivní a katalasový test byl hodnocen jako negativní.

Ve spolupráci s Českou sbírkou mikroorganismů byla provedena identifikace bakterií, které byly pomocí kultivační metody v dekarboxylačním médiu (viz kapitola 7.3.3.) označeny za potenciální producenty biogenních aminů. Identifikace pomocí rep-PCR a na základě fenotypových znaků určila analyzované kmeny jako *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* (3 kmeny), *Lactobacillus plantarum* (1 kmen), *Lactobacillus casei/paracasei* (6 kmenů) a *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (4 kmeny).

Na základě biochemických charakteristik bylo zjištěno že kmeny Z-2 a AIV-9 jsou naprosto identické. Další blízká podobnost byla zjištěna u kmenů z provozního zákysu Z-3 a Z-6, a to zhruba na úrovni 96 %. Kmeny Z-2, Z-3, Z-6 a AIV-9 si byly podobny z cca 94 %. Podobné charakteristiky vykazoval i kmen Z-1. Těchto 5 kmenů vykazovalo odlišnost zhruba na úrovni 22 % a všechny byly identifikovány jako laktokoky. Další blízká podobnost byla zjištěna u kmenů označených AI-5 a AIV-13, stejně tak i u kmenů AIV-3 a AIV-11, jejichž podobnost byla přibližně na úrovni 97 %. Kmeny AI-5, AI-7, AIV-1, AIV-3, AIV-11, AIV-13 a AIV-18, tvořily skupinu laktobacilů s podobností 72 %.

Všechny tři izoláty *Lb. curvatus* (AI-2, AI-3, AIV-15) měly identický bioprofil a pravděpodobně se jedná o tentýž kmen. Naproti tomu izoláty komplexu *Lb. casei/paracasei* (AI-5, AIV-1, AIV-3, AIV-11, AIV-13, AIV-18) vykazovaly určité

rozdíly v biochemických charakteristikách, což pravděpodobně ukazuje na přítomnost rozdílných kmenů.

Tab. 3: Výsledky testu API 50 CH

Číslo	GLY	ERY	DARA	LARA	RIB	DXYL	LXYL	ADO	MDX	GAL	GLU	FRU	MNE	SBE	RHA	DUL	INO	MAN
Z-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0
Z-2	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1
Z-3	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1
Z-6	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0
AI-5	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1
AI-7	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1
AIV-1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1
AIV-3	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1
AIV-9	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	1
AIV-11	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1
AIV-13	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1
AIV-18	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1

Číslo	SOR	MDM	MDG	NAG	AMY	ARB	ESC	SAL	CEL	MAL	LAC	MEL	SAC	TRE	INU	MLZ	RAF	AMD
Z-1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0
Z-2	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1
Z-3	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1
Z-6	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1
AI-5	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	0
AI-7	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0
AIV-1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0
AIV-3	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	0
AIV-9	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1
AIV-11	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	0
AIV-13	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	0
AIV-18	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0

Číslo	GLY	XLT	GEN	TUR	LYX	TAG	DFUC	LFUC	DARL	LARL	GNT	2KG	5KG	GLG	NH3	C15	C45
Z-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
Z-2	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Z-3	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0
Z-6	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0
AI-5	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0
AI-7	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0
AIV-1	0	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0
AIV-3	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0
AIV-9	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AIV-11	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1
AIV-13	0	0	1	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0
AIV-18	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1

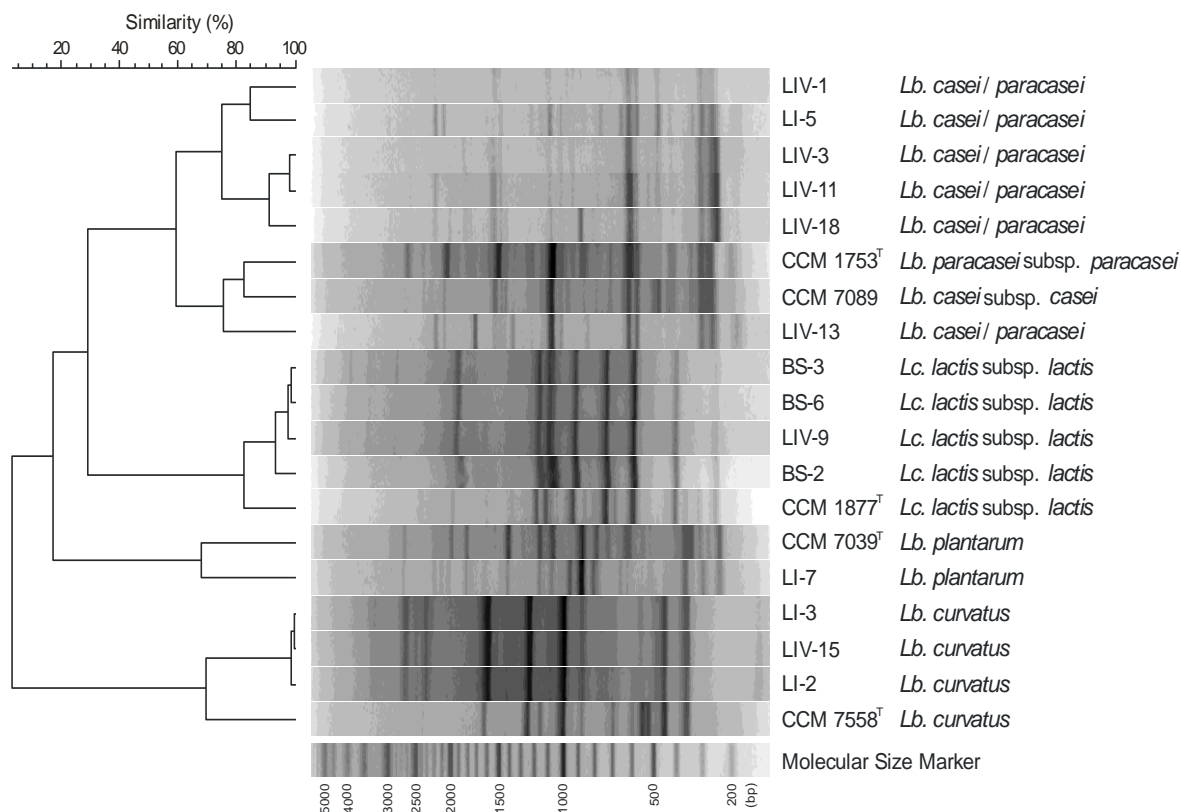
### Značení:

Z - provozní zákys; AI - vzorek odebraný z první vrstvy; AIV - vzorek odebraný ze čtvrté vrstvy; Číslo za pomlčkou ukazuje označení kmene; 1 - test prokazoval pozitivní výsledek; 0 - test prokazoval negativní výsledek.

Žádný z kmenů neutilizoval glycerol, L-xylosu, methyl- $\beta$ -D-xylopyranosu, L-rhamnosu, erythritol, glykogen, xylitol, D- a L-fucosu, methyl- $\alpha$ -D-mannonpyranosid, dulcitol, methyl- $\alpha$ -D-glukopyranosid (tabulka 3). Rovněž tak žádný z identifikovaných kmenů neprodukoval plyn z glukosy. Naopak všechny analyzované kmeny izolovaných bakterií, které byly označeny za potenciální producenty biogenních aminů, zkvašovaly D-galaktosu, D-glukosu, D-fruktosu a D-mannosu. D-laktosu uklizovaly všechny

stanovované kmeny s výjimkou kmene AIV-1. Tento kmen měl také u dalších testů odlišné výsledky. Při teplotě 15 °C byl pozorován růst většiny kmenů, na rozdíl od růstu při teplotě 45 °C.

Kromě biochemických a růstových charakteristik byly bakterie rovněž identifikovány metodou rep-PCR. Na základě získaných fingerprintů byla zjišťována jejich podobnost metodou UPGMA založenou na shlukové analýze (obrázek 7).



Obr. 7: Dendrogram vycházející ze shlukové analýzy rep-PCR fingerprintů kmenů izolovaných ze sýrů a provozního zákysu a referenčních kmenů

Fingerprinty získané metodou rep-PCR rozdělily analyzované izoláty do několika klusterů odpovídajících *Lb. curvatus* subsp. *curvatus*, *Lb. plantarum* a *Lb. casei/paracasei* a *L. lactis* subsp. *lactis* (obrázek 7). Tyto výsledky tak potvrdily výsledky identifikace získané pomocí biochemických a růstových charakteristik.

### 8.3 Detekce produkce biogenních aminů

Tvorba biogenních aminů bakteriemi, které byly identifikovány, a které skriningová metoda označila jako potenciálně producenty biogenních aminů, byla kvantifikována

pomocí iontově-výměnné chromatografie v dekarboxylačním médiu. Obsah biogenních aminů byl zhodnocen a rozdělen do 4 skupin (tabulka 4):

1. bez produkce biogenních aminů,
2. slabá produkce ( $\leq 10 \text{ mg.l}^{-1}$ ),
3. střední produkce ( $10 - 100 \text{ mg.l}^{-1}$ ),
4. silná produkce ( $> 100 \text{ mg.l}^{-1}$ ) biogenních aminů.

Tab. 4: Produkce biogenních aminů identifikovanými mikroorganismy

Zdroj izolace	Kmen	Druh	Produkce biogenních aminů		
			Tyramin	Putrescin	Kadaverin
Provozní zákys	BS-2	<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	-	-	-
	BS-3	<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	-	-	-
	BS-6	<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	-	-	-
Povrchová vrstva I	LI-2	<i>Lb. curvatus</i>	+++	++	+
	LI-3	<i>Lb. curvatus</i>	+++	+++	-
	LI-5	<i>Lb. casei/paracasei</i>	-	-	-
	LI-7	<i>Lb. plantarum</i>	++	-	-
Povrchová vrstva IV	LIV-1	<i>Lb. casei/paracasei</i>	-	-	-
	LIV-3	<i>Lb. casei/paracasei</i>	-	-	-
	LIV-9	<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	-	-	-
	LIV-11	<i>Lb. casei/paracasei</i>	++	-	+
	LIV-13	<i>Lb. casei/paracasei</i>	++	-	+
	LIV-15	<i>Lb. curvatus</i>	+++	+++	-
LIV-18	<i>Lb. casei/paracasei</i>	-	-	-	

Všechny kmeny byly negativní na produkci histaminu. Z testovaných mikroorganismů *Lb. curvatus* (LI-2) byl silným producentem tyraminu, středně produkoval také putrescin a slabě kadaverin. *Lb. curvatus* LI-3 byl silným producentem tyraminu a putrescinu. *Lb. plantarum* LI-7 produkoval pouze tyramin, produkce byla označena jako střední. *Lb. casei/paracasei* (LIV-11 a stejně tak LIV-13) produkoval tyramin středně silně a kadaverin slabě. Naproti tomu *Lb. curvatus* LIV-15 byl silným producentem dvou biogenních aminů, a sice tyraminu a putrescinu.

U žádného ze tří kmenů izolovaných z provozního zákysu nebyla zjištěna produkce žádného z biogenních aminů.

## 9 SOUHRNNÁ DISKUZE

Jako producenti biogenních aminů byly identifikovány kmeny *Lb. curvatus*, jehož tvorba biogenních aminů převažovala ve vrchní i střední vrstvě. Burdychová & Komprda [30] také izolovali tuto bakterii z přírodních sýrů holandského typu. V této studii byl *Lb. curvatus* stanoven jako výhradní producent putrescinu. Kromě putrescinu Pereira et al. [46] a Bover-Cid et al. [47] uvádí i produkci tyraminu. Jeden kmen této bakterie také produkoval kadaverin, což ale není podle dostupné literatury obvykle popisováno.

