

Faktory ovlivňující produkci biogenních aminů u vybraných kmenů *Lactococcus lactis*

Bc. Tereza Podešvová

Diplomová práce
2011



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav biochemie a analýzy potravin

akademický rok: 2010/2011

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Tereza PODEŠVOVÁ**
Osobní číslo: **T100032**
Studijní program: **N 2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Technologie, hygiena a ekonomika výroby potravin**

Téma práce: **Faktory ovlivňující produkci biogenních aminů
u vybraných kmenů *Lactococcus lactis***

Zásady pro vypracování:

I. Teoretická část

1. Charakteristika biogenních aminů.
2. Vznik biogenních aminů.
3. Bakterie mléčného kvašení – rod *Lactococcus*.

II. Praktická část

1. Metodika stanovení produkce biogenních aminů.
2. Sledování vlivu vybraných vnějších faktorů na produkci biogenních aminů u *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* metodou iontově-výměnné chromatografie.
3. Formulace závěrů na základě získaných výsledků.

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

KŘÍŽEK M., KALAČ P., Biogenní aminy v potravinách a jejich role ve výživě, Czech Journal of Food Science, 16:151–159, 1998.

BURDYCHOVÁ R., DOHNAL V., Skrining probiotických kultur určených pro výrobu fermentovaných potravin na schopnost tvorby biogenních aminů, Acta of Mendel University of Agriculture and Forestry Brno, 61:25–30, 2008.

BUŇKOVÁ L., BUŇKA F., HLOBILOVÁ M., VAŇÁTKOVÁ Z., NOVÁKOVÁ D., DRÁB V., Tyramine production of technological important strains of Lactobacillus, Lactococcus and Streptococcus., Eur Food Res Technol, 229:533–538, 2009.

GÖRNER F., VALÍK L., Aplikovaná mikrobiologie poživatin, 1. vydání, Malé centrum, Bratislava, ISBN 80-967064-9-7, 528s., 2004.

Vedoucí diplomové práce:

doc. RNDr. Leona Buňková, Ph.D.

Ústav technologie tuků, tenzidů a kosmetiky

Datum zadání diplomové práce:

25. února 2011

Termín odevzdání diplomové práce:

20. května 2011

Ve Zlíně dne 21. března 2011

doc. Ing. Petr Hlaváček, CSc.
děkan



doc. Ing. Miroslav Fišera, CSc.
ředitel ústavu

ABSTRAKT

Tato práce je zaměřená na dekarboxylázovou aktivitu vybraných bakterií mléčného kvašení rodu *Lactococcus*. Tyto bakterie se běžně používají v potravinářství, jako součást smetano-vé kultury, přičemž některé druhy byly označeny za producenty biogenních aminů. Experimentálně byla tvorba těchto toxických látek detekována po kultivaci v aerobním i anaerobním prostředí v živných médiích o proměnlivém složení NaCl a laktózy. Z výsledků výzkumu vyplývá, že všechny námi vybrané bakterie rodu *Lactococcus* produkují biogenní amin tyramin. Jeho nejvyšší koncentrace byla detekována v anaerobním prostředí při koncentraci laktózy 0,5% (w/v) a 2% NaCl (w/v).

Klíčová slova: biogenní aminy, dekarboxylace, bakterie mléčného kvašení (BMK), *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*.

ABSTRACT

This thesis is aimed at decarboxylation activity of chosen lactic acid bacteria strains *Lactococcus*. These bacteria are generally used in the food-processing industry as a component of cream culture. Some of them were identified as producers of biogenic amines. Production of these toxic substances was experimentally detected after the cultivation in both aerobic and anaerobic atmosphere in nutrient medium with variable composition of NaCl and lactose. The results imply that all of us selected bacteria strains *Lactococcus* produce biogenic amine tyramine. Its highest concentration was detected in an anaerobic atmosphere at a concentration of 0,5% lactose (w/v) and 2% NaCl (w/v).

Keywords: biogenic amines, decarboxylation, lactic acid bacteria, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*.

Touto cestou bych ráda poděkovala své vedoucí doc. RNDr. Leoně Buňkové Ph.D. za odborné vedení této diplomové práce a trpělivost i čas strávený při konzultacích. Dále bych ráda poděkovala doc. Ing. Františku Buňkovi Ph.D. a laborantce Lence Plechačové za cenné připomínky, spolupráci a ochotu v laboratoři při měření praktické části diplomové práce.

Můj velký dík patří také rodičům a příteli za podporu během celé doby studia.

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 ¹⁾;
- 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 ²⁾;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ 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 ³⁾ 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 Zlíně3.5.2011

.....*Podešvová Tereza*.....

¹⁾ 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:

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.

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.

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

²⁾ 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:

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 vzdělávacího zařízení (školní dílo).

³⁾ 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:

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.

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.

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 přihledne k výši výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

OBSAH

ÚVOD	10
I TEORETICKÁ ČÁST	11
1 BIOGENNÍ AMINY	12
1.1 ČLENĚNÍ BIOGENNÍCH AMINŮ	12
1.2 VÝZNAM BIOGENNÍCH AMINŮ.....	12
1.3 VZNIK BIOGENNÍCH AMINŮ – CHARAKTERISTIKA DEKARBOXYLACE	13
1.4 DŮLEŽITÉ BIOGENNÍ AMINY	14
1.5 BIOGENNÍ AMINY V POTRAVINÁCH	15
1.5.1 Sledování biogenních aminů v potravinářských provozech	15
1.6 FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ DEKARBOXYLÁZOVOU AKTIVITU MIKROORGANIZMŮ	16
1.7 VLIV BIOGENNÍCH AMINŮ NA LIDSKÉ ZDRAVÍ	17
1.7.1 Symptomy intoxikace biogenními aminy.....	17
1.7.2 Odbourávání biogenních aminů	18
1.7.3 Toxická dávka biogenních aminů	18
1.8 STANOVENÍ BIOGENNÍCH AMINŮ.....	19
2 MIKROORGANIZMY S DEKARBOXYLÁZOVOU AKTIVITOU	20
3 BAKTERIE MLÉČNÉHO KVAŠENÍ	21
3.1 TAXONOMIE BAKTERIÍ MLÉČNÉHO KVAŠENÍ	21
3.2 POZITIVNÍ VÝZNAM BAKTERIÍ MLÉČNÉHO KVAŠENÍ	21
3.3 FERMENTACE LAKTÓZY	22
3.4 VÝSKYT A VÝZNAM BAKTERIÍ MLÉČNÉHO KVAŠENÍ.....	22
3.5 STARTOVACÍ KULTURY	23
3.6 FUNKČNÍ POTRAVINY – PROBIOTIKA	23
4 ROD <i>LACTOCOCCUS</i>	25
4.1 <i>LACTOCOCCUS LACTIS</i> SUBSP. <i>CREMORIS</i>	25
II PRAKTICKÁ ČÁST	28
5 CÍLE PRÁCE	29
6 METODIKA A MATERIÁL	30
6.1 KULTURY BAKTERIÍ.....	30
6.1.1 Příprava suspenze bakterií.....	30
6.1.2 Kultivační média	30

6.2	PRŮBĚH EXPERIMENTU	31
6.3	IONTOVĚ VÝMĚNNÁ CHROMATOGRAFIE PRO STANOVENÍ BIOGENNÍCH AMINŮ	32
6.4	STANOVENÍ OPTICKÉ HUSTOTY BUNĚK	33
6.5	STANOVENÍ PH KULTIVAČNÍHO MÉDIA	33
7	VÝSLEDKY A DISKUZE	34
7.1	CHROMATOGRAFICKÉ STANOVENÍ BIOGENNÍCH AMINŮ	34
7.1.1	Vliv vnějších faktorů na produkci tyraminu u <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> CCDM 824.....	34
7.1.2	Vliv vnějších faktorů na produkci tyraminu u <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> CCDM 946.....	37
7.1.3	Vliv vnějších faktorů na produkci tyraminu u <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> CCDM 1004	40
7.2	MĚŘENÍ NÁRŮSTU BUNĚK.....	43
7.3	STANOVENÍ PH KULTIVAČNÍHO MÉDIA	45
7.4	SOUHRNNÁ DISKUZE.....	46
	ZÁVĚR	50
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	51
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	56
	SEZNAM OBRÁZKŮ	57
	SEZNAM TABULEK.....	59
	SEZNAM PŘÍLOH.....	60

ÚVOD

Hlavním smyslem technologického zpracování a skladování potravinářských surovin a potravin je, kromě vytvoření a udržení nutriční a sensorické hodnoty potravin, také zabránit ohrožení zdraví spotřebitele v průběhu celého řetězce výroby potravin, a to od produkce surovin až po spotřebu konzumentem. Během celého cyklu zpracování podléhají potravinářské materiály komplexním změnám (fyziologické, enzymové, chemické a mikrobiologické). Z hlediska důsledků, potenciálního ohrožení zdraví konzumenta, snížení nutriční a sensorické hodnoty potravin a znehodnocení potraviny, jsou nejvýznamnějšími změnami změny mikrobiologické [1].

Mikroorganismy mohou svou metabolickou činností ovlivňovat kvalitu a zdravotní nezávadnost potravin. Na této činnosti se podílí celá řada mikrobiálních enzymů. Mezi nejvýznamnější patří proteázy, lipázy, sacharolytické enzymy, které rozkládají základní složky potravin (bílkoviny, tuky a sacharidy). Další enzymy, např. reduktázy nebo dekarboxylázy, se mohou podílet na vzniku toxických látek. Mezi tyto látky patří i biogenní aminy, z nichž histamin může při nesprávném skladování masa nebo mořských ryb dosáhnout toxických koncentrací. Biogenní aminy mohou sloužit také jako indikátory kažení potravin [2].

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 BIOGENNÍ AMINY

Biogenní aminy jsou nízkomolekulární organické bazické sloučeniny, které jsou přítomny ve všech živých organizmech. V potravinách a krmivech představují biogenní aminy jedny z nežádoucích zplodin konečného rozkladu bílkovin [3].

Jejich tvorba i rozklad spadá mezi běžné metabolické pochody zvířat, rostlin i mikroorganizmů [4].

V potravinách vznikají především dekarboxylací přirozených aminokyselin působením dekarboxyláz, kterými jsou vybaveny četné druhy hnilobných bakterií, ale také řada druhů bakterií mléčného kvašení [5].