*Lactobacillus plantarum* byl jako původce biogenních aminů identifikován ve vrchní vrstvě, produkoval putrescin. Stejně tak uvádí ve své práci i Arena et al. [48] a Arena et al. [49] uvádí i produkci putrescinu.

*Lb. casei/paracasei* byl identifikován jako producent biogenních aminů ve střední vrstvě. U dvou z šesti izolovaných a identifikovaných kmenů byla zaznamenána produkce tyraminu a kadaverinu. Podle Wouters et al. [50] a Oner et al. [51] jsou *Lb. casei/paracasei* častými zástupci non-startérových bakterií mléčného kvašení v přírodních sýrech, ale podle Landete & Pardo [52] nepatří k obvyklým producentům biogenních aminů.

Histamin nebyl u žádných z bakterií detekován, přestože Komprda et al. [26, 36] uvádí vysokou produkci histaminu v přírodních sýrech.

Nejvyšší obsah biogenních aminů byl stanovený v sýrech, které zrály celou dobu ve sklepě. Menší pokles produkce byl zaznamenán v sýrech které se po 38 dnech přemístily ze zracích sklepů do lednice s nižší teplotou. A nejmenší produkce byla zaznamenána u sýrů, které se do lednice přemístili už po 23 dnech. Z toho lze soudit, že se sníženou teplotou skladování se zpomaluje tvorba biogenních aminů. Stejně tak uvádí i Gardini et al. [53] při kultivaci modelových bakterií mléčného kvašení, že růst koncentrace biogenních aminů se zpomaluje při poklesu teploty.

Na základě získaných výsledků lze vyslovit určitá doporučení pro minimalizaci výskytu biogenních aminů v eidamských sýrech. Mnohé studie ukazují na to, že se zvyšujícím se množstvím prekurzorů biogenních aminů se jejich produkce zvyšuje. Z tohoto důvodu je vhodné při výrobě fermentovaných potravin prověřovat nejen kmeny mikroorganismů, ale sledovat také koncentraci prekurzorů (tj. krátkých peptidů a volných aminokyselin) pro dekarboxylázové reakce.

Jak ukázaly výsledky, byly původci biogenních aminů v sýrech holandského typu non-starterové bakterie a/nebo spontánní mikroflóra. Proto lze z důvodu prevence produkce biogenních aminů v potravinách a zvýšení bezpečnosti potravin doporučit důsledné dodržování hygienických předpisů a podmínek správné výrobní praxe. Z hlediska vnějších faktorů a podmínek výroby a uchovávání eidamských sýrů volit takové úrovně těchto faktorů a podmínek, které minimalizují produkci biogenních aminů v potravinách a surovinách. Na druhou stranu je nutno tyto úrovně volit kompromisně tak, aby byly zachovány funkční a organoleptické vlastnosti výsledných produktů.



## ZÁVĚR

V bakalářské práci byla provedena mikrobiologická analýza přírodních sýrů holandského typu a následně identifikace mikroorganismů a detekce produkce biogenních aminů.

- Největší počty mikroorganismů byla stanovena ve vnějších vrstvách sýrů, směrem dovnitř počty klesaly.
- Izolované mikroorganismy byly převážně non-starterové bakterie mléčného kvašení, které byly identifikovány jako *Lb. curvatus*, *Lb. plantarum* a *Lb. casei/paracasei*.
- Nejvyšší produkce biogenních aminů byla stanovena v sýrech, které byly po celou dobu zrání umístěny ve zracích sklepech.
- Tyramin byl produkován třemi kmeny *Lb. curvatus*, jedním kmenem *Lb. plantarum* a dvěma kmeny *Lb. casei/paracasei*.
- Putrescin byl produkován třemi kmeny *Lb. curvatus*.
- Kadaverin byl produkován jedním kmenem *Lb. curvatus* a dvěma kmeny *Lb. casei/paracasei*.
- Produkce histaminu nebyla zjištěna u žádného kmene.
- Ze startérové kultury nebyla izolovaná žádná bakterie produkující biogenní aminy.

**SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY**

- [1] KADLEC, P., et al. *Technologie potravin II*. Vyd. 1. Praha 6: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Vydavatelství VŠCHT v Praze, 2002 (2007 dotisk). 236 s. ISBN 80-7080-510-2.
- [2] HRABĚ, J.; BŘEZINA, P.; VALAŠEK, P. *Technologie výroby potravin živočišného původu*. Vyd. 1. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2006. 180 s. ISBN 80-7318-405-2.
- [3] GÖRNER, Fridrich; VALÍK, Lubomír. *Aplikovaná mikrobiologie požívatin*. 1. Bratislava : MALÉ CENTRUM, 2004. 528 s. ISBN 80-967064-9-7.
- [4] SEDLÁČEK, Ivo. *Taxonomie prokaryot*. 1. Brno : Masarykova univerzita, 2007. 270 s. ISBN 80-210-4207-9.
- [5] Wikipedia. *The free encyclopedia* [online]. 11.2.2010 [cit. 2010-04-26]. Dostupné z WWW: <<http://en.wikipedia.org/wiki/Leuconostocaceae>>.
- [6] KLABAN, Vladimír. *Ilustrovaný mikrobiologický slovník*. 1. Praha : Galén, 2005. 654 s. ISBN 80-7262-341-9.
- [7] WOOD, Brian J. B.; HOLZAPFEL, W. H. . *The lactic acid bacteria : The genera of lactic acid bacteria*. 1. London : Blackie Academic & Professional, 1995. 398 s. Dostupné z WWW <[http://books.google.com/books?id=Q8B\\_WusVacsC&hl=cs&source=gbs\\_ViewAPI](http://books.google.com/books?id=Q8B_WusVacsC&hl=cs&source=gbs_ViewAPI)>. ISBN 0-7514-0215-X.
- [8] ROSYPAL, Stanislav, et al. *Obecná bakteriologie*. 1. Praha : Státní pedagogické nakladatelství, 1981. 749 s. ISBN 14-549-81.
- [9] SALMINEN, Seppo, et al. *Lacid acid bacteria : microbiological and functional aspects*. 2. New York : Marcel dekker, Inc, 1998. 637 s. ISBN 0-8247-0133-X.
- [10] ČERMÍNOVÁ, Nad'a, et al. *Čisté mlékařské kultury : Výroba, kontrola, použití*. 1. Praha : SNTL, 1984. 295 s. ISBN 04-806-84.
- [11] ŠILHÁNKOVÁ, Ludmila. *Mikrobiologie : pro potravináře a biotechnology*. 3. Praha : ACADEMIA, 2008. 363 s. ISBN 80-200-1024-6.
- [12] PRIEST, Fergus G., et al. *Brewing microbiology*. 3. New York : Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2003. 399 s. ISBN 0-306-47288-0.

- [13] CHMELAŘ, Dittmar , et al. *ZUova* [online]. SMAŽ [cit. 2010-04-26]. NRL pro anaerobní bakterie. Dostupné z WWW: <<http://www.zuova.cz/informace/nrlpab03.php>>.
- [14] INTERNATIONAL FOOD INFORMATION SERVICE. *Dictionary of Food Science and Technology*. 2. United Kingdom : International Food Information Service , 2009. 473 s. ISBN 978-1-4051-8740-4.
- [15] *Encyclopedia of food microbiology*. San Diego : Academic Press, 2000. 3 sv. ISBN 978-0-12-227070-3. ISBN 0-12-227070-3 (set).
- [16] DAVID R. ARAHAL, SÁNCHEZ E., et al (2008). Value of recI sequences for species identification and as a phylogenetic marker within the family „*Leuconostocaceae*“. *International mikrobiology*.
- [17] BLACKBURN, CLIVE DE W.; McCLURE, PETER J. *Foodborne Pathogens : Hazards, Risk Analysis and Control*. 2.nd edition: Woodhead Publishing, 2009. 1294 s. ISBN 978-1-84569-362-6.
- [18] FLICKINGER, MICHAEL C.; DREW, STEPHAN W. *Encyclopedia of Bioprocess Technology : Fermentation, Biocatalysis, and Bioseparation*. New York: John Wiley & Sons, 1999. 2896 s. ISBN 978-0-471-13822-8.
- [19] FOX, PATRICK F.; MCSWEENEY, et al. *Cheese - Chemistry, Physics and Microbiology*. 3. New york : Elsevier, 2004. 466 s. ISBN 978-0-12-263651-6.
- [20] STILES, M. E., HOLZAPFEL, W. H. (1997). Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *International Journal of Food Microbiology*, 36, 1-29.
- [21] WOUTERS, J. T. M., AYAD, E. H. E., HUGENHOLTZ, J., SMIT, G. (2002). Microbes from raw milk for fermented dairy products. *International Dairy Journal*, 12, 91-109.
- [22] GIRAFFA, G. (2004). Studying the dynamics of microbial populations during food fermentation. *FEMS Microbiology Reviews*, 28, 251-260.
- [23] BOVER-CID, S., HOLZAPFER, W.: *Improved screening procedure for biogenic amine production by lactic acid bacteria*, *International Journal of Food Microbiology*, 1999.
- [24] KODÍČEK, M. *dekarboxylace*. From *Biochemické pojmy : výkladový slovník* [online]. Praha: VŠCHT Praha, 2007 [cit. 2010-05-20]. Available from www: <[http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid\\_es-002/ebook.html?p=dekarboxylace](http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-002/ebook.html?p=dekarboxylace)>

- [25] HOZA, I.; KRAMÁŘOVÁ, D., *Potravinářská biochemie III*. 2008. Zlín : Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2008. 123 s. ISBN 978-80-7318-396-7.
- [26] KOMPRDA, T., SMĚLÁ, D., NOVICKÁ, K., KALHOTKA, L., ŠUSTOVÁ, K., PECHOVÁ, P., 2007. Content and distribution of biogenic amines in Dutch-type hard cheese. *Food Chem.* 102, 129-137.
- [27] ÖNER, Z.; SAĞDIÇ , O.; ŞİMŞEK, B. Lactic acid bacteria profiles and tyramine and tryptamine contents of Turkish tulum cheeses. *European Food Research and Technology*,. 2004, 216, 5, s. 455-459.
- [28] LANDETE, J. M., et al. Molecular methods for the detection of biogenic amine-producing bacteria on foods . *International Journal of Food Microbiology*. 2007, 117, 3, s. 258-269.
- [29] ANCÍN-AZPILICUETA, C.; GONZÁLEZ-MARCO, A.; JIMÉNEZ-MORENO, N. Current knowledge about the presence of amines in wine. *Food Science and nutrition*. 2008, 48, 3, s. 257-275.
- [30] BURDYCHOVÁ, R.; KOMPRDA, T. Biogenic amine-forming microbial communities in cheese. *FEMS Microbiol Lett.* 2007, 276, 2, s. 149-155.
- [31] LEUSCHNER, R. G. K.; KURIHARA, R. ; HAMMES, W. P. Effect of enhanced proteolysis on formation of biogenic amines by lactobacilli during Gouda cheese ripening . *International Journal of Food Microbiology*. 1998, 44, 1-2, s. 15-20.
- [32] MARTUSCELLI, M., et al. Production of biogenic amines during the ripening of Pecorino Abruzzese cheese . *International Dairy Journal*. 2005, 15, 6-9, p. 571-578.
- [33] GLÓRIA, M. B. A. Bioactive amines. In HUI, Y. H., et al. *Handbook of food science, technology, and engineering*. United States of America : CRC Press, 2006. ISBN 1-57444-551-0.
- [34] SILLA SANTOS, M. H. Biogenic amines: their importance in foods . *International Journal of Food Microbiology*. 1996, 29, 2-3, s. 213-231.
- [35] VARNAM, A. H.; SUTHERLAND, J. P. *Milk and Milk Products: Technology, Chemistry and Microbiology*. New York : Aspen Publishers, 1994. 451 s. ISBN 0-8342-1955-7.
- [36] KOMPRDA, T., et al. Tyramine production in Dutch-type semi-hard cheese from two different producers . *Food Microbiology*. 2008, 25, 2, s. 219-227.