1.1 Členění biogenních aminů

Podle chemické struktury se biogenní aminy člení na aromatické (tyramin a 2-fenyletylamin), heterocyklické (histamin a tryptamin), alifatické (putrescin a kadaverin) a polyaminy (spermidin, spermin a příp. agmatin). Někdy se mezi polyaminy zjednodušeně řadí i diaminy, podobně jako se heterocyklické aminy zjednodušeně řadí do skupiny aromatických aminů [5]. Skupina polyaminů může být klasifikována i jako samostatná skupina, protože biogenní aminy do ní patřící mohou být tvořeny alternativní metabolickou cestou a následkem toho se projevují odlišným fyziologickým, resp. patologickým působením [6].

1.2 Význam biogenních aminů

Biogenní aminy jsou pro živé organizmy nezbytné z hlediska řady fyziologických funkcí. Účastní se buněčného metabolismu, a zároveň jsou důležité i pro samotný buněčný růst. Podílí se na regulaci nukleových kyselin a ovlivňují syntézu bílkovin. Uplatňují se i při stabilizaci membrán a při kontrole krevního tlaku. Některé z nich jsou tkáňovými hormony nebo stavebními látkami pro syntézu dalších hormonů, fytohormonů, alkaloidů a dalších sekundárních metabolitů rostlin. Na druhé straně jejich vysoké koncentrace mohou zapříčinit toxické efekty [7,8].

Poslední dobou poutá velkou pozornost skupina polyaminů (spermin, spermidin, putrescin, kadaverin). Polyaminy jsou důležité v procesech buněčného růstu a proliferaci. V popředí zájmů tak stojí možná účast v nádorovém bujení. Příznivě však působí při hojení ran. Poly-

aminy jsou také považovány za potenciální prekurzory kancerogenních N-nitrososloučenin a aromatických heterocyklů. [9].

1.3 Vznik biogenních aminů – charakteristika dekarboxylace

Biogenní aminy v potravinách mohou pocházet ze dvou zdrojů:

- jsou přirozenou součástí buněčných struktur rostlin,
- mohou vznikat v procesu výroby a skladování potravin jako výsledek metabolického působení mikroorganismů.

V procesu výroby a skladování potravin se tak biogenní aminy stávají indikátorem mikrobiální kontaminace a jejich koncentrace tak může být jedním z ukazatelů kvality potravin [10]. Biogenní aminy v buňkách vznikají enzymovou dekarboxylací aminokyselin s eventuelní další úpravou [11].

K tvorbě biogenních aminů značnou měrou přispívá kulturní a kontaminující mikroflóra. Některé mikroorganismy totiž mají schopnost tvořit dekarboxylázové enzymy, které katalyzují dekarboxylaci volných aminokyselin v potravině za vzniku biogenních aminů [12]. Tvorba těchto látek postupuje od bílkovin přes peptidy k aminokyselinám, jejichž dekarboxylace vede ke vzniku aminů [13].

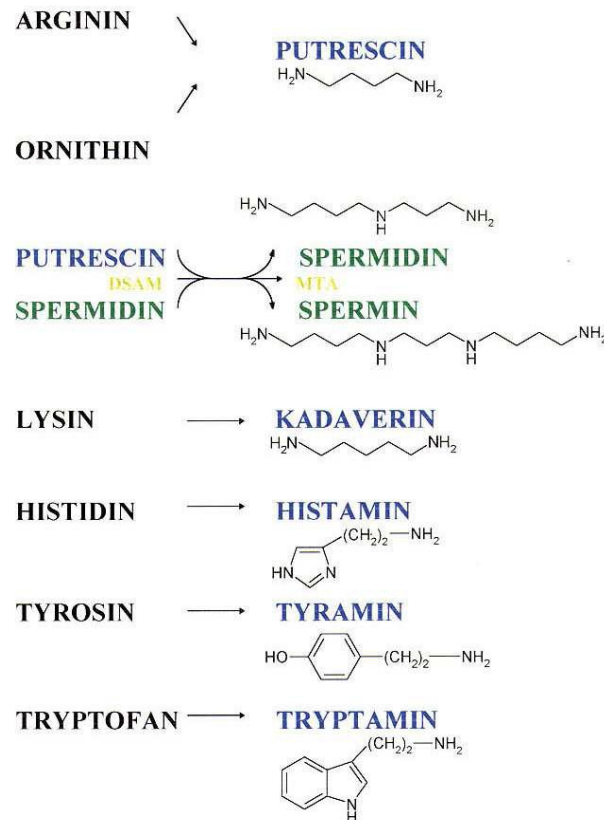
Při dekarboxylaci dochází k odštěpování oxidu uhličitého ze substrátu (karboxylové skupiny). Je to proces katalyzovaný enzymy ze třídy lyáz nebo oxidoreduktáz [11].

K typickým lyázovým reakcím patří odštěpování malé molekuly ze substrátu za vzniku dvojně vazby nebo naopak adice na dvojnou vazbu. V případě dekarboxylace je touto malou molekulou oxid uhličitý [14,15].

Mezi dekarboxylační reakce můžeme také zařadit procesy dekarboxylace vedoucí k tvorbě biogenních aminů. Dekarboxylace probíhá obvykle za zvýšených teplot. Je také důležitým biochemickým pochodem v živých organizmech (odbourávání keto- a aminokyselin) [16].

K nejznámějším dekarboxylázám patří pyruvátdekarboxyláza, produkující acetaldehyd při alkoholové fermentaci, či dekarboxylázy aminokyselin, jejichž působením vznikají biogenní aminy [11].

Nejznámějším biogenním aminem je histamin, který vzniká z aminokyseliny histidinu. Z aminokyseliny tyrozinu vzniká tyramin, z ornithinu putrescin, z lyzinu kadaverin, z tryptofanu tryptamin a z fenylalaninu vzniká beta-fenyletylamin [16].



Obr. 1. Vznik biogenních aminů [16]

1.4 Důležité biogenní aminy

Mezi nejčastěji se vyskytující biogenní aminy patří: [16]

- histamin - odvozen od histidinu. Tkáňový hormon, který v centrálním nervovém systému působí jako neurotransmitter. Může vyvolávat alergické projevy,
- tyramin - odvozený od tyrozinu, zvyšuje krevní tlak, způsobuje migrény,
- serotonin - odvozen od 5-hydroxytryptofanu. Neurotransmitter, vyvolává stahy hladkého svalstva střev a naopak uvolňuje svalovinu cév,
- dopamin - odvozen od tyrozinu. Prekurzor noradrenalinu a adrenalinu, působí jako neurotransmitter při nervovém přenosu,

- β -alanin - odvozen od kyseliny asparagové,
- cysteamin - odvozen od cysteinu. Součást koenzymu A,
- kyselina γ -aminomáselná - odvozená od kyseliny glutamové,
- fenyletylamin - vzniká enzymatickou dekarboxylací fenylalaninu. Hormon a alkaloid skupiny amfetaminu, při jehož konzumaci ve větším množství může dojít k psychotropním efektům,
- kadaverin a putrescin - kadaverin vzniká dekarboxylací lyzinu, dekarboxylací ornitinu vzniká putrescin. Oba aminy byly detekovány především při hnití masa jako tzv. mrtvolné jedy,
- etanolamin - odvozený od serinu, součást fosfolipidů,
- propanolamin - odvozen od treoninu, součást vitamínu B12,
- polyaminy (putrescin, spermidin a spermin) se vyskytují ve všech vyšších rostlinách a podílejí se na důležitých fyziologických procesech. [16].

1.5 Biogenní aminy v potravinách

Biogenní aminy jsou přirozenou složkou řady fermentovaných i nefermentovaných potravin rostlinného i živočišného původu [17]. Jejich výskyt v potravinách je závislý zejména na dekarboxylázové aktivitě přítomných mikroorganismů. Vyšší koncentrace biogenních aminů lze předpokládat v potravinách obsahujících bílkoviny nebo volné aminokyseliny, zvláště pokud poskytují vhodné podmínky pro biochemickou aktivitu přítomných mikroorganismů. Biogenní aminy mohou tedy sloužit jako indikátory procesu fermentace potravin nebo jejich kažení [18].

1.5.1 Sledování biogenních aminů v potravinářských provozech

Sledování výskytu aminů může být zdrojem cenné informace v potravinářských provozech, v nichž stěžejní roli hraje činnost mikroorganismů (výroba piva, vína, kysaného zelí, sýrů, fermentovaných masných výrobků). V případě potravin je důležité, zda se jedná o produkty fermentačních procesů či nikoli [19].

Fermentované potraviny

Fermentované potraviny (např. kysané zelí, pivo, víno) obsahují biogenní aminy jako přirozenou složku. Významnější je zde pohled toxikologický. Ve fermentovaných potravinách jsou biogenní aminy vytvářeny především dekarboxylací příslušných aminokyselin substrátově specifickými enzymy bakterií mléčného kvašení, které se využívají jako startérové kultury [18,19].

Nefermentované potraviny

Nefermentované potraviny (např. maso, mořské ryby) vykazují významnější nárůst obsahu aminů v souvislosti s nežádoucími rozkladnými procesy bílkovinné matrice. Aminy zde především hrají roli potenciálního kritéria jakosti [19].

Při skladování potravin, jako jsou maso, ryby a sýry, dochází vlivem enzymové aktivity přítomné mikroflóry k růstu obsahu biogenních aminů. Obsah některých z nich lze proto využít jako indikátor čerstvosti masa. Vaření má relativně malý vliv na obsah biogenních aminů, dochází pouze k jejich částečnému rozkladu. V mase ryb při nevhodném skladování narůstá především obsah histaminu. Je to dáno tím, že především v rybách s tmavým masem je vyšší obsah volného histidinu než v bílém rybím mase nebo v mase jatečných zvířat [20].

Největší nebezpečí tvorby biogenních aminů je při vysoké mikrobiální kontaminaci ryb a při nedodržení chladírenského řetězce. Nejčastěji se biogenní aminy tvoří ihned po vylovení ryb, které nejsou patřičně zchlazeny na teplotu kolem +1 °C. Další rizikovou operací je tepelné opracování, především uzení ryb, hlavně makrel. Záleží na době od přípravy ryb na uzení k vlastnímu tepelnému ošetření. Pokud je tato doba dlouhá a ryby jsou vystaveny vyšším teplotám, dochází k pomnožování mikroorganismů. Uzení ryb probíhá za nižších teplot a některé mikroorganismy (např. laktobacily) proces uzení mohou přežít, ve vhodných podmínkách se pomnožovat a tvořit především histamin [21].