- [37] ŽIŽKA, B., MARTINKOVÁ, Z. *Mikrobiologie pro 4.ročník SPŠ mlékárenské*. SNTL, 1990.
- [38] VLKOVÁ, H., BABÁK, V., HOLASOVÁ, M., SCHLEGELOVÁ, J., Biofilm a sanitace v prvovýrobě mléka a v mlékárenském průmyslu. In: Aktuální problémy potravinářské mikrobiologie 2007, Československá společnost mikrobiologická. 147 s.
- [39] *The prokaryotes : Bacteria: Firmicutes, Cyanobacteria* [online]. 3. USA : Springer, 2006 [cit. 2010-05-25]. Dostupné z WWW: <<http://books.google.com/books?id=FIWS5Q8udYC&printsec=frontcover&hl=cs#v=onepage&q&f=false>>. ISBN 0-387-25494-3.
- [40] BOVER-CID, S., HOLZAPFEL, W., H.: *Improved screening procedure for biogenic amine production by lactic acid bacteria, International Journal of Food Microbiology* 53, 33-41, 1999.
- [41] ŠVEC, p., VANCANNEYT, M., SEMAN, M., SNAUWAERT, C., LEFEBVRE, K., SEDLÁČEK, I., SWINGS, J., 2005. Evaluation of (GTG)5-PCR for identification of *Enterococcus* spp. *FEMS Microbiol. Lett.* 247, 59-63.
- [42] VAN HOORDLE, K., et al. Diversity of lactic acid bacteria in two Flemish artisan raw milk Gouda-type cheeses. *Food Microbiology*. 2008, 25, 7, s. 929-935.
- [43] MAIJALA, R.; EEROLA, S. Biogenic amines. In ROGINSKI, H.; FUQUAY, J.W.; FOX, P. F. *Encyclopedia of dairy sciences*. United Kingdom: AcademicPress, 2003. ISBN 0-12-227236-6.
- [44] Buňková, L., Buňka, F., Hlobilová, M., Vaňátková, Z., Nováková, D., Dráb, V. Tyramine production of technological important strains of *Lactobacillus*, *Lactococcus* and *Streptococcus*. *European Food Research and Technology*, 229, 2009, p. 533-538.
- [45] HLOBILOVÁ, M. *Srovnání metod pro detekci biogenních aminů u bakterií mléčného kvašení*. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2008.
- [46] PEREIRA, C. I., BARRETO CRESPO, M. T., SAN ROMANO, M.V., 2001. Evidence for proteolytic activity and biogenic amines production in *Lactobacillus curvatus* and *L. homohiochii*. *International Journal of Food Microbiology*. 66, 211-216.

- [47] BOVER-CID, S., MIGUÉLEZ-ARRIZADO, M. J., BECKER, B., HOLZAPFEL, W. H., VIDAL-CAROU, M. C., 2008. Amino acid decarboxylation by *Lactobacillus curvatus* CTC273 affected by the pH and glucose availability. *Food Microbiology*. 25, 269-277.
- [48] ARENA, M. E., FIOCCO, D., MANCA DE NADRA, M. C., PARDO, I., SPANO, G., 2007. Characterization of a *Lactobacillus plantarum* strain able to produce tyramine and partial cloning of a stative tyrosine decarboxylase gene. *Cuee. Microbiol.* 55, 205-210.
- [49] ARENA, M. E., MANCA DE NADRA, M. C., 2001. Biogenic amine production by *Lactobacillus*. *Journal of Applied Microbiology*. 90, 158-162.
- [50] WOUTERS, J. T. M., AYAD, E. H. E., HUGENHOLTZ, J., SMITH, G., 2002. Microbes from raw milk for fermented dairy products. *International Dairy Journal*. 12, 91-109.
- [51] ONER, Z., SAGDIC, O., SIMSEK, B., 2004. Lactic acid bacteria profiles and tyramine and tyramine contents of Turkish tulum cheese. *Eur. Food Res. Technol.* 219, 455-459.
- [52] LANDE, J. M., FERRER, S., PARDO, I., 2007. Biogenic amine production by lactic acid bacteria, acid bacteria and yeasts isolated from wine. *Food Control*. 18, 1569-1574.
- [53] GARDINI, F., MURTUSCELLI, M., CARUSO, M. C., et al. 2001. Effects of pH, temperature and NaCl concentration on the grow kinetics, proteolytic activity and biogenic amine production of *Enterococcus faecalis*. *International Journal of Food Microbiology*. 64, 105-117.

**SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK**

<i>Lb</i>	<i>Lactobacillus</i>
<i>Lc</i>	<i>Lactococcus</i>
<i>Ln</i>	<i>Leuconostoc</i>
BMK	bakterie mléčného kvašení
EMP	Embden-Meyerhof-Parnasova dráha ()
ČMK	čisté mlékařské kultury
NSLAB	non-startérové bakterie
UPGMA	metoda numerické shlukové analýzy
BA	biogenní aminy

**SEZNAM OBRÁZKŮ**

Obr. 1: Schéma výroby sýrů eidamského typu [1] .....	8
Obr. 2: Možné cesty metabolismu glukosy [6].....	17
Obr. 3: Vznik kyseliny mléčné z hexosy [8] .....	18
Obr. 4: Heterofermentativní zkvašování pentos [8].....	19
Obr. 5: Heterofermentativní zkvašování hexos [8].....	20
Obr. 6: Heterofermentativní kvašení uskutečňované Bifidobakteriemi [8].....	21
Obr. 7: Dendrogram vycházející ze shlukové analýzy rep-PCR fingerprintů kmenů izolovaných ze sýrů a provozního zákysu a referenčních kmenů .....	48



**SEZNAM TABULEK**

Tab. 1: Fermentace sacharidů mléka bakteriemi mezofilních zákysů při výrobě sýrů s nízkodohřívanou sýřeninou [3].....	10
Tab. 2: Počty bakterií mléčného kvašení v jednotlivých vrstvách v závislosti na zrání/ skladování testovaných sýrů.....	45
Tab. 3: Výsledky testu API 50 CH .....	47
Tab. 4: Produkce biogenních aminů identifikovanými mikroorganismy .....	49

## SEZNAM PŘÍLOH

P. I Článek publikovaný ve vědeckém časopise



Contents lists available at ScienceDirect

Food Microbiology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/fm



1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9 Q1  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55

56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65  
66  
67  
68  
69  
70  
71  
72  
73  
74  
75  
76  
77  
78  
79  
80  
81  
82  
83  
84  
85  
86  
87  
88  
89  
90  
91  
92  
93  
94  
95  
96  
97  
98  
99  
100  
101  
102  
103  
104  
105  
106  
107  
108  
109  
110

## The effect of ripening and storage conditions on the distribution of tyramine, putrescine and cadaverine in Edam-cheese

Leona Buňková<sup>a,\*</sup>, František Buňka<sup>b</sup>, Gabriela Mantlová<sup>b</sup>, Andrea Čablová<sup>b</sup>, Ivo Sedláček<sup>c</sup>, Pavel Švec<sup>c</sup>, Vendula Pachlová<sup>d</sup>, Stanislav Kráčmar<sup>d</sup>

<sup>a</sup> Department of Food, Textiles and Cosmetics Technology, Faculty of Technology, Tomas Bata University in Zlín, nam. T.G. Masaryka 275, 763 19 Zlín, Czech Republic  
<sup>b</sup> Department of Food Technology and Microbiology, Faculty of Technology, Tomas Bata University in Zlín, nam. T.G. Masaryka 275, Zlín, Czech Republic  
<sup>c</sup> Czech Collection of Microorganisms, Department of Experimental Biology, Faculty of Science, Masaryk University, Teréšova 14, Brno, Czech Republic  
<sup>d</sup> Department of Biochemistry and Food Analysis, Faculty of Technology Tomas Bata University in Zlín, nam. T.G. Masaryka 275, Zlín, Czech Republic

### ARTICLE INFO

**Article history:**  
Received 2 February 2010  
Received in revised form 24 April 2010  
Accepted 26 April 2010  
Available online xxx

**Keywords:**  
Biogenic amines  
Dutch-type cheese  
Ion-exchange chromatography  
Phenotype characterization  
Repetitive sequence-based PCR fingerprinting

### ABSTRACT

The aim of the work was to describe the development of selected biogenic amines (histamine, tyramine, putrescine and cadaverine) in 4 layers of Dutch-type cheese (Edam-cheese) depending on 3 ripening/storage regimes during a 98-day period. Biogenic amines were analysed by means of ion-exchange chromatography. A further goal was to identify microbial sources of biogenic amines in the material analysed. Phenotype characterization and repetitive sequence-based PCR fingerprinting were used to identify the isolated bacteria. The highest content of tyramine, putrescine and cadaverine was determined in cheeses stored in a ripening cellar at a temperature of 10 °C during the whole observation period. Lower biogenic amines content was determined in samples which were moved into a cold storage device (5 °C) after 38 days of storage in a ripening cellar (10 °C). The lowest concentrations of biogenic amines were detected in cheeses which were moved into a cold storage device (5 °C) after 23 days of storage in a ripening cellar (10 °C). During the 98-day period, histamine was not detected in any of the regimes. Within the cheeses analysed, non-starter lactic acid bacteria *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus casei/paracasei* and *Lactobacillus plantarum* were detected as the main producers of the biogenic amines tested. In starter bacteria *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* and *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* the decarboxylase activity tested was not detected.

© 2010 Published by Elsevier Ltd.

### 1. Introduction

Biogenic amines are low-molecular nitrogenous compounds that are formed in foodstuffs mainly by microbial decarboxylation of the precursor amino acids. Above all, the importance of observing biogenic amines content lies in potential toxicity to humans, mainly if the concentration is >100 mg/kg (or >100 mg/L). Thus, the presence of biogenic amines significantly influences the food quality and safety (Christensen et al., 1999; Halász et al., 1994; Silla Santos, 1996; Smit et al., 2005). Fermented dairy products and especially cheeses belong to the most common sources of biogenic amines, mainly histamine, tyramine, putrescine and cadaverine. The excessive intake of histamine could cause e.g. dilatation of peripheral blood vessels, hypotension, urticaria, flushing and headache. High amount of tyramine in food could also induce

headache and hypertension. In human body under normal condition, exogenous histamine and tyramine absorbed from food are detoxified by action of relevant enzymes. Putrescine and cadaverine have been identified as potentiators of toxic effect of other amines due to inhibition of detoxifying enzymes (Shalaby, 1996; Valsamaki et al., 2000).

Decarboxylase producers (containing enzymes decarboxylating certain amino acids while biogenic amines are formed) can be found among starter lactic acid bacteria, non-starter lactic acid bacteria (NSLAB) and/or other spontaneous microflora (Bernardeau et al., 2008; Christensen et al., 1999; de las Rivas et al., 2006; de Llano et al., 1998; Galgano et al., 2001; Halász et al., 1994; Macrobal et al., 2005; Roig-Sagués et al., 2002). From a qualitative and quantitative point of view, microorganisms in the individual layers of ripening cheese can vary, which can cause a different concentration of biogenic amines in different parts of cheese (Komprda et al., 2007; Novella-Rodríguez et al., 2003; Pinho et al., 2001). Studying the distribution of biogenic amines in the individual layers of cheeses as well as screening their sources (microorganisms) can contribute to the

\* Corresponding author. Tel: +420 576 031 232; fax: +420 577 210 172.  
E-mail address: bunikova@turbicx (L. Buňková).