1.6 Faktory ovlivňující dekarboxylázovou aktivitu mikroorganismů

Pro tvorbu biogenních aminů jsou, kromě přítomnosti volných aminokyselin (důležitý je stupeň proteolýzy) a množství bakterií obsahujících dekarboxylázy, také důležité podmínky, při nichž bakterie mohou růst a syntetizovat dekarboxylázy. Vzhledem k různorodosti druhů a kmenů jsou různé i optimální podmínky pro tvorbu biogenních aminů jako je teplota, pH, přístup kyslíku, aktivita vody, technologie výroby (např. zařazení pasterace),

doba zrání, doba skladování a přítomnosti kofaktorů jako pyridoxalfosfát nebo obsah soli a glukózy [22,23,24].

1.7 Vliv biogenních aminů na lidské zdraví

Zvýšený zájem o stanovení koncentrací a zastoupení jednotlivých biogenních aminů v potravinách vyplývá z prohlubujících se poznatků o jejich biologickém působení na člověka. Biogenní aminy jsou pro člověka nepostradatelné, avšak ve vysokých koncentracích se mohou projevit jako látky psychoaktivní a vazoaktivní [5].

Potravinovou přecitlivělostí trpí významná, stále narůstající, část populace. Postihuje asi 2 % dospělých a 8 % dětí do 3 let věku. Jedinci s potravinovou přecitlivělostí jsou při požití rizikové potraviny ohroženi jednak akutní reakcí s příznaky postižení systému dýchacího, kožního, zažívacího i oběhového, nebo se potravinová přecitlivělost projevuje chronickým onemocněním, jako je atopický ekzém a chronické zažívací potíže, které mohou významně ovlivňovat průběh schopnost jedince i kvalitu jeho života [17].

Stanovení biogenních aminů může být využito k posouzení míry rozkladu sledovaného materiálu. V případě skladování potravin může být obsah biogenních aminů ukazatelem jakosti vstupní suroviny a úrovně hygieny během výrobního procesu a skladování. Příjem potravin obsahujících vysoké koncentrace těchto sloučenin může u citlivých osob vyvolat alimentární intoxikaci [22].

1.7.1 Symptomy intoxikace biogenními aminy

Nejmarkantnější symptomy konzumace vysokých dávek biogenních aminů jsou zvracení, závratě, dýchací potíže, pocení, bušení srdce, snížení nebo zvýšení krevního tlaku a migrény. Jejich intenzita je závislá na kvalitativním i kvantitativním složení biogenních aminů [9].

Histamin způsobuje kopřivku, bolesti hlavy, návaly horka, křeče v břiše, rozšíření cév a snížení krevního tlaku, je příčinou otravy z ryb (scombroid poisoning). Tyramin může být příčinou migrén, krvácení do mozku a hypertenzních krizí, tzv. reakce na sýr (cheese reaction), zejména u pacientů užívajících antidepresiva [22,25].

Pro negativní vliv biogenních aminů na lidské zdraví je žádoucí, aby se tyto aminy v potravinách vyskytovaly v minimálním množství [22].

1.7.2 Odbourávání biogenních aminů

Normální příjem biogenních aminů je metabolizován ve střevním traktu velmi výkonným detoxifikačním systémem založeným na aktivitě enzymů monoaminoxidázy (MAO), diaminoxidázy (DAO) a histidinmethyltransferázy (HMT). Při nadměrném příjmu biogenních aminů potravou však detoxikační kapacita tohoto systému nemusí stačit, stejně tak i v případě pacientů, kteří užívají léky inhibující MAO – antidepressiva, antiparkinsonické léky. Toxicita histaminu a tyraminu je zvyšována současnou konzumací alkoholu a potravin obsahujících jiné biogenní aminy, zejména diaminy a polyaminy. Jejich negativní působení spočívá v odčerpání detoxikační kapacity enzymů MAO, DAO a HMT a v následném zesílení účinku toxičtějších biogenních aminů [22,25].

1.7.3 Toxická dávka biogenních aminů

Toxické dávky biogenních aminů je obtížné stanovit. Velmi záleží na individuálních rozdílech mezi lidmi, zastoupení jednotlivých biogenních aminů v potravě, množství konzumované potravin a přítomnosti jiných potencujících složek, jakými jsou například alkohol nebo léky. Obsah histaminu 100 mg/kg vzorku může způsobit intoxikaci histaminem, 100 – 800 mg/kg tyraminu tzv. reakci na sýr a 30 mg/kg 2-fenyletylaminu migrénu. Bylo navrženo [22], že suma histamin + tyramin + putrescin + kadaverin by pro sýr neměla překročit hodnotu 900 mg/kg. S tím souvisí i legislativní omezení nejvyšší přípustné dávky [22].

Legislativní opatření

Česká legislativa do roku 2004 obsahovala legislativní limity pro vybrané biogenní aminy v rybách, sýrech, pivu a vínu, ale dnes je v ČR platný jen hygienický limit pro histamin v rybách a výrobcích z ryb uváděný v Nařízení komise (ES) č. 2073/2005 ve výši 100 mg/kg. Tento limit může být ve dvou vzorcích z devíti z jedné šarže překročen až do hodnoty 200 mg/kg. Legislativa neurčuje výrobcům deklarovat obsah biogenních aminů na obale. Vedle ryb jsou sýry nejčastěji uváděnou potravinou spojovanou s intoxikací biogenních aminů [22].

1.8 Stanovení biogenních aminů

Pro stanovení biogenních aminů bylo vyvinuto několik technik zahrnující:

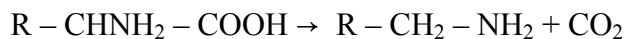
- tenkovrstvou chromatografií (TLC),
- plynovou chromatografií (GC),
- kapilární elektroforézu (CE)
- kapalinovou chromatografií (HPLC).

V praxi se nejčastěji používají vysoce citlivé chromatografické metody na reverzních fázích s fluorescenční nebo UV detekcí po dansylaci, benzoylaci nebo derivatizaci reakcí s 9-fluoromethyl chloroformátem, N-hydroxysuccinimidyl-6-chinolylyl karbamátem nebo o-ftaldialdehydem (OPA). Iontově párovou RP-HPLC nebo iontově výměnnou chromatografií lze stanovit aminy po postkolonové derivatizaci OPA. V poslední době se jeví jako velmi spolehlivé a vysoce citlivé chromatografické metody s elektrochemickou detekcí nebo detekcí pomocí hmotnostní spektrometrie (LC/MS) [5].

Pro detekci bakterií produkujících biogenní aminy se využívají i metody molekulární biologie, zejména PCR, pomocí které lze s využitím specifických primerů rychle zachytit bakterie nesoucí příslušné geny zodpovědné za produkci dekarboxylačních enzymů [18,26].

2 MIKROORGANIZMY S DEKARBOXYLÁZOVOU AKTIVITOU

Mezi dekarboxylační reakce můžeme zařadit procesy dekarboxylace vedoucí k tvorbě biogenních aminů [16].



Obr. 2. Dekarboxylační reakce [16]

Schopnost dekarboxylovat aminokyseliny mají pouze mikroorganismy, u kterých jsou přítomny dekarboxylázové enzymy. Dekarboxylázy patří do skupiny enzymů lyáz. [7].

Mikroorganismy, které produkují dekarboxylázy, mohou být v produktech přirozeně přítomné nebo mohou být vnesené do potravin před technologickým zpracováním, v jeho průběhu nebo po ukončení výroby [10].

Dekarboxylační reakce, příznačné především pro diaminokyseliny, jsou katalyzovány substrátově specifickými dekarboxylázami vytvářenými zástupci bakterií z čeledi *Enterobacteriaceae*, rodu *Enterococcus*, *Micrococcus*, *Pseudomonas*, a některými dalšími hnilobnými bakteriemi, ale také řadou druhů bakterií mléčného kvašení (*Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*) [7] a plísněmi [27].

Bakterie z čeledi *Enterobacteriaceae* (především *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae*) jsou jako kontaminující mikroflóra v potravinách zodpovědné za tvorbu kadaverinu, putrescinu a histaminu. Tyto kmeny jsou součástí střevní mikroflóry člověka a hospodářských zvířat. Protože tyto bakterie jsou termolabilní, je jejich přítomnost v mlékárenských výrobcích důsledkem buď nedostatečného pasteračního režimu nebo špatné hygieny a sanitace v závodě [10].

3 BAKTERIE MLÉČNÉHO KVAŠENÍ

Název této skupiny bakterií je odvozen od jejich schopnosti fermentovat sacharidy na kyselinu mléčnou jako hlavní výsledný produkt. Označením bakterie mléčného kvašení (BMK) není myšlena přesně definovaná taxonomická skupina, ale řada fylogeneticky více či méně příbuzných rodů s několika společnými biochemickými a ekologickými znaky. Součástí bakterií mléčného kvašení je také dnes hodně diskutovaná skupina probiotik [28].

3.1 Taxonomie bakterií mléčného kvašení

Bakterie mléčného kvašení tvoří heterogenní skupinu, do které patří mimo jiné rody *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Sporolactobacillus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* a *Weissella* [29].

Bakterie mléčného kvašení jsou grampozitivní nesporogenní mikroaerofilní bakterie. Morfologicky se bakterie mléčného kvašení řadí jak mezi koky, tak mezi tyčinky a obecně neprodukují katalázu. Název této skupiny bakterií je odvozen od jejich schopnosti fermentovat sacharidy na kyselinu mléčnou jako hlavní výsledný produkt - homofermentace (např. *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*). Při heterofermentaci (např. *Leuconostoc*, *Lactobacillus*) vznikají kromě kyseliny mléčné rovněž kyseliny jablečná, jantarová, mravenčí, octová, etanol a oxid uhličitý [29].

Třídění bakterií mléčného kvašení do jednotlivých rodů je především založeno na morfologických vlastnostech, způsobu zkvašování glukózy, růstu při různých teplotách, prostorové konfiguraci produkované kyseliny mléčné (D, L nebo obě formy), schopnosti růstu při vysoké koncentraci soli a na základě posouzení tolerance ke kyselému či zásaditému prostředí [30].

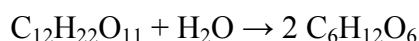
3.2 Pozitivní význam bakterií mléčného kvašení

Některé rody bakterií mléčného kvašení jsou producenty bakteriocinů. Jedná se o sloučeniny bílkovinné povahy, které vykazují baktericidní aktivitu proti omezenému spektru mikroorganismů, většinou úzce příbuzných s daným producentem [29].