## The effect of ripening and storage conditions on the distribution of tyramine, putrescine and cadaverine in Edam-cheese

Leona Buňková<sup>a,\*</sup>, František Buňka<sup>b</sup>, Gabriela Mantlová<sup>b</sup>, Andrea Čablová<sup>b</sup>, Ivo Sedláček<sup>c</sup>, Pavel Švec<sup>c</sup>, Vendula Pachlová<sup>d</sup>, Stanislav Kráčmar<sup>d</sup>

<sup>a</sup> Department of Food, Textiles and Cosmetics Technology, Faculty of Technology, Tomas Bata University in Zlín, nám. T.G. Masaryka 275, 763 19 Zlín, Czech Republic

<sup>b</sup> Department of Food Technology and Microbiology, Faculty of Technology, Tomas Bata University in Zlín, nám. T.G. Masaryka 275, Zlín, Czech Republic

<sup>c</sup> Czech Collection of Microorganisms, Department of Experimental Biology, Faculty of Science, Masaryk University, Trávníka 14, Brno, Czech Republic

<sup>d</sup> Department of Biochemistry and Food Analysis, Faculty of Technology Tomas Bata University in Zlín, nám. T.G. Masaryka 275, Zlín, Czech Republic

### ARTICLE INFO

**Article history:**  
Received 2 February 2010  
Received in revised form  
24 April 2010  
Accepted 26 April 2010  
Available online xxx

**Keywords:**  
Biogenic amines  
Dutch-type cheese  
Ion-exchange chromatography  
Phenotype characterization  
Repetitive sequence-based PCR  
Fingerprinting

### ABSTRACT

The aim of the work was to describe the development of selected biogenic amines (histamine, tyramine, putrescine and cadaverine) in 4 layers of Dutch-type cheese (Edam-cheese) depending on 3 ripening/storage regimes during a 98-day period. Biogenic amines were analysed by means of ion-exchange chromatography. A further goal was to identify microbial sources of biogenic amines in the material analysed. Phenotype characterization and repetitive sequence-based PCR fingerprinting were used to identify the isolated bacteria. The highest content of tyramine, putrescine and cadaverine was determined in cheeses stored in a ripening cellar at a temperature of 10 °C during the whole observation period. Lower biogenic amines content was determined in samples which were moved into a cold storage device (5 °C) after 38 days of storage in a ripening cellar (10 °C). The lowest concentrations of biogenic amines were detected in cheeses which were moved into a cold storage device (5 °C) after 23 days of storage in a ripening cellar (10 °C). During the 98-day period, histamine was not detected in any of the regimes. Within the cheeses analysed, non-starter lactic acid bacteria *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus casei/paracasei* and *Lactobacillus plantarum* were detected as the main producers of the biogenic amines tested. In starter bacteria *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* and *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* the decarboxylase activity tested was not detected.

© 2010 Published by Elsevier Ltd.

### 1. Introduction

Biogenic amines are low-molecular nitrogenous compounds that are formed in foodstuffs mainly by microbial decarboxylation of the precursor amino acids. Above all, the importance of observing biogenic amines content lies in potential toxicity to humans, mainly if the concentration is >100 mg/kg (or >100 mg/L). Thus, the presence of biogenic amines significantly influences the food quality and safety (Christensen et al., 1999; Halász et al., 1994; Silla Santos, 1996; Smit et al., 2005). Fermented dairy products and especially cheeses belong to the most common sources of biogenic amines, mainly histamine, tyramine, putrescine and cadaverine. The excessive intake of histamine could cause e.g. dilatation of peripheral blood vessels, hypotension, urticaria, flushing and headache. High amount of tyramine in food could also induce

headache and hypertension. In human body under normal condition, exogenous histamine and tyramine absorbed from food are detoxified by action of relevant enzymes. Putrescine and cadaverine have been identified as potentiators of toxic effect of other amines due to inhibition of detoxifying enzymes (Shalaby, 1996; Valsamaki et al., 2000).

Decarboxylase producers (containing enzymes decarboxylating certain amino acids while biogenic amines are formed) can be found among starter lactic acid bacteria, non-starter lactic acid bacteria (NSLAB) and/or other spontaneous microflora (Bernardeau et al., 2008; Christensen et al., 1999; de las Rivas et al., 2006; de Llano et al., 1998; Galgano et al., 2001; Halász et al., 1994; Marçal et al., 2005; Roig-Sagués et al., 2002). From a qualitative and quantitative point of view, microorganisms in the individual layers of ripening cheese can vary, which can cause a different concentration of biogenic amines in different parts of cheese (Komprda et al., 2007; Novella-Rodríguez et al., 2003; Pinho et al., 2001). Studying the distribution of biogenic amines in the individual layers of cheeses as well as screening their sources (microorganisms) can contribute to the

\* Corresponding author. Tel: +420 576 031 232; fax: +420 577 210 172.  
E-mail address: bunjkova@tuth.cz (L. Buňková).

111 prevention of biogenic amines content and thus increase the safety of  
112 food (Buřková et al., 2009).

113 A wide range of cheeses made by different technologies can be  
114 bought on the market. According to Fox et al. (2000), Edam-cheese  
115 (Dutch-type cheese) is one of the most widespread groups of  
116 cheeses. Optimum ripening time of these products is 6–10 weeks,  
117 usually at a temperature of 10–14 °C. However, nowadays, young  
118 cheeses (2–4 weeks old) are delivered to retail by many producers  
119 for economic reasons. Regarding the globalization of distribution  
120 channels and an excess of supply over demand on the dairy product  
121 market, this process can last several weeks. Further cold storage can  
122 be expected at the consumer's place till the moment of consumption  
123 (Al-Otaibi and Wilbey, 2004; Forde and Fitzgerald, 2000;  
124 McSweeney et al., 2006). The question remains whether and to  
125 what extent the content of biogenic amines in cheeses changes  
126 during the distribution process at cold storage temperatures.

127 The development of biogenic amines content in Dutch-type  
128 cheese during ripening was also studied by Burdychová and  
129 Komprda (2007) and Komprda et al. (2007, 2008). However, their  
130 work dealt with cheeses produced in large blocks (12–13 kg),  
131 ripening at optimum temperature ~10 °C, which are mainly used  
132 for further industrial processing (grating, slicing, blocks, processed  
133 cheese) and only then for sale. On the other hand, also smaller  
134 blocks weighing 1–3 kg are stored and sold in retail. They are either  
135 sold in one piece or cut into portions according to the customer's  
136 needs. However, available literature does not provide enough  
137 information about the content and distribution of biogenic amines  
138 in small blocks at cold storage temperatures in retail. Furthermore,  
139 the shelf life of cheese blocks could also be affected by ripening  
140 and/or storing condition (Fox et al., 2000). There are not many  
141 works which deal with the determination of biogenic amines  
142 content and at the same time with the isolation and identification  
143 of the sources.

144 The principal aim of this work was to describe the development  
145 of biogenic amines content (histamine, tyramine, putrescine and  
146 cadaverine) in 4 layers of small Edam-cheese blocks during the  
147 ripening and storage period. The distribution of biogenic amines  
148 content was observed in relation to 3 different ripening/storage  
149 regimes in order to simulate current conditions in manufacturing  
150 and retail. Another aim of the study was identification of isolated  
151 lactic acid bacteria (LAB) as a presumptive source of biogenic  
152 amines and determination of their decarboxylase activity.

## 153 2. Materials and methods

### 154 2.1. Cheese sampling

155  
156 Edam-cheese samples (50 % w/w dry matter and 30 % w/w fat in  
157 dry matter; Dutch-type cheese variety similar to Gouda with a few  
158 small eyes) were obtained from 3 batches as part of the standard  
159 production from a manufacturer making products from pasteurized  
160 milk within the Czech Republic (briefly, standardized milk was  
161 inoculated using bulk starter, precipitated using rennet and the  
162 curd was treated; then a whey part was drained off and hot  
163 water was added to obtain temperature of about 40 °C; the curd  
164 was drained, pressed and brined). All 3 batches were made  
165 according to the same technological process on the same day.  
166 Seventy four blocks were taken from each batch. Cryovac wrapped  
167 Edam-cheese blocks (1.2–1.4 kg; approx. 9 cm height, 9 cm width  
168 and 14 cm depth) were put into a ripening cellar with a tempera-  
169 ture of 10 ± 2 °C. After 23 days (from the beginning of the  
170 production), 20 blocks from each batch were moved from the cellar  
171 into the fridge (5 ± 1 °C), where the storage period continued  
172 (marked as 3W). After 38 days of ripening (from the beginning of  
173 the production), another 14 blocks from each batch were moved

174 into the fridge (marked as 5W). The remaining part of the blocks  
175 from each batch (marked as C) stayed in the ripening cellar for the  
176 whole time of the experiment (98 days in total). Samples were  
177 taken from the cellar (and later also from the fridge) on the 1st, 2nd,  
178 3rd, 4th, 7th, 10th, 13th, 16th, 20th, 23rd, 27th, 34th, 38th, 43rd,  
180 49th, 56th, 63rd, 70th, 84th and 98th day from the beginning of  
181 the production (on the 1st day the cheeses were made, pressed and  
182 brine-salted, on the 2nd day the cheeses were removed from the  
183 brine bath, wrapped and stored in a ripening cellar). On each day of  
184 the analysis, 2 parallel blocks from each batch and each ripening/  
185 storage regime were taken.

186 From each sample of block, a central strip (approx. 9 cm height,  
187 9 cm width and 2 cm depth) was aseptically cut out transversely.  
188 This central strip was aseptically divided into 4 layers: 7 mm from  
189 the border (edge, layer I), another 14 mm (layer II), another 14 mm  
190 (layer III) and the remaining middle part (core, layer IV). Each  
191 of these layers was analysed within the individual days when the  
192 samples were taken. Firstly, the samples for microbiological anal-  
193 ysis were obtained (if it was performed – see below) and subse-  
194 quently, the samples for the analysis of biogenic amines content  
195 were taken. On each day of the analysis, dry matter content and pH  
196 of tested layers were measured. The dry matter content was  
197 determined by gravimetric method according to ISO 5534 (2004).  
198 The values of pH were obtained using WP pH-meter Spear  
199 Oakton (Eutech Instruments, Malaysia). Each type of sample and  
200 each layer was analysed in six replicates for dry matter content and  
201 in triplicates for pH.

### 202 2.2. Microbiological analysis and screening of decarboxylase 203 activity of the isolated strains by means of cultivation method

204 Ten grams of the cheese sample (each layer) was weighed out  
205 aseptically and put into 90 ml of sterile physiological solution that  
206 was subsequently homogenised for 10 min (using stomacher). The  
207 samples of cheese were then subjected to routine microbiological  
208 analysis aimed at coliforms (Violet Red Bile Agar; HIMedia, Bombay,  
209 India) and lactic acid bacteria (De Man-Rogosa-Sharpe medium;  
210 Oxoid, Basingstoke, UK). Lactic acid bacteria were incubated for  
211 72 h at 30 °C and coliforms were incubated for 48 h at 37 °C.  
212 Microbiological analysis was performed on the 49th and 98th day  
213 of the experiment. Microbiological results were statistically evalu-  
214 ated by nonparametric Kruskal–Wallis and Mann–Whitney tests  
215 using statistical programme Unistat® 5.5 (Unistat Ltd, London, UK).