Rody *Lactobacillus*, *Enterococcus* a *Bifidobacterium* jsou užívány rovněž jako probiotika s cílem kompenzovat účinky nepříznivých faktorů působících na lidský organizmus [29].

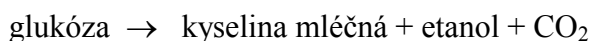
3.3 Fermentace laktózy

Základním biochemickým pochodem zajišťovaným čistými mlékařskými kulturami při výrobě zakysaných mléčných výrobků je anaerobní proces přeměny sacharidů na kyselinu mléčnou katalyzovaný komplexem enzymů. Při fermentaci laktózy se musí tento disacharid činností enzymu β -galaktozidázy, vytvořené bakteriemi mléčného kvašení nejprve hydrolyzovat na monosacharidy glukózu a galaktózu. Obecně je možno vyjádřit tento proces rovnicí: [31].



Obr. 3. Homofermentativní mléčné kvašení [32]

Při tzv. homofermentativním mléčném kvašení je jediným výsledným produktem zkvašování glukózy kyselina mléčná (obr. 3). Kyselina pyrohroznová se přímo redukuje na kyselinu mléčnou, přičemž NADH^+H^+ se oxiduje zpátky na NAD^+ . Typickým kvašením pro mnohé mléčné bakterie je heterofermentativní mléčné kvašení. Na rozdíl od homofermentativního mléčného kvašení, ve kterém z jedné molekuly glukózy vznikají dvě molekuly kyseliny mléčné, výslednými produkty heterofermentativního mléčného kvašení jsou kyselina mléčná, etanol a CO_2 (obr. 4) v molárním poměru 1:1:1 [32].



Obr. 4. Heterofermentativní mléčné kvašení [32]

3.4 Výskyt a význam bakterií mléčného kvašení

Bakterie mléčného kvašení se přirozeně vyskytují v různých prostředích. Zejména v místech s vysokými koncentracemi sacharidů, aminokyselin, vitaminů a vyšší tenzí CO_2 . Tvoří dominantní část mikroflóry trávicího a urogenitálního traktu člověka i zvířat. Bývají nalézány v klinickém materiálu humánního a animálního původu. Bakterie mléčného kvašení jsou významnou složkou mikroflóry potravin (mléčné výrobky, fermentované maso a zelenina, cereálie, těsto, nápoje) [29].

Bakterie mléčného kvašení jsou důležité pro správné složení střevní mikroflóry, z čehož vyplývá i snížení rizika průjemových onemocnění a zvýšení humorální i buněčné imunity, snížení hladiny cholesterolu a triacylglyceridů, snížení možnosti vzniku nádorů a zvýšení

mineralizace a hustoty kostí. Díky schopnosti fermentace sacharidů na kyselinu mléčnou (snížení pH a redoxpotenciálu) a produkci látek s antimikrobiálním účinkem (nisin a ostatní bakteriociny) mají schopnost prodloužit trvanlivost potravin inhibicí nežádoucí mikroflóry [33]. Těchto vlastností se využívá ke zvýšení trvanlivosti a zdravotní nezávadnosti potravin. Produkty metabolismu dávají potravinám typické organoleptické vlastnosti (chuť, vůně, vzhled) [29].

3.5 Startovací kultury

Historicky byly a jsou bakterie mléčného kvašení využívány jako startovací kultury při výrobě potravin, zvláště fermentovaných mléčných výrobků. Bakterie mléčného kvašení jsou obecně považovány za zcela bezpečné organizmy – mají status GRAS (generally recognized as safe). Startovací kultury jsou vybrané a prověřené kmeny mikroorganismů, které jsou ve formě čisté kultury nebo ve směsích s jinými kmeny přidávány do potravin v průběhu výrobního procesu [34].

Výběrem vhodných startovacích kultur (*Pediococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*) při výrobě fermentovaných produktů lze zajistit jejich požadované příznivé organoleptické vlastnosti (chuť, vůni apod.) [34].

3.6 Funkční potraviny – probiotika

Problematika funkčních potravin patří v oblasti lidské výživy mezi nejsledovanější témata v Evropě, Spojených státech, Kanadě i v Japonsku. Funkční potraviny jsou potraviny, které mají při pravidelné konzumaci příznivě ovlivňovat zdravotní stav člověka. V určitém množství příznivě působí na složení a rovnováhu střevní mikroflóry a tak i na lidské zdraví [35].

Probiotika (z řečtiny, „pro život“) jsou živé mikroorganismy, které se dostávají do těla v potravě. Probiotika jsou bakterie, převážně bakterie mléčného kvašení. Ne všechny mléčné bakterie však mají probiotické vlastnosti, a proto je důležité, aby byli spotřebitelé o této problematice dostatečně informováni [35].

Probiotické kultury mohou mít funkci startovacích kultur nebo jsou přidávány pro dosažení pozitivního účinku na lidské zdraví.

Kultury těchto bakterií:

- jsou humánního (lidského) původu,
- nejsou patogenní či toxické,
- neničí se v kyselém prostředí a v přítomnosti žluči (nesmí být během průchodu zažívacím traktem zničeny nebo oslabeny),
- neničí se během výrobního procesu a zůstávají životaschopné po celou dobu trvanlivosti potraviny,
- je prokázán jejich pozitivní vliv na zdravotní stav [35],
- musí se v místě působení (ve střevě) množit [34].

Během fermentace potravin produkují tyto probiotické kultury řadu biologicky aktivních látek, které mohou příznivě, ale i negativně (biogenní aminy), ovlivňovat lidské zdraví. Schopnost tvořit biogenní aminy je při plánovaném použití probiotických kultur bakterií mléčného kvašení pro výrobu fermentovaných potravin nežádoucí. Je velice důležité vybírat takové kmeny bakterií mléčného kvašení, které neprodukují biogenní aminy. Proto byly do výroby zavedeny metody umožňující detekci mikroorganismů produkujících biogenní aminy [34,36].

4 ROD *LACTOCOCCUS*

Jedním z nejvýznamnějších zástupců bakterií mléčného kvašení je rod *Lactococcus*. Jedná se o grampozitivní mikroaerofilní koky s homofermentativním typem metabolismu glukózy [37]. Hlavním produktem fermentace glukózy je tedy kyselina mléčná. Dále může vznikat malé množství diacetylu, jež způsobuje typické aroma [38].

Rod *Lactococcus* obsahuje šest druhů, *L. garviae*, *L. piscium*, *L. plantarum*, *L. raffinolactis*, *L. chuangangensis* a *L. lactis*. Nejvýznamnější zástupce rodu *Lactococcus*, druh *Lactococcus lactis*, zahrnuje tři poddruhy. *L. lactis* subsp. *lactis*, *L. lactis* subsp. *cremoris* a *L. lactis* subsp. *hordniae*, který byl izolován z rostlinného materiálu (*Hordnia circellata*) a není průmyslově využíván [37].

Nejobvyklejším prostředím pro *L. lactis* subsp. *lactis* a subsp. *cremoris* je mléko a mléčné výrobky. Syrové kravské mléko běžně obsahuje *L. lactis* subsp. *lactis*, v menším množství i subsp. *cremoris* [37].

Druh *Lactococcus lactis* s poddruhy *lactis* a *cremoris* je celosvětově používán v mlékárenském průmyslu při výrobě fermentovaných mléčných výrobků. Některé kmeny produkují antibiotikum nisin, který inhibuje růst grampozitivních bakterií (např. klostridií) [39].

Ve výjimečných případech byl popsán *L. lactis* jako původce humánních infekcí. Jedná se například o endokarditidy, převážně však u imunosuprimovaných jedinců, u kterých souběžně probíhalo jiné závažné onemocnění. Postižení jedinci vykazovali sníženou obranyschopnost organismu způsobenou dysfunkcí imunitního systému, chemoterapií nebo poškozením tkáňových bariér. Riziko infekce *L. lactis* je velmi nízké, v žádném popsaném případě nebyla přímá souvislost mezi infekcí a konzumací fermentovaných potravin [37].

4.1 *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*

Lactococcus lactis subsp. *cremoris* představuje součást smetanové (základní) kultury, určené k výrobě kysaných nápojových, tvarohových a sýrových výrobků a k výrobě másla a sýrů. Patří mezi mezofilní streptokoky mléčného kvašení, které jsou vedle kmenů *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* důležitým producentem kyseliny mléčné. Některé kmeny jsou schopny vytvářet malé množství aromatických látek. Charakteristické vlastnosti, kterými se liší od *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, jsou například nižší optimální teplota růstu, tvorba

měřitelného množství CO₂ a morfologicky se vyznačuje zpravidla většími buňkami, které tvoří dlouhé řetízky [40,41].

Další vlastnosti druhu *Lactococcus lactis*

Taxonomické zařazení rodu *Lactococcus* je následující:

Doména *Bacteria* - Oddělení *Firmicutes* - čeleď *Streptococaceae*.

Reakce na Gramovo barvení: pozitivní.

Kolonie: 1-2 mm nepigmentované až béžové okrouhlé kolonie s hladkými okraji, lesklé, vypouklé (obr. 5).

Tvar a uspořádání buněk: nesorulující kokovité nebo oválné buňky v párech nebo kratších řetízcích (obr. 6).

Velikost buňky: 0,5-1,5 x 0,5-1,2 μm.

Pohyblivost: nepohyblivý.

Vztah ke kyslíku: fakultativně anaerobní.

Způsob výživy: chemoorganotrofní.