216 Apart from the cheese samples, bulk starter (BS) containing  
217 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* and *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*  
218 strains (Chr. Hansen, Nienburg/Wezer, Germany) was also analysed  
219 on the day of cheese production. However, the proportional  
220 representation of the individual strains is subject to trade secret.  
221 The same BS was used for all 3 batches.

222 A countable number of bacterial colonies (from each cultivation  
223 medium) selected randomly from a Petri dish was purified by  
224 spreading single colonies. Isolation and purification of bacteria was  
225 performed only in BS and the cheeses at the end of the ripening/  
226 storage period (98th day of the experiment, layers I and IV).

227 Isolated and purified lactic acid bacteria (LAB) were subjected to  
228 screening cultivation method detecting the production of biogenic  
229 amines (histamine, tyramine, putrescine and cadaverine), for the  
230 purpose of which decarboxylation medium (agar) according to  
231 Bover-Cid and Holzappel (1999) was used. The agar contained  
232 a corresponding amino acid (histidine, tyrosine, lysine, ornithine or  
233 arginine) at a concentration of 1% (w/v) and a pH indicator  
234 (bromocresol purple). The screening cultivation test is a qualitative  
235 method (the change of colour in the agar is observed). Firstly, the  
236 strains tested were subcultured twice in relevant broths (according  
237 to the medium they were isolated from) containing 0.1% (w/v) of

the corresponding amino acid and 0.005% (w/v) of pyridoxal-5-phosphate. In the decarboxylation agar, the isolated bacteria were cultured parallelly at  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  and  $30 \pm 1^\circ\text{C}$  and the results were evaluated after 24, 48 and 72 h. All chemicals used for the preparation of decarboxylation medium were supplied by Sigma–Aldrich (St. Louis, USA).

### 2.3. Identification

LAB which revealed positive production of biogenic amines (tyramine, putrescine or cadaverine; see section 2.2) in the cultivation test as well as the bacteria isolated from BS were identified on the basis of phenotype characterization and rep-PCR fingerprinting method.

#### 2.3.1. Phenotyping

The catalase test was done by dispersing bacterial cells in 3%  $\text{H}_2\text{O}_2$ . The tests for growth at 15 and 45 °C were performed in MRS broth (Merck, Darmstadt, Germany). Gas production from glucose and  $\text{NH}_3$  production from arginine were performed according to Švec et al. (2005, 2009). Further biochemical characterization was done by API 50 CH kit (bioMérieux, Marcy l’Etoile, France) according to the manufacturer’s instructions. Evaluation of the biochemical test results and species identification were achieved by using the Internet identification tool Apiweb (bioMérieux; <https://apiweb.biomerieux.com/>) and identification software BactSelect v 8.0 (LMD, Delft, The Netherlands).

#### 2.3.2. Repetitive sequence-based PCR fingerprinting

The rep-PCR fingerprinting using the  $(\text{GTG})_5$  primer (5'-GTG GTG GTG GTG GTG-3') was performed according to Švec et al. (2005, 2009). Briefly, bacterial DNA was isolated by alkaline extraction procedure. In total, 1 µL of cell lysate and 24 µL of a PCR mixture containing 1 µmol/L of  $(\text{GTG})_5$  primer, 200 µmol/L of each dNTP, 2 U of Taq DNA polymerase (New England Biolabs, County Road, USA) and 2.5 µL of 10× ThermoPol Reaction Buffer supplied with the Taq DNA polymerase (100 mmol/L KCl, 100 mmol/L  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 200 mmol/L Tris–HCl, 20 mmol/L  $\text{MgSO}_4$ , 0.1% Triton X-100; pH 8.8) were included into PCR reactions performed in Personal ThermoCycler (Biometra, Goettingen, Germany). The initial denaturation at 94 °C for 7 min was followed by 30 cycles of denaturation at 94 °C for 1 min, primer annealing at 40 °C for 1 min, and extension at 65 °C for 8 min. The last cycle was followed by the final elongation at 65 °C for 16 min. The PCR products obtained were separated in 1.5% agarose gels (200 × 250 mm) for 16 h at 60 V (=1.7 V/cm) in 0.5× TBE buffer (Fluka, Buchs, Switzerland). The resulting fingerprints were digitised and processed using BioNumerics version 4.601 software (Applied-Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium). The rep-PCR profiles were compared to the in-house  $(\text{GTG})_5$ -PCR database of the Czech Collection of Microorganisms comprising multiple type and representative LAB strains. The dendrogram was calculated with Pearson’s correlation coefficients by means of unweighted pair group method using arithmetic averages (UPGMA) clustering method.

### 2.4. Biogenic amines analysis

One gram of a grated cheese sample was weighed, put into 50 mL test tubes and poured by 4 mL of sodium-citrate buffer (pH 2.2). The mixture was homogenised for 15 min, mixed for 1 h at room temperature ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ) and then centrifuged ( $15,000 \times g$  for 30 min at 4 °C) in order to separate the fat. The supernatant was filtered and the solid residue was extracted for the second time by the above-mentioned method. Combined extracts were poured by

sodium-citrate buffer (pH 2.2) till 10 mL in a volumetric flask. Then the mixture was filtered through a 0.45 µm filter and loaded into the Amino Acid Analyser (injection volume of 100 µL was applied onto the column). Each sample was extracted twice.

LAB isolates which proved positive in the cultivation method (qualitative test, see section 2.2) were tested for the production of biogenic amines. Biogenic amines content was analysed in broth after the inoculation and incubation by the corresponding bacterium. De Man–Rogosa–Sharpe broth contained proper precursors of the biogenic amines tested (the following amino acids: lysine, histidine, tyrosine, ornithine, arginine) at a concentration of 3.0 g/L (of each amino acid) and. The same concentration of biogenic amine precursors was used by Buřková et al. (2010) or Pircher et al. (2007). The prepared medium (5.0 mL) was autoclaved in cap glass tubes (121 °C, 15 min). Each strain (11 isolates from cheese and 3 isolates from BS) was inoculated in three autoclaved tubes containing the cultivation broth. The bacteria were incubated at  $30 \pm 1^\circ\text{C}$  for 72 h. After the incubation, the broth was centrifuged ( $10,000 \times g$  for 30 min at 4 °C) in order to remove cells. The mixture was filtered through a 0.45 µm filter and loaded into the Amino Acid Analyser (the injection volume was also 100 µL) for quantitative assay.

Four biogenic amines (histamine, tyramine, putrescine, cadaverine) were determined by means of ion-exchange chromatography (AAA400 Amino Acid Analyser; Irgos, Prague, Czech Republic) as was described by Buřková et al. (2009). Each broth was analysed four times and each extract twice. In preliminary study using also Dutch-type cheese, the limit of detection was 0.74; 0.89; 0.72 and 0.60 mg/kg cheese for histamine, tyramine, putrescine and cadaverine, respectively. The repeatability of the whole analytical process (expressed as relative standard deviation of peak area determined for four extracts of the same cheese) ranged between 2.8 and 5.7% for individual biogenic amines tested. The recovery was of 91; 85; 81 and 88% for histamine, tyramine, putrescine and cadaverine, respectively (a cheese sample spiked using the standard mixture of tested biogenic amines at the concentration of 5 mg/L).

Biogenic amines results were statistically evaluated by nonparametric Kruskal–Wallis and Mann–Whitney tests. Spearman correlation coefficients between the biogenic amines content and the values of chemical analyses (the dry matter content and pH values) were also applied. The statistical programme Uristat<sup>®</sup> 5.5 (Unistat Ltd., London, UK) was used.

## 3. Results

### 3.1. Biogenic amines content in the individual layers

Within the 98-day ripening/storage period of the Edam-type cheeses tested, the presence of tyramine, putrescine and cadaverine was observed. On the other hand, during the whole experiment, histamine was not detected in any of the 3 ripening/storage regimes tested. At the beginning of experiment (2nd day – cheeses after removing from the brine bath) the dry matter content in the layer I, II, III and IV was  $54.89 \pm 0.21\%$  (w/w),  $51.62 \pm 0.18\%$  (w/w),  $49.33 \pm 0.27\%$  (w/w) and  $49.43 \pm 0.20\%$  (w/w) respectively. From the 30th day on, the dry matter content in the layer I was significantly higher ( $53.09$ – $53.52\%$  w/w;  $P < 0.01$ ) than the dry matter content in the other layers (II–IV), which was in the range of  $51.17$ – $51.84\%$  (w/w). At the second day of analysis, the pH value was similar in all tested cheese layers and ranged between 5.38 and 5.45. At the fourth day, the pH values decreased significantly ( $P < 0.01$ ) to 5.21–5.28 in the layers tested. From the fourth day, the pH values showed opposite trend and increased continuously up to

371 43rd day. From the forty third day, the pH values were ranging  
372 between 5.53 and 5.64 in all samples and layers.

373 The development of tyramine, putrescine and cadaverine in the  
374 41 layers of Edam-cheese block tested during the 3 ripening/storage  
375 regimes is illustrated in Figs. 1–3 (parts A–C). In all ripening/  
376 storage regimes tested, the highest content of tyramine, putrescine  
377 and cadaverine was found in the edge. On the other hand, the  
378 lowest content was detected in the cheese core. This significant  
379 difference ( $P < 0.01$ ) in the content of tyramine, putrescine and  
380 cadaverine between the edge and core is evident mainly from the  
381 30th day on, regardless of the ripening/storage regime. From the  
382 beginning of ripening/storage, the content of tyramine, putrescine  
383 and cadaverine in the layers II and III was very similar ( $P \geq 0.05$ )  
384 and therefore, from the 56th day on, these two layers were joined  
385 and analysed as one layer. The values of tyramine, putrescine and  
386 cadaverine content in the layers II and III were always between the  
387 values of these biogenic amines in the edge and core. In most cases,  
388 the difference between the layers II and III and the edge and core  
389 was significant ( $P < 0.01$ ).

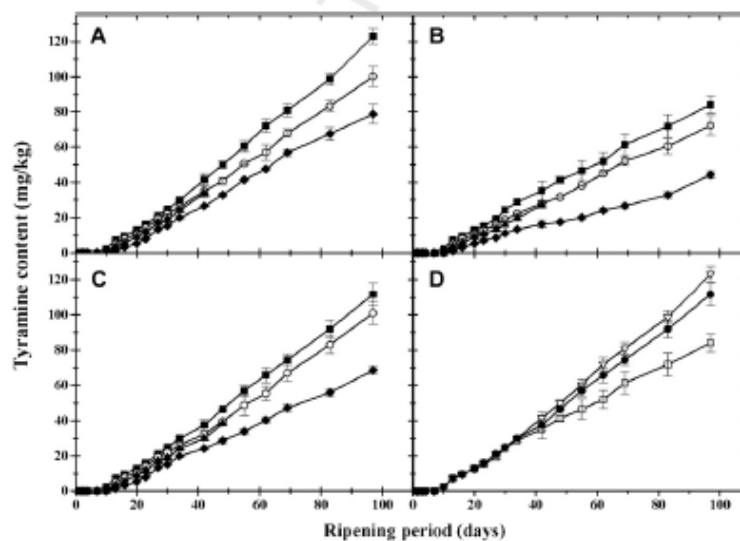
390 Also, as it follows from Figs. 1–3, there is dependence of tyra-  
391 mine, putrescine and cadaverine content in the Edam-cheeses  
392 tested on the ripening/storage regime. The cheeses kept for the  
393 whole ripening period in the ripening cellar at a temperature of  
394  $10^\circ\text{C}$  (Figs. 1–3, parts C) had, in all layers tested, the highest content  
395 of tyramine, putrescine and cadaverine in comparison with the  
396 other two ripening/storage regimes. Comparison of the content of  
397 the above-mentioned biogenic amines in the cheese edge within  
398 the 3 ripening/storage regimes tested is illustrated in Figs. 1–3,  
399 parts D. The lowest values of tyramine, putrescine and cadaverine  
400 content were found in all layers of the products kept for the first 23

431 days in the ripening cellar and subsequently kept at cold storage  
432 temperature (3W) ( $P < 0.01$ ). The content of tyramine, putrescine  
433 and cadaverine in the samples kept for the first 38 days in the  
434 ripening cellar and then at cold storage temperature (5W) were  
435 between the values of biogenic amines tested in the corresponding  
440 layers in cheeses C and 3W. In most cases, the difference was  
441 significant ( $P < 0.05$ ).