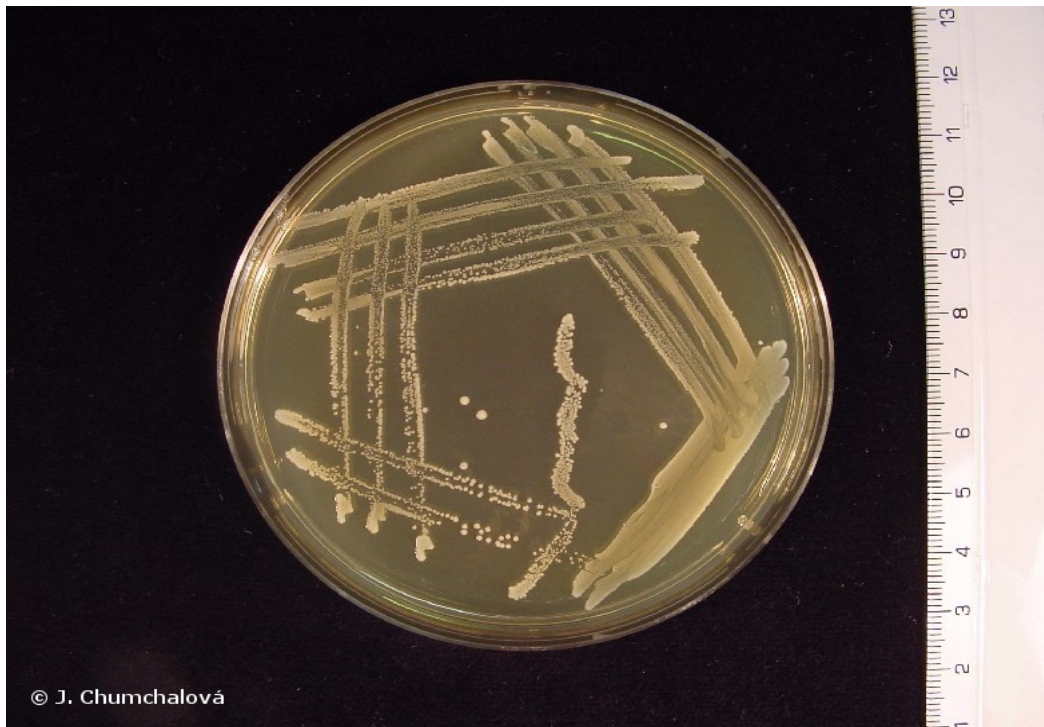
Optimální kultivační teplota: 30°C.

Speciální požadavky na výživu a růst: komplexní kultivační média, aminokyseliny, vitaminy.

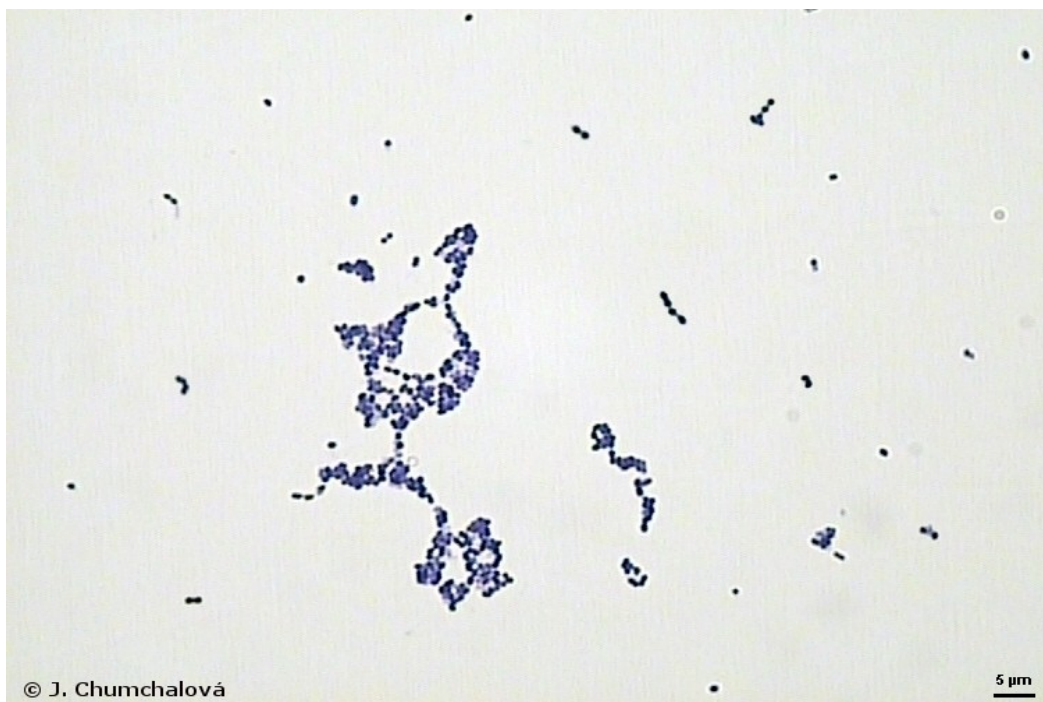
Hlavní diagnostické znaky: kataláza negativní, oxidáza negativní, fermentativní metabolismus, sacharidy štěpí na L(+) kyselinu mléčnou, z argininu netvoří amoniak.

Výskyt a význam: výskyt - rostlinný materiál; použití - fermentované mléčné výrobky s táhlovitou strukturou.

Poznámka: produkce sloučenin způsobujících táhlovitost, neroste při pH 9,2 nebo 40 °C [42].



Obr. 5. *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*: Vzhled povrchových kolonií po aerobní kultivaci na M17 agaru s glukózou (48 h při 30°C). [42]



Obr. 6. *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*: Barveno podle Grama po aerobní kultivaci v M17 bujonu s glukózou (18 h při 30°C), zvětšení 10 x 100. [42]

II. PRAKTICKÁ ČÁST

5 CÍLE PRÁCE

Teoretická část této diplomové práce měla za cíl charakterizovat skupinu biogenních aminů. Popsat je jako látky, které v nízkých koncentracích jsou pro živé organismy nezbytné, ale také upozornit na jejich toxikologickou významnost. Vysvětlit proces dekarboxylace, vedoucí k jejich tvorbě, včetně určení faktorů, které mohou tvorbu ovlivňovat. Součástí bylo také blíže specifikovat mikroorganismy schopné dekarboxylázové aktivity, především se pak zaměřit na skupinu bakterií mléčného kvašení, které se hojně využívají v potravinářství.

Praktická část této práce byla zaměřena na sledování tvorby biogenních aminů pomocí iontově-výměnné kapalinové chromatografie s postkolonovou ninhydrinovou derivatizací a spektrofotometrickou detekcí ($\lambda = 570$ nm) bakteriemi mléčného kvašení *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* a *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* při různých podmínkách kultivace. Těmito podmínkami byly:

- různá koncentrace laktózy - 0; 0,25; 0,50; 0,75 nebo 1 % (w/v),
- různá koncentrace NaCl - 0; 1 nebo 2 % (w/v),
- vliv aerobního/anaerobního prostředí v kultivačním médiu.

Na základě výsledků získaných z jednotlivých měření byly formulovány závěry.

6 METODIKA A MATERIÁL

6.1 Kultury bakterií

V experimentální části této práce byla sledována produkce biogenních aminů u následujících kmenů získaných ze Sbírký mlékařských mikroorganismů Laktoflora (Cultures Collection of Dairy Microorganisms - CCDM):

- *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 824
- *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 946
- *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* CCDM 1004

6.1.1 Příprava suspenze bakterií

Laktokoky byly kultivovány v M17 bujónu nebo agaru (Oxoid, Basingstoke, UK) obohaceném o 0,5 % (w/v) laktózy (LachNer, Neratovice, ČR) po dobu nutnou k dosažení potřebné hustoty suspenze bakterií (24 – 48 hodin) při 30 ± 1 °C. Hustota bakterií byla ověřena měřením optické hustoty buněk při vlnové délce 600 nm (OD_{600}).

Nejdříve bylo připraveno inokulum, ze kterého byla následně přichystána suspenze bakterií. Inokulum bylo připraveno zaočkováním 20 ml příslušného kultivačního média sledovanými bakteriemi ze šikmého agaru nebo Petriho misky. Buňky byly kultivovány při teplotě 30 ± 1 °C po dobu 24 hodin.

Suspenze bakterií byla připravena zaočkováním 10 ml příslušného kultivačního média připraveným jednodenním inokulem o objemu 25 μ l. Bakterie byly následně kultivovány při teplotě 30 ± 1 °C po dobu 24 hodin. S takto připravenou suspenzí bakterií byly následně prováděny testy na dekarboxylázovou aktivitu bakterií.

6.1.2 Kultivační média

Bujón M17

M17 (Oxoid).....	67,25 g
glukóza (Lach-Ner)	5,00 g
voda.....	1000,00 ml

Příprava půdy: Bylo naváženo 37,25 g půdy M17 s příslušnými sacharidy, NaCl (Lach-Ner) a aminokyselinou tyrozinem (Sigma-Aldrich) a vše bylo rozpuštěno v 1000 ml vody. Sterilizace proběhla v autoklávu při 121°C po dobu 15 minut.

V závislosti na sledovaných vnějších faktorech byl bujón M17 (o objemu 5 ml) s přídavkem 0,2 % (w/v) tyrozinu obohacen o:

- laktózu v koncentracích 0; 0,25; 0,50; 0,75 a 1,00 % (w/v) bez současného přídavku NaCl,
- NaCl v koncentraci 1 % (w/v) a laktózu v koncentracích 0; 0,25; 0,50; 0,75 a 1,00 % (w/v),
- NaCl v koncentraci 2 % (w/v) a laktózu v koncentracích 0; 0,25; 0,50; 0,75 a 1,00 % (w/v).

Příslušné kultivační médium o objemu 5 ml bylo zaočkováno vždy 25 µl suspenze bakterií narostlých přes noc.

6.2 Průběh experimentu

V experimentu byl sledován vliv vybraných vnějších faktorů (přídavek laktózy, NaCl a aerobní/anaerobní prostředí), které mohou ovlivnit produkci biogenních aminů při výrobě přírodních sýrů.

Kultivace kmenů pozitivních na produkci tyraminu probíhala při teplotě 10 ± 1 °C v rozmezí 1 až 15 dnů.

V experimentu byl rovněž sledován vliv aerobního/anaerobního prostředí na produkci biogenních aminů, a to tak, že polovina zkumavek byla kultivována aerobně a druhá anaerobně. Anaerobního prostředí bylo dosaženo zakápnutím kultivačního média sterilním parafinovým olejem (750 µl). Odběr vzorků pro analýzy probíhal 0., 1., 2., 3., 4., 5., 6., 7., 10., 12. a 15. den kultivace a to tak, že vždy byly náhodně odebrány od každého kmene a každé úrovně faktoru 2 zkumavky. Od každého kmene tak bylo tedy analyzováno 330 různých variant média po kultivaci bakterií. Celý experiment byl proveden dvakrát.

Kromě detekce biogenních aminů metodou iontové výměnné chromatografie byl ve všech odběrových dnech sledován také nárůst mikroorganismů měřením optické hustoty buněk a pH kultivačního média.