### 442 3.2. Lactic acid bacteria and coliform counts in the individual layers

443 The microbiological analysis focused on determining LAB counts  
444 in the individual layers of cheeses were carried out after 49 and 98  
445 days of ripening/storage. The results of LAB counts in the layers I, II  
446 and IV are illustrated in Table 1. After 49 days, the highest LAB  
447 counts occurred in the layer I and the lowest ones in the layer IV in  
448 all three ripening/storage regimes. However, these differences were  
449 not significant in any ripening/storage regime ( $P \geq 0.05$ ). After 98  
450 days, the situation changed and the LAB counts in the layer I were  
451 significantly higher compared with the layer IV ( $P < 0.05$ ) in all 3  
452 ripening/storage regimes tested.

453 After 49 days, the LAB counts in the individual layers of 3W  
454 samples were significantly lower ( $P < 0.05$ ) in comparison with  
455 the corresponding layers of C and 5W products. On the other  
456 hand, no significant differences in LAB counts ( $P \geq 0.05$ ) were  
457 found between C and 5W samples (in the corresponding layers).  
458 After 98 days, LAB counts in the corresponding layers proved to  
459 be the highest in cheeses C, followed by 5W samples and the  
460 lowest counts were determined in 3W products. On the basis of  
461 statistical analysis, these differences were evaluated as signifi-  
462 cant ( $P < 0.05$ ).



432 Fig. 1. The dependence of tyramine content (mg/kg) in Edam-cheese on the ripening period (days): A – storage in cellar at  $10 \pm 2^\circ\text{C}$  for the whole period; B – after 3 weeks of  
433 storage in cellar removed to the fridge and stored at  $5 \pm 1^\circ\text{C}$ ; C – after 5 weeks of storage in cellar removed to the fridge and stored at  $5 \pm 1^\circ\text{C}$ ; D – after 3 weeks of  
434 storage in cellar removed to the fridge and stored at  $5 \pm 1^\circ\text{C}$ . In D – part, summary of the tyramine content in the first layer in three storage modes: ▼ – the whole period in cellar at  $10 \pm 2^\circ\text{C}$ ;  
435 □ – after 3 weeks of storage in cellar removed to the fridge and stored at  $5 \pm 1^\circ\text{C}$ ; ● – after 5 weeks of storage in cellar removed to the fridge and stored at  $5 \pm 1^\circ\text{C}$ . The tyramine  
436 content was expressed as mean; bars represent S.D. ( $n = 34$ ).

Please cite this article in press as: Buřková, L., et al., The effect of ripening and storage conditions on the distribution of tyramine, putrescine...  
Food Microbiology (2010), doi:10.1016/j.fm.2010.04.014

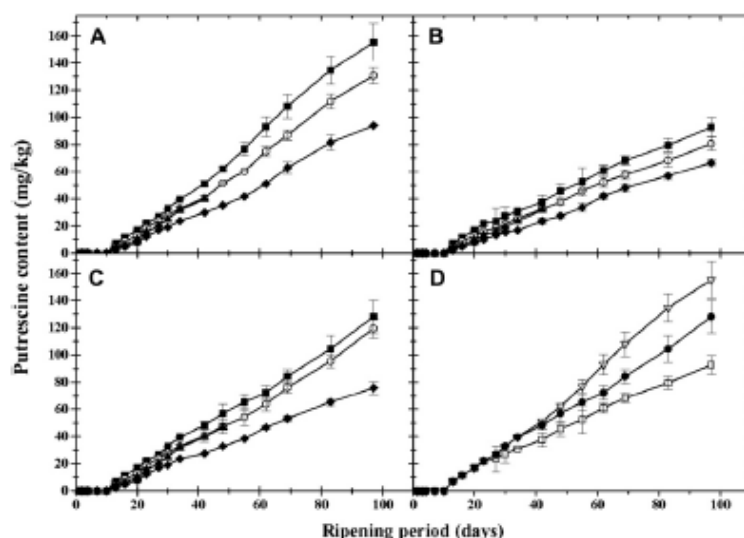


Fig. 2. The dependence of putrescine content (mg/kg) in Edam-cheese on the ripening period (days): A – storage in cellar at  $10 \pm 2^\circ\text{C}$  for the whole period; B – after 3 weeks of storage in cellar removed to the fridge and stored at  $5 \pm 1^\circ\text{C}$ ; C – after 5 weeks of storage in cellar removed to the fridge and stored at  $5 \pm 1^\circ\text{C}$ ; D – after 3 weeks of storage in cellar removed to the fridge and stored at  $5 \pm 1^\circ\text{C}$ . In D – part, summary of the putrescine content in the first layer in three storage modes:  $\nabla$  – the whole period in cellar at  $10 \pm 2^\circ\text{C}$ ;  $\square$  – after 3 weeks of storage in cellar removed to the fridge and stored at  $5 \pm 1^\circ\text{C}$ ;  $\bullet$  – after 5 weeks of storage in cellar removed to the fridge and stored at  $5 \pm 1^\circ\text{C}$ . The putrescine content was expressed as a mean; bars represent SD. ( $n=24$ ).

The LAB counts found after 49 days of ripening/storage were significantly higher ( $P < 0.05$ ) in comparison with the counts determined after 98 days of ripening/storage (comparing the corresponding layers and ripening/storage regimes).

During the whole microbiological analysis, no  *molds*  microorganisms were detected in any of the cheeses or BS tested.

### 3.3. Identification of the isolated LAB and determination of their biogenic amines production

The isolation of microorganisms from cheeses (with the aim of determining the production of selected biogenic amines – histamine, tyramine, putrescine or cadaverine) was performed only after 98 days of ripening/storage. In total, 58 microorganisms were isolated by means of De Man–Rogosa–Sharpe medium and their decarboxylation activity was tested by screening, using the cultivation method according to Bover-Cid and Holzapfel (1999). The cultivation method revealed that 11 isolates could be potential producers of tyramine, putrescine or cadaverine. Four of the strains came from the layer I and 7 strains from the layer IV. Phenotypic identification and rep-PCR analysis uniformly classified strains as *Lactobacillus curvatus* (3 strains), *Lactobacillus plantarum* (1 strain), *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (1 strain) and *Lactobacillus casei/paracasei* (6 strains) (Table 2). All three *Lb. curvatus* isolates (LI-2, LI-3, LIV-15) from different layers showed identical bioprofile as well as rep-PCR fingerprints and probably represent isolates of one strain, while isolates from *Lb. casei/paracasei* (LI-5, LIV-1, LIV-3, LIV-11, LIV-13, LIV-18) showed moderately different phenotype which indicates the presence of non-identical strains. The rep-PCR fingerprinting separated the strains analysed into a few clusters corresponding to *Lb. curvatus* (LI-2, LI-3, LIV-15), *Lb. plantarum* (LI-7),

*Lb. casei/paracasei* (LI-5, LIV-1, LIV-3, LIV-11, LIV-13, LIV-18) and *Lc. lactis* subsp. *lactis* (LIV-9) (Fig. 4). These results were confirmed by the identification results achieved by phenotypic characterization.

In addition to the analysis of cheeses, the BS used for the inoculation of milk during the production of the cheeses tested was also analysed the same way. In total, 15 microorganisms were isolated from the BS and by means of cultivation method according to Bover-Cid and Holzapfel (1999), 3 strains were proved to be potential producers of biogenic amines. The identification results obtained by biotyping as well as rep-PCR assigned these three isolates (BS-2, BS-3, BS-6) as members of *Lc. lactis* subsp. *lactis* species (Table 2 and Fig. 4) each with slightly different biochemical properties. However, one strain (BS-2) from BS was phenotypically identical to LIV-9 strain from the cheese.

Production of biogenic amines by the isolated and identified bacteria (potential producers of tyramine, putrescine or cadaverine; assessed by the screening method) was quantified in decarboxylation broth (see section 2.4 Biogenic amines analysis). The content of biogenic amines was evaluated and divided into 4 groups: (i) production of a biogenic amine was not detected; (ii) low production ( $<10$  mg/L); (iii) medium production (10–100 mg/L); and (iv) high production ( $>100$  mg/L) of a biogenic amine. The results are shown in Table 2.

By means of chromatographic method, no production of the biogenic amines observed (histamine, tyramine, putrescine or cadaverine) was detected in any of the three strains of *Lc. lactis* subsp. *lactis* (BS-2, BS-3, BS-6) isolated from BS. In one isolate from the layer I identified as *Lb. casei/paracasei* (LI-5), the chromatographic method did not reveal any production of the biogenic amines tested. Two strains of *Lb. curvatus* (LI-2, LI-3) obtained from the layer I of the cheeses tested showed a medium/high production



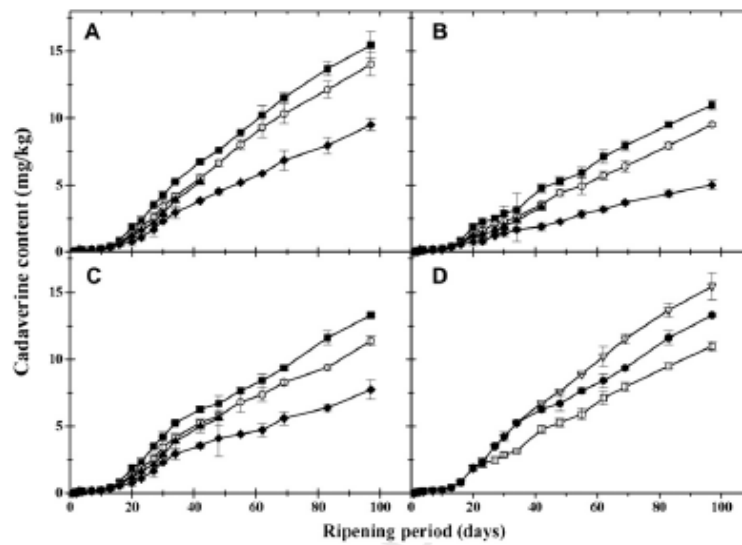


Fig. 3. The dependence of cadaverine content (mg/kg) in Edam-cheese on the ripening period (days): A – storage in cellar at  $10 \pm 2$  °C for the whole period; B – after 3 weeks of storage in cellar removed to the fridge and stored at  $5 \pm 1$  °C; C – after 5 weeks of storage in cellar removed to the fridge and stored at  $5 \pm 1$  °C; D – part, summary of the cadaverine content in the first layer in three storage modes:  $\nabla$  – the whole period in cellar at  $10 \pm 2$  °C;  $\square$  – after 3 weeks of storage in cellar removed to the fridge and stored at  $5 \pm 1$  °C;  $\bullet$  – after 5 weeks of storage in cellar removed to the fridge and stored at  $5 \pm 1$  °C. The cadaverine content was expressed as mean; bars represent S.D. ( $n = 24$ ).

of tyramine and putrescine. Moreover, one of these strains (LI-2) also showed a low production of cadaverine. The production of tyramine in the layer I was also enhanced by *Lb. plantarum* (LI-7).