6.3 Iontově výměnná chromatografie pro stanovení biogenních aminů

Biogenní aminy byly stanovovány pomocí iontově-výměnné kapalinové chromatografie po postkolonové ninhydrinové derivatizaci a spektrofotometrické detekci ($\lambda = 570$ nm). Využit byl přístroj Analyzátor aminokyselin AAA 400 (Ingos, Praha, ČR). Pro separaci biogenních aminů byla použita kolona naplněná ionexem Ostion LG ANG (55×3,7 mm; Ingos, Praha, ČR). Jako eluční pufrů byly použity roztoky, jejichž složení je uvedeno v tabulce 1. Postup přípravy ninhydrinového činidla a chemikálie (s výjimkou standardů) byly získány od výrobce AAA 400 (Ingos, Praha, ČR). Standardy biogenních aminů byly zakoupeny od Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). Každá směs (viz níže) byla analyzována minimálně dvakrát. Pokud byla koncentrace biogenních aminů ve směsi příliš vysoká, byl pro ředění použit dávkovací pufr I (tabulka 1).

Tabulka 1: Složení sodnocitrátových pufrů použitých při detekci biogenních aminů (složení uvedeno v gramech na celkový objem pufru 1 l).

Reagencie	Pufr		
	A	B	Dávkovací pufr I
Kyselina citronová monohydrát	1,55	14,00	14,00
Citronan sodný dihydrát	21,00	–	–
Chlorid sodný	5,00	–	11,50
Chlorid draselný	–	171,50	–
Bromid draselný	41,65	–	–
Hydroxid draselný	–	10,00	–
Azid sodný	–	–	0,10
Izopropanol (ml)	250,00	–	–
Tiodiglykol (ml)	–	–	5,00

Kultivační médium bylo po inkubaci mikroorganismů centrifugováno při 10 000.g po dobu 30 minut. Směs byla následně zfiltrována (filtr o porozitě 0,45 μm). Takto připravená směs (100 μl) bylo automaticky nastříknuta do AAA 400. Biogenní aminy byly eluovány podle následujícího programu: pufr A po dobu 0 – 60 minut, pufr B po dobu 60 – 86 minut. Poté byla kolona regenerována 0,2 mol.l⁻¹ NaOH (15 minut) a stabilizována po dalších

19 minut pufrem A. Průtoková rychlost pufru byla $0,3 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$, ninhydrinového činidla $0,2 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$. Eluce probíhala při teplotě $65 \text{ }^\circ\text{C}$ (0 – 41 minut a 111-120 minut) a $45 \text{ }^\circ\text{C}$ (41 – 111 minut).

Jelikož byla separován pouze tyramin, mohl být eluční program zkrácen takto: pufir A po dobu 20 minut, regenerace $0,2 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ NaOH po dobu 5 minut a stabilizace pufrem A 10 minut. Teplota kolony byla udržována na $65 \text{ }^\circ\text{C}$ [43,44].

6.4 Stanovení optické hustoty buněk

V případě bakterií mléčného kvašení pozitivních na produkci biogenních aminů byl jejich růst sledován v jednotlivých odběrových dnech měřením optické hustoty buněk při vlnové délce 600 nm (OD_{600}) proti bujónu M17 (obohaceném o příslušnou koncentraci laktózy nebo NaCl) bez zaočkovaných buněk na spektrofotometru s diodovým polem LIBRA S6 (Biochrom, Cambridge, UK).

6.5 Stanovení pH kultivačního média

Měření pH kultivačního média bylo rovněž využito při sledování nárůstu bakterií mléčného kvašení schopných dekarboxylace, kdy byly v jednotlivých odběrových dnech sledovány změny pH kultivačního média v důsledku růstu bakterií mléčného kvašení a produkce kyseliny mléčné.

Kultivační médium bylo po inkubaci mikroorganismů centrifugováno při $10\,000 \text{ g}$ po dobu 30 minut a po odstranění bakterií byla zjišťována hodnota pH M17 bujónu. Hodnoty pH byly měřeny pH-metrem GRYF209S (GryfHB, Havlíčkův Brod, Česká republika) s kombinovanou skleněnou elektrodou pro biologické vzorky při $22 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$. Všechny vzorky byly měřeny nejméně ve trojím opakování.

7 VÝSLEDKY A DISKUZE

7.1 Chromatografické stanovení biogenních aminů

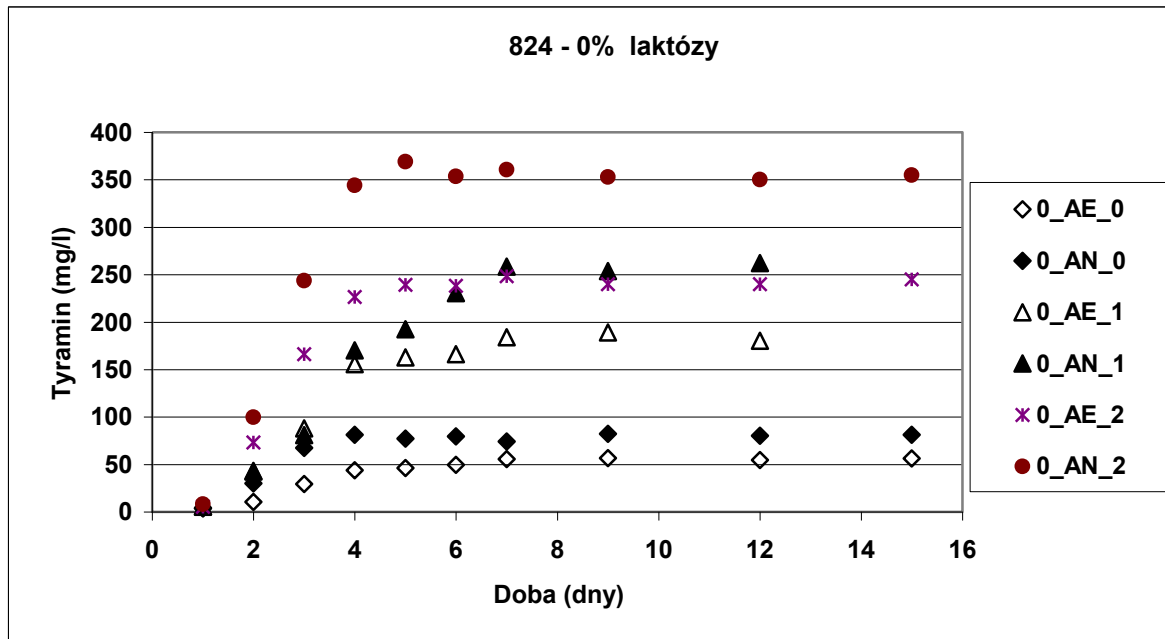
Pomocí metody iontově výměnné chromatografie byla po kultivaci bakterií zjišťována přítomnost biogenních aminů v daném médiu. U žádné z testovaných bakterií nebyla metodou IEC zjištěna produkce putrescinu, kadaverinu ani histaminu. Kdežto produkce tyraminu byla zjištěna u všech tří bakteriálních kultur.

7.1.1 Vliv vnějších faktorů na produkci tyraminu u *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 824

Z daných výsledků je patrné, že nejvyšší hodnoty produkce tyraminu byly zjištěny v případě kultivace v médiu obsahujícím laktózu v koncentraci 0,5%, kde nejvyšší hodnota produkce tohoto biogenního aminu byla přibližně 1120 mg/l kultivačního média. Naopak nejnižší hodnoty produkce tyraminu byly detekovány v médiu bez přídavku laktózy (obrázek 7 – 11). Z daných obrázků rovněž vyplývá, že tyramin se u všech testovaných koncentrací laktózy lépe tvořil v anaerobním prostředí než v aerobním. Nejvyšší produkce byla zaznamenána po anaerobní kultivaci v prostředí s nejvyšší zkoumanou koncentrací NaCl (2%). Nejnižší produkce tyraminu byla zjištěna po kultivaci v aerobním prostředí bez přídavku NaCl.

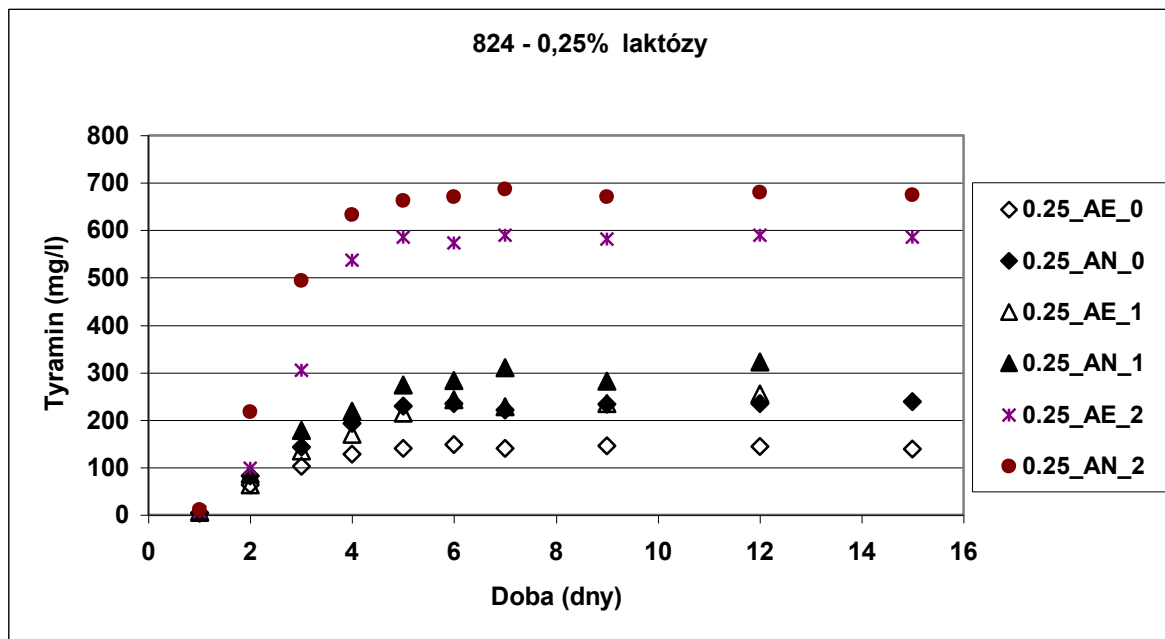
Vyšších hodnot produkce biogenního aminu začal tento kmen dosahovat ve třetím dnu kultivace a růst produkce tohoto sekundárního metabolitu pokračoval zhruba do dne sedmého, kdy byly hodnoty nejvyšší. Po zbytek kultivace se hodnoty produkce tyraminu měnily již jen nepatrně, a to zejména v důsledku vyčerpání živin.