Five isolates originating from the layer IV (LIV-1, LIV-3, LIV-11, LIV-13, LIV-18) were identified as *Lb. casei/paracasei*. In three of them (LIV-1, LIV-3, LIV-18), the chromatographic method did not reveal any production of the biogenic amines tested. The remaining two isolates (LIV-11, LIV-13) showed a medium production of

tyramine and also a low production of cadaverine. Moreover, one strain of *Lb. curvatus* (LIV-15) with a high production of tyramine and putrescine was isolated in the above-mentioned layer. The last strain (LIV-9) isolated from the layer IV and described by means of cultivation method as potentially positive for the production of biogenic amines was identified as *Lc. lactis* subsp. *lactis* and probably originated from BS. This assumption is also confirmed by a visual identity of rep-PCR fingerprints revealed by *Lc. lactis* subsp. *lactis* strains. However, in the last-mentioned isolate (LIV-9), no production of biogenic amines was detected by means of chromatographic method.

Table 1  
Lactic acid bacteria counts (log CFU/g) in the layers of Edam-cheese tested during the ripening period ( $n = 24$ ; median  $\pm$  SD).

Day of the ripening period	Regime of ripening	Layer	Lactic acid bacteria (log CFU/g)
49	C	I	7.93 $\pm$ 0.47
		II	7.61 $\pm$ 0.38
	3W	I	7.48 $\pm$ 0.32
		II	6.78 $\pm$ 0.42
	5W	I	6.57 $\pm$ 0.39
		II	6.21 $\pm$ 0.28
98	C	I	7.65 $\pm$ 0.24
		II	7.42 $\pm$ 0.36
	3W	I	7.31 $\pm$ 0.22
		II	6.91 $\pm$ 0.39
	5W	I	6.65 $\pm$ 0.27
		II	6.05 $\pm$ 0.40
	3W	I	5.98 $\pm$ 0.48
		II	5.96 $\pm$ 0.59
	5W	I	5.28 $\pm$ 0.21
		II	6.22 $\pm$ 0.42
	5W	I	5.84 $\pm$ 0.33
		II	5.57 $\pm$ 0.31

#### 4. Discussion

The content of biogenic amines (tyramine, putrescine and cadaverine) varied in different parts of the Edam-type cheeses tested during the 98-day ripening/storage period. Within the whole 98-day observation period, the highest content of the above-mentioned biogenic amines was detected in a 0.7 mm wide upper layer – edge (in all ripening/storage regimes). The same conclusion, i.e. that the edge shows higher concentrations of biogenic amines than the core, was also reached by Komprda et al. (2007, 2008). On the other hand, Novella-Rodríguez et al. (2003) have reported the edge part of semi-soft ripened goat cheese to contain less amount of cadaverine than the core part; but they did not find a plausible explanation. As it follows from the comparison of the work by Komprda et al. (2007, 2008) and our study, the distribution of biogenic amines in big blocks (>10 kg) of Edam-type cheeses is equivalent to the smaller consumer packages (<1.5 kg). Thus, the

Table 2  
Biogenic amines production (tyramine, putrescine and cadaverine) of the isolated and identified microorganisms

Source of isolation	Strain No	Species <sup>a</sup>	Biogenic amine production <sup>b</sup>		
			Tyramine	Putrescine	Cadaverine
The bulk starter	BS-2	<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	ND	ND	ND
	BS-3	<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	ND	ND	ND
	BS-6	<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	ND	ND	ND
The first layer of cheese	LI-2	<i>Lb. curvatus</i>	+++	++	+
	LI-3	<i>Lb. curvatus</i>	+++	+++	ND
	LI-5	<i>Lb. casei/paracasei</i>	ND	ND	ND
	LI-7	<i>Lb. plantarum</i>	++	ND	ND
The fourth layer of cheese	LIV-1	<i>Lb. casei/paracasei</i>	ND	ND	ND
	LIV-3	<i>Lb. casei/paracasei</i>	ND	ND	ND
	LIV-9	<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	ND	ND	ND
	LIV-11	<i>Lb. casei/paracasei</i>	++	ND	+
	LIV-13	<i>Lb. casei/paracasei</i>	++	ND	+
	LIV-15	<i>Lb. curvatus</i>	+++	+++	ND
	LIV-18	<i>Lb. casei/paracasei</i>	ND	ND	ND

<sup>a</sup> *Lactobacillus* – *Lb.*, *Lactococcus* – *Lc.*

<sup>b</sup> The concentration ranges: the biogenic amine was not detected (ND); < 10 mg/L (+); 10–100 mg/L (++); > 100 mg/L (+++); n = 12; all strains were negative for histamine production.

distribution of biogenic amines is probably not dependent on the size of cheese blocks.

In the individual layers, *Lb. curvatus*, *Lb. plantarum* and *Lb. casei/paracasei* strains were identified as the producers of biogenic amines (Table 2). The main reason for different biogenic amines content in the individual layers must be searched for in different conditions of the environment influencing the growth and metabolism of microorganisms. These conditions include mainly different water activity, O<sub>2</sub> content and proteolytic activity (Komprda et al., 2008; Novella-Rodríguez et al., 2003). The suggested explanation can also be supported by different LAB counts in the individual layers of the cheeses tested (Table 1), where the core showed lower bacteria counts than the layers closer to the edge.

The correlations between the biogenic amines content and the values of the dry matter content or pH values were determined. The changes of the biogenic amines contents (for tyramine, putrescine and cadaverine) correlated poorly with changes of the dry matter content (correlation coefficients 0.1136–0.2357;  $P \geq 0.05$ ). The correlation coefficients between the tyramine, putrescine and cadaverine contents and the pH values ranged between 0.6076 and 0.7264 ( $P < 0.01$ ). It is hence obvious that the pH values could significantly influence the activity of enzymes of LAB (Smit et al., 2005).

The highest biogenic amines content was found in the samples ripening for the whole observation period in the ripening cellar at 10 °C. Lower concentrations of biogenic amines were detected in

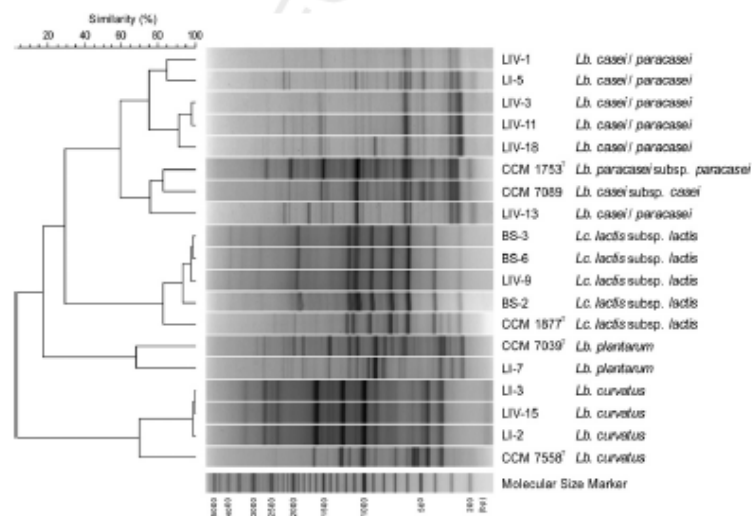


Fig. 4. Dendrogram based on (GTG)<sub>2</sub>-PCR fingerprinting results of LAB isolated from Edem-cheese. Reference strains corresponding to the identified species are included (*Lactobacillus* – *Lb.*, *Lactococcus* – *Lc.*).

Please cite this article in press as: Buřková, L., et al., The effect of ripening and storage conditions on the distribution of tyramine, putrescine, ..., Food Microbiology (2010), doi:10.1016/j.fm.2010.04.014

the cheeses which were stored at cold storage temperature of 5 °C after 38 days of ripening at 10 °C. During the whole experiment, the lowest content of tyramine, putrescine and cadaverine was detected in the samples which were stored at cold storage temperature of 5 °C after 23 days of ripening at 10 °C. However, during all ripening/storage regimes, there was a gradual increase in tyramine, putrescine and cadaverine. The above-mentioned findings correspond with the works by Gardini et al. (2001) and Santos et al. (2003), who claim that the increase in concentration of biogenic amines slows down when there is a decrease of cultivation temperature of the model LAB. Moreover, the above-mentioned studies present that also pH values and NaCl concentration have a significant influence on the production of biogenic amines.

After 98 days storage, the tyramine content in some parts of tested cheese (especially the edge) exceeds the concentration of 100 mg/kg, which is according to Silla Santos (1996) considered to be the safety limit. Even cold storage temperatures of around 5 °C cannot prevent the biogenic amines content in cheeses from increasing above this toxicologically significant level. On the other hand, the estimation of the total toxic dose of individual biogenic amines is very difficult (Halász et al., 1994). Shalaby (1996) and Valsamaki et al. (2000) stated that the "safe" sum of histamine, tyramine, putrescine and cadaverine should not exceed significantly higher dose of 900 mg/kg. Latter mentioned authors have also noted, that for sensitive people and/or patients on non-sensitive monoamine oxidase inhibitors the toxic dose can be much lower.

Microbiological analysis of the cheeses and BS as well as the basic screening of isolated bacteria revealed, by means of cultivation method, that 14 bacteria are potential producers of biogenic amines. Further tests proved that in 8 cases the cultivation test showed false-positive results. The risk of false-positive results when determining the production of biogenic amines has already been mentioned by e.g. Actis et al. (1999) and Bunková et al. (2009). Buřková et al. (2008) explain this phenomenon by the fact that cultured bacteria can produce substances with alkaline reaction (other than biogenic amines) and thus affect the test results based on the change in colour of the pH indicator.

*Lb. curvatus* LI-2 and LI-3 (as the main producer) and *Lb. plantarum* LI-7 were identified as the producers of biogenic amines in the edge. *Lb. curvatus* LIV-15 (a strong producer) and *Lb. casei/paracasei* LIV-11 and LIV-13 were determined as the producers of biogenic amines in the core. According to Wouters et al. (2002), all the above-mentioned species occur regularly and are isolated from cheeses. They could get into the cheese from the milk or the environment. In accord with our study, Burdychová and Komprda (2007) also isolated the strain of *Lb. curvatus* from Dutch-type cheeses and described it as one of the producers of biogenic amines. Apart from lactobacilli, the representatives of the *Lactococcus* and *Enterococcus* genera are also identified as the producers of biogenic amines in cheeses (Burdychová and Komprda, 2007; Delgado et al., 2002).

According to Arena et al. (2007), some strains of *Lb. plantarum* belong to tyramine producers, which is in accord with our results. Moreover, Arena and Manca de Nádra (2001) described that certain strains of *Lb. plantarum* are also able to produce putrescine. On the other hand, putrescine production was not determined in our isolate of *Lb. plantarum* (LI-7). In literature, the strains of *Lb. curvatus* are also described as tyramine and putrescine producers (Bover-Cid et al., 2008; Pereira et al., 2001), which corresponds with the results of our study. The strains of *Lb. curvatus* (isolated and identified in this study) were found to be the sole producers of putrescine in the cheeses observed. One strain of *Lb. curvatus* isolated in our study also produced cadaverine, which was not described in the literature available. *Lb. curvatus* occurs as spontaneous microflora

not only in dairy products but also in fermented meat products, where it shows a strong decarboxylation activity (Aymerich et al., 2006; Bover-Cid et al., 2001). Decarboxylation activity leading to the production of tyramine and cadaverine was determined in two of six isolated and identified strains of *Lb. casei/paracasei* (LIV-11, LIV-13). According to Öner et al. (2004) and Wouters et al. (2002), the strains of *Lb. casei* and *Lb. paracasei* are frequent representatives of NSLAB in cheeses. On the other hand, according to Landete et al. (2007), they do not belong to common producers of biogenic amines.

Some publications (e.g. Burdychová and Komprda, 2007; Komprda et al., 2007, 2008) describe histamine as a biogenic amine with a high incidence in cheeses. However, in our study, histamine was detected neither in the cheeses nor in broths where isolated bacteria were cultivated.

In conclusion, it can be said that all tyramine, putrescine and cadaverine producers were described as NSLAB belonging to the genus *Lactobacillus*. Strains isolated from the bulk starter did not produce biogenic amines tested. The cold storage of cheeses cannot prevent the content of tyramine, putrescine and cadaverine from increasing. These temperatures also pose a serious hazard to food safety. Distribution of biogenic amines in cheeses of Edam-type is not uniform, as the edge shows significantly higher concentrations than the core. This distribution is probably independent of the size of the cheese block.

#### Acknowledgement

This study was supported by projects of the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic, MSM7088352101 and MSM0021622416.

#### References

- Actis, L.A., Smoot, J.C., Barardin, C.E., Findlay, R.H., 1999. Comparison of differential plating media and two chromatography techniques for the detection of histamine production in bacteria. *J. Microbiol. Methods* 39, 79–90.
- Al-Graib, M.M., Willbey, R.A., 2004. Effect of temperature and salt on the maturation of white-salted cheese. *Int. J. Food Microbiol.* 57, 57–63.
- Arena, M.E., Manca de Nádra, M.C., 2001. Biogenic amine production by *Lactobacillus*. *J. Appl. Microbiol.* 90, 158–162.
- Arena, M.E., Fricco, D., Manca de Nádra, M.C., Pardo, I., Spano, G., 2007. Characterization of a *Lactobacillus plantarum* strain able to produce tyramine and partial cloning of a putative tyrosine decarboxylase gene. *Curr. Microbiol.* 55, 205–210.
- Aymerich, T., Martín, B., Garriga, M., Vidal-Carou, M.C., Bover-Cid, S., Hugas, M., 2006. Safety properties and molecular strain typing of lactic acid bacteria from slightly fermented sausages. *J. Appl. Microbiol.* 100, 40–49.
- Bernardeau, M., Vernoux, J.P., Henin-Dubernet, S., Gouguen, M., 2008. Safety assessment of dairy microorganisms: the *Lactobacillus* genus. *Int. J. Food Microbiol.* 126, 278–285.
- Bover-Cid, S., Holzapfel, W.H., 1999. Improved screening procedure for biogenic amine production by lactic acid bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* 53, 33–41.
- Bover-Cid, S., Izquierdo-Pulido, M., Vidal-Carou, M.C., 2001. Effectiveness of a *Lactobacillus* starter culture in the reduction of biogenic amine accumulation as a function of the raw material quality. *J. Food Prot.* 64, 367–373.
- Bover-Cid, S., Miguel-Ariza, M.J., Belec, B., Holzapfel, W.H., Vidal-Carou, M.C., 2008. Amino acid decarboxylation by *Lactobacillus curvatus* CTC273 affected by the pH and glucose availability. *Food Microbiol.* 25, 269–277.
- Buřková, L., Buřka, F., Hřebilová, M., Valášková, Z., Nováková, D., Duň, V., 2009. Tyramine production of technological important strains of *Lactobacillus*, *Lactococcus* and *Streptococcus*. *Eur. Food Res. Technol.* 229, 533–538.
- Buřková, L., Buřka, F., Křesková, P., Mirkovič, V., Doležalová, M., Kráčmar, S., 2010. Formation of biogenic amines by gram-negative bacteria isolated from poultry skin. *Food Chem.* 121, 203–206.
- Burdychová, R., Komprda, T., 2007. Biogenic amine-forming microbial communities in cheese. *REMS Microbiol. Lett.* 276, 149–155.
- Christensen, J.F., Dudley, E.G., Pedersen, J.A., Steele, J.L., 1999. Peptidases and amino acid catabolism in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 76, 217–246.
- Delgado, S., Delgado, T., Mayo, B., 2002. Technological performance of several *Lactococcus* and *Enterococcus* strains of dairy origin in milk. *J. Food Prot.* 65, 1590–1596.
- de Llano, G.D., Cuesta, P., Rodríguez, A., 1998. Biogenic amine production by wild lacticoccal and leuconostoc strains. *Lett. Appl. Microbiol.* 26, 270–274.

- 1021 de las Rivas, B., Marcolí, Á., Garacosa, A.V., Muñoz, R., 2006. PCR detection of  
1022 foodborne bacteria producing the biogenic amines histamine, tyramine,  
1023 putrescine and cadaverine. *J. Food Prot.* 69, 2508–2514.
- 1024 Foidé, A., Flogerzi, G.F., 2000. Biotechnological approaches to the understanding  
1025 and improvement of mature cheese flavour. *Curr. Opin. Biotechnol.* 11,  
1026 484–489.
- 1027 Fox, P.F., Guinee, T.P., Cogan, T.M., McSweeney, P.L.H., 2000. *Fundamentals of Cheese*  
1028 *Science*. Aspen Publication, 638 pp.
- 1029 Galgano, F., Suzzi, G., Favati, F., Caruso, M., Matuscilli, M., Gardini, F., Salzano, G.,  
1030 2001. Biogenic amines during ripening in “Semisoft Caprino” cheese: role of  
1031 enterococci. *Int. J. Food Sci. Technol.* 36, 153–160.
- 1032 Gardini, F., Matuscilli, M., Caruso, M.C., Galgano, F., Crudele, M.A., Fava, F.,  
1033 Guazzoni, M.E., Suzzi, G., 2001. Effects of pH, temperature and NaCl concentra-  
1034 tion on the growth kinetics, proteolytic activity and biogenic amine  
1035 production of *Enterococcus faecalis*. *Int. J. Food Microbiol.* 64, 105–117.
- 1036 Hakez, A., Barath, Á., Simon-Sarkadi, L., Holzapfel, W., 1994. Biogenic amines and  
1037 their production by microorganisms in food. *Trends Food Sci. Technol.* 5,  
1038 42–48.
- 1039 ISO Standard No. 5534, 2004. Cheese and Processed Cheese – Determination of the  
1040 Total Solids Content (Reference Method). International Organization for Stan-  
1041 dardization, Geneva.
- 1042 Kompa, T., Smělá, D., Nováková, K., Káthoňka, L., Šustová, K., Pechová, P., 2007.  
1043 Content and distribution of biogenic amines in Dutch-type hard cheese. *Food*  
1044 *Chem.* 102, 129–137.
- 1045 Kompa, T., Burdychová, R., Džbán, V., Cviklová, O., Štádrová, P., Dvořáková, H.,  
1046 2008. Tyramine production in Dutch-type semi-hard cheese from different  
1047 producers. *Food Microbiol.* 25, 219–227.
- 1048 Landete, J.M., Ferrer, S., Pardo, I., 2007. Biogenic amine production by lactic acid  
1049 bacteria, acetic bacteria and yeast isolated from wine. *Food Control* 18,  
1050 1549–1574.
- 1051 Marcolí, Á., de las Rivas, B., Moreno-Arribas, V., Muñoz, R., 2005. Multiplex PCR  
1052 method for the simultaneous detection of histamine, tyramine, and putres-  
1053 cine-producing lactic acid bacteria in foods. *J. Food Prot.* 68, 874–878.
- 1054 McSweeney, P.L.H., Hayaşgök, A.A., O'Mahony, J.A., Bantal, N., 2006. Perspectives  
1055 on cheese ripening. *Aust. J. Dairy Technol.* 61, 69–77.
- 1056 Novella-Rodríguez, S., Veciana-Nogués, M.T., Izagardo-Pulido, M., Vidal-Gato, M.C.,  
1057 2008. Distribution of biogenic amines and polyamines in cheese. *J. Food Sci.* 68,  
1058 750–755.
- 1059 Öner, Z., Şaglık, O., Simsek, B., 2004. Lactic acid bacteria profiles and tyramine and  
1060 tyramine contents of Turkish hulum cheese. *Eur. Food Res. Technol.* 29, 455–459.
- 1061 Pereira, C.I., Barreto Crespo, M.T., San Román, M.V., 2001. Evidence for proteolytic  
1062 activity and biogenic amines production in *Lactobacillus curvatus* and  
1063 *L. Annelabii*. *Int. J. Food Microbiol.* 68, 211–216.
- 1064 Pinho, O., Ferreira, I.M.F.L.V.O., Mendes, E., Oliveira, B.M., Ferreira, M., 2001. Effect of  
1065 temperature on evolution of free amino acid and biogenic amine contents  
1066 during storage of Azetiao cheese. *Food Chem.* 75, 287–291.
- 1067 Pircher, A., Bauer, F., Fruisen, P., 2007. Formation of cadaverine, histamine,  
1068 putrescine and tyramine by bacteria isolated from meat, fermented sausages  
1069 and cheeses. *Eur. Food Res. Technol.* 226, 225–231.
- 1070 Roig-Sagués, A.X., Molina, A.P., Hernández-Horeno, M.M., 2002. Histamine and  
1071 tyramine-forming microorganisms in Spanish traditional cheese. *Eur. Food Res.*  
1072 *Technol.* 215, 95–100.
- 1073 Santos, W.C., Souza, M.R., Cerqueira, M.M.Q.P., Glória, M.B.A., 2003. Bioactive amines  
1074 formation in milk by *Lactococcus* in the presence of not of serum and NaCl at 20  
1075 and 32 °C. *Food Chem.* 81, 595–606.
- 1076 Shalaby, A.R., 1996. Significance of biogenic amines to food safety and human  
1077 health. *Food Res. Int.* 29, 675–690.
- 1078 Silla Santos, M.H., 1996. Biogenic amines: their importance in foods. *Int. J. Food*  
1079 *Microbiol.* 29, 213–231.
- 1080 Smit, G., Smit, B.A., Engels, W.J.M., 2005. Flavour formation by lactic acid bacteria and  
1081 biochemical flavour profiling of cheese products. *Food Microbiol. Rev.* 29, 591–600.
- 1082 Švec, P., Sedláček, I., Zákrová, L., Nováková, D., Ruklemová, M., 2009. *Lactobacillus*  
1083 *spp.* associated with early childhood caries. *Food Microbiol.* 54, 53–58.
- 1084 Švec, P., Vancanney, M., Šerman, M., Štaubert, C., Lefebvre, K., Sedláček, I.,  
1085 Swings, J., 2005. Evaluation of (GTG)S-PCR for identification of *Streptococcus spp.*  
1086 *FEMS Microbiol. Lett.* 247, 59–63.
- 1087 Valsamaki, K., Michailidou, A., Polychronidou, A., 2000. Biogenic amine produc-  
1088 tion in feta cheese. *Food Chem.* 71, 259–266.
- 1089 Wothers, J.T.M., Ayad, E.H.E., Hugenholtz, J., Smit, G., 2002. Microbes from raw milk  
1090 for fermented dairy products. *Int. Dairy J.* 12, 91–109.