Obrázek 7: Produkce tyraminu u kmene u *L. lactis* subsp. *cremoris* CCDM 824 v prostředí bez laktózy.

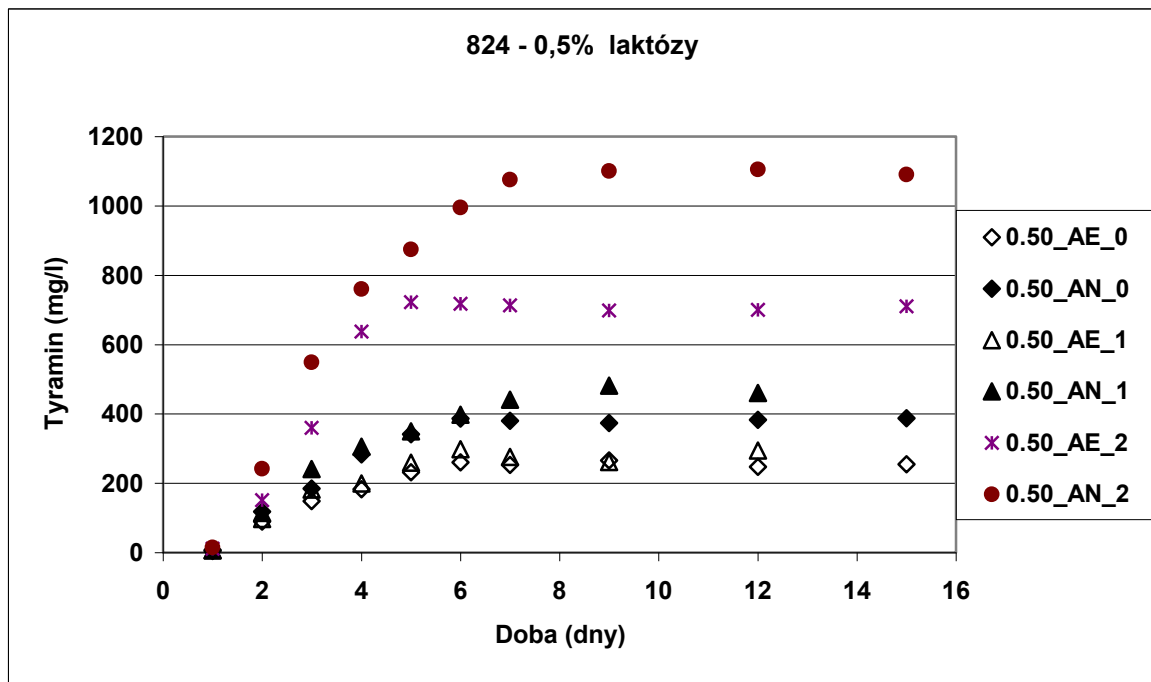


AE – aerobní prostředí; AN – anaerobní prostředí; za typem prostředí koncentrace NaCl v % (w/v). Tyto vysvětlivky platí také pro všechny následující obrázky.

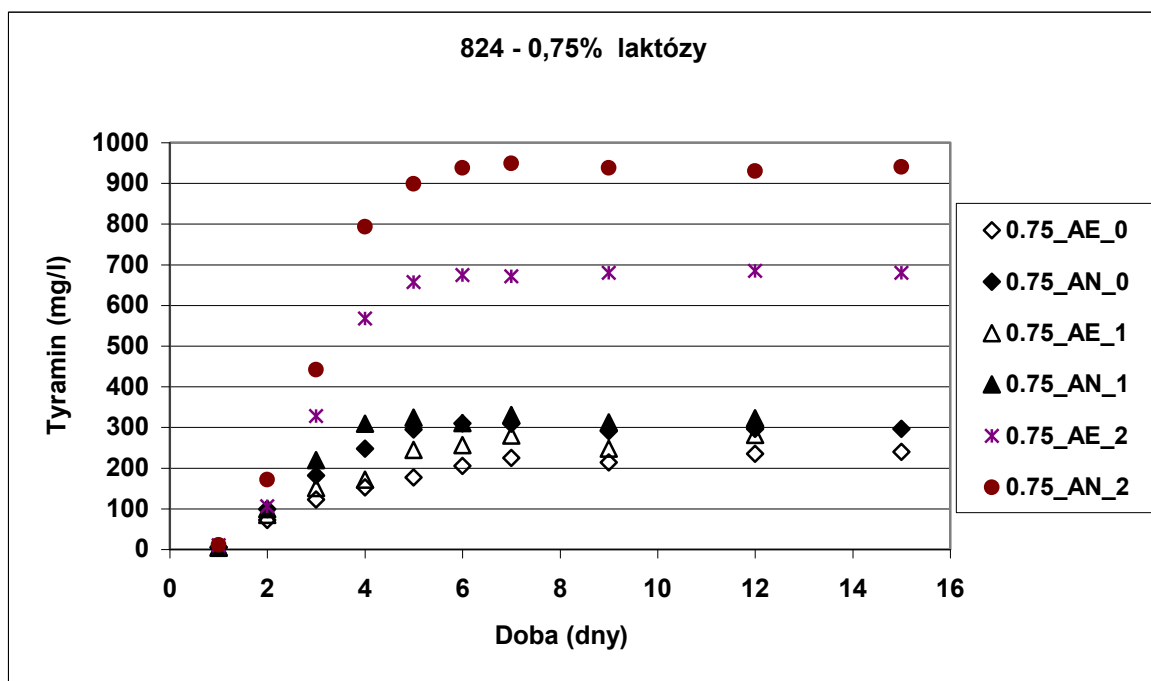
Obrázek 8: Produkce tyraminu u kmene u *L. lactis* subsp. *cremoris* CCDM 824 v prostředí s 0,25 % (w/v) laktózy.



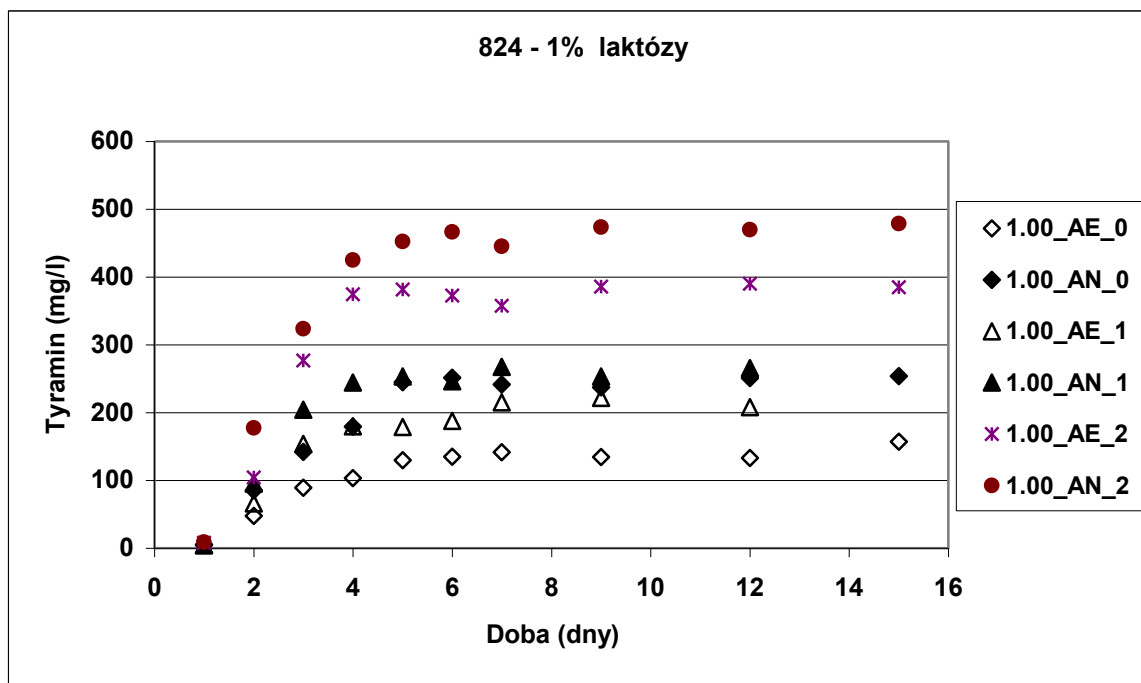
Obrázek 9: Produkce tyraminu u kmene u *L. lactis* subsp. *cremoris* CCDM 824 v prostředí s 0,5 % (w/v) laktózy.



Obrázek 10: Produkce tyraminu u kmene u *L. lactis* subsp. *cremoris* CCDM 824 v prostředí s 0,75 % (w/v) laktózy.



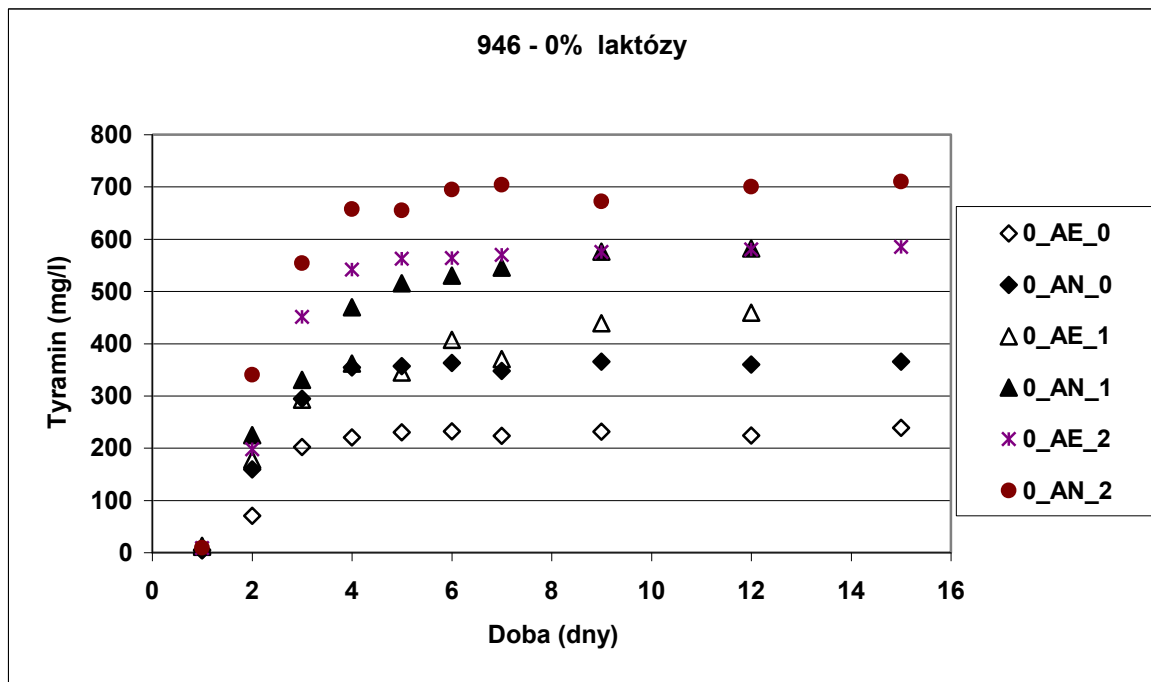
Obrázek 11: Produkce tyraminu u kmene u *L. lactis* subsp. *cremoris* CCDM 824 v prostředí s 1 % (w/v) laktózy.



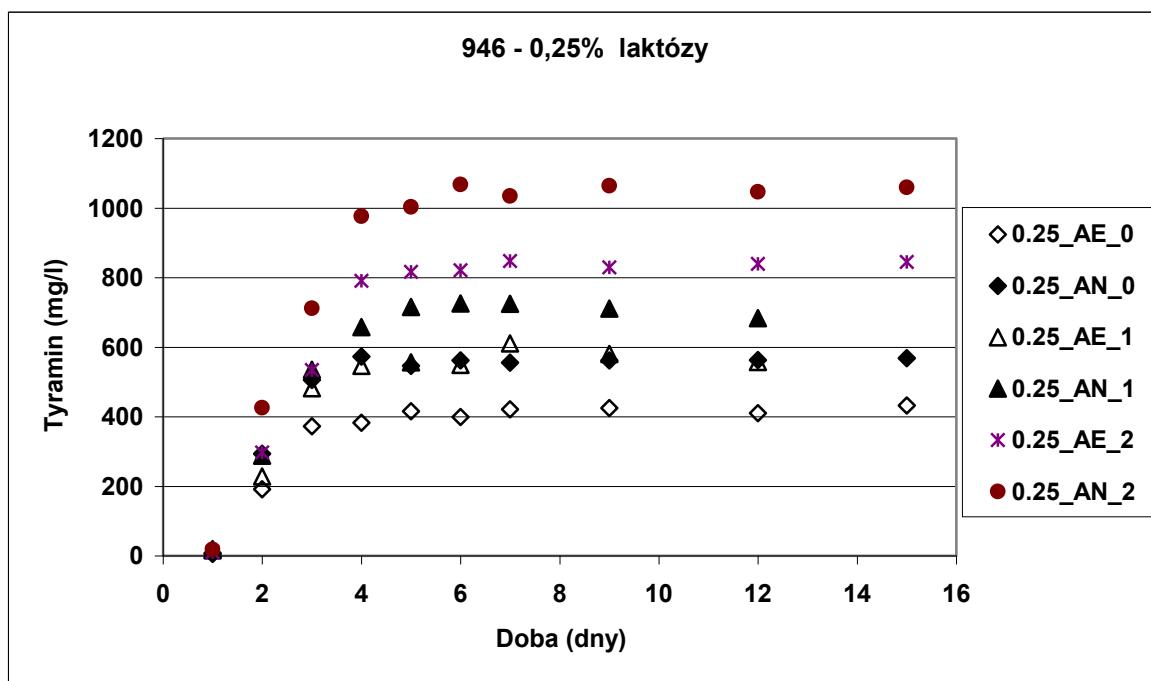
7.1.2 Vliv vnějších faktorů na produkci tyraminu u *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 946

I u druhého kmene byly stanoveny nejvyšší hodnoty produkce biogenního aminu při koncentraci laktózy 0,5 % (w/v). Při nižších koncentracích nebyla laktóza zřejmě přítomna v dostatečné koncentraci pro výživu bakterií a tím i pro proces tvorby tyraminu. Naopak vyšší koncentrace laktózy už na produkci biogenního aminu působily spíše inhibičně. Podobně jako u předchozího testovaného kmene, byla nejvyšší produkce tyraminu zaznamenána v anaerobním prostředí v médiu obsahujícím NaCl v koncentraci 2 % (w/v) a 0,5 % (w/v) laktózy (obrázek 12 – 16). Nejméně tyraminu pak tyto bakterie produkovaly v aerobním prostředí bez přídavku NaCl. Zvyšování množství vyprodukovaného tyraminu je patrné od třetího dne. V období od třetího do sedmého dne probíhal dosti značný nárůst vyprodukovaného tyraminu. V tomto časovém rozpětí byly živiny v substrátu zastoupeny ještě v hojné míře, kdy po jejich zmetabolizování (od 7. dne) byl přerušena exponenciální nárůst tvorby tyraminu a jeho vyprodukované množství dále stagnovalo.

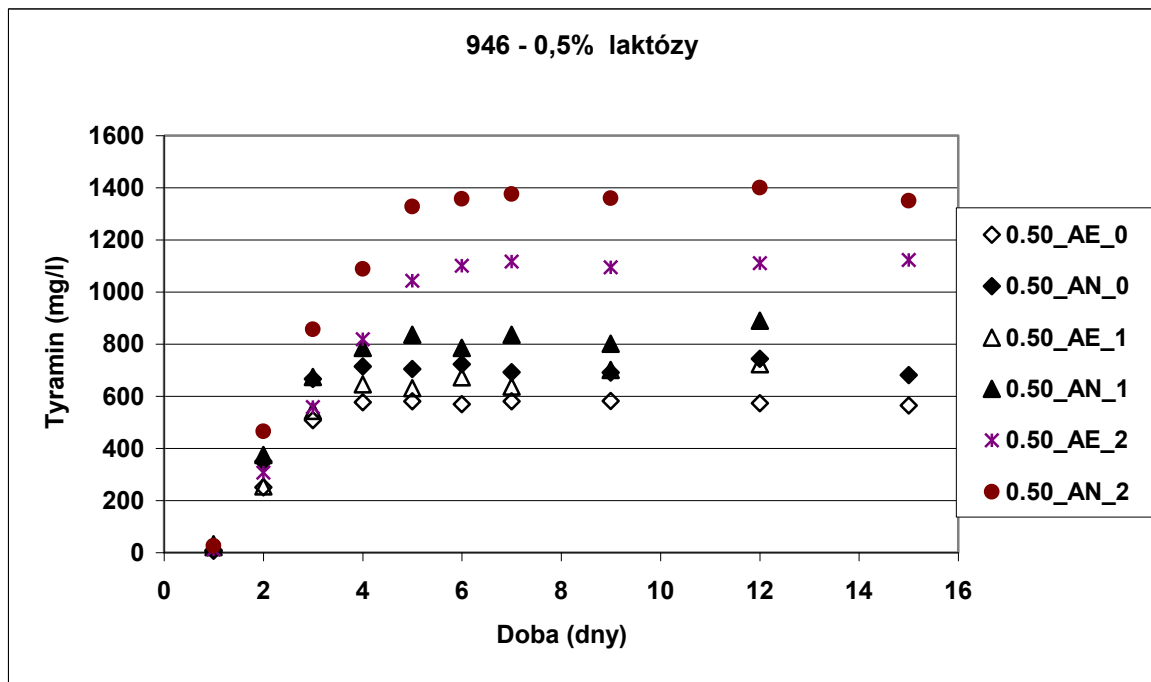
Obrázek 12: Produkce tyraminu u kmene u *L. lactis* subsp. *cremoris* CCDM 946 v prostředí bez laktózy.



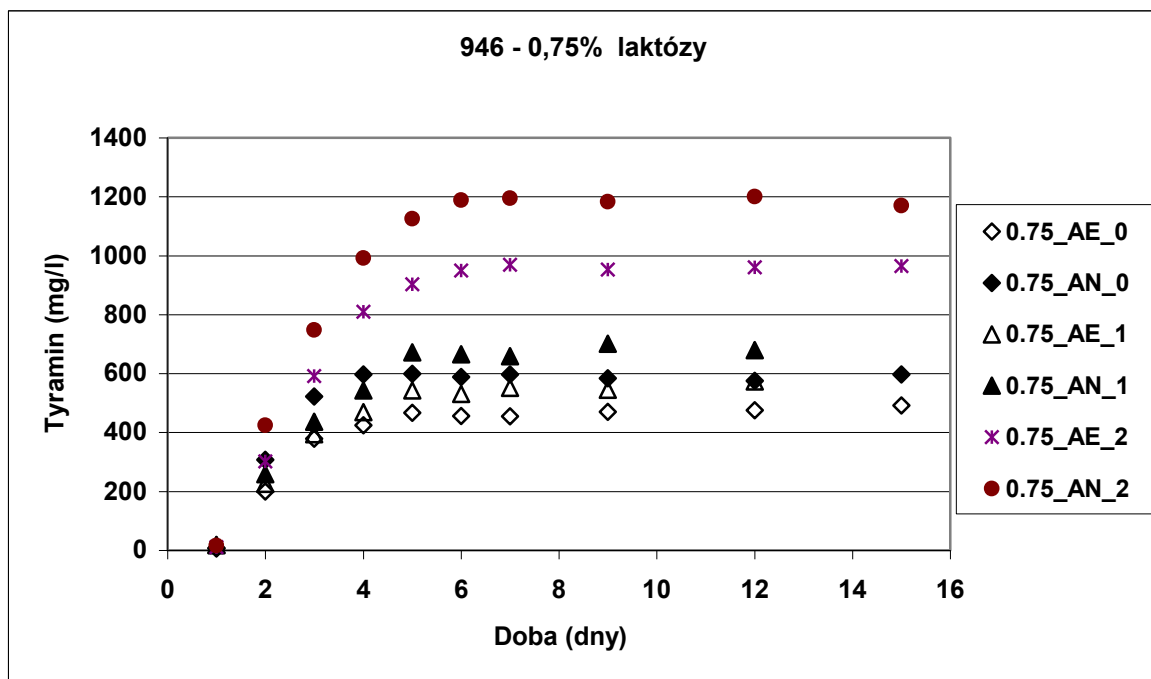
Obrázek 13: Produkce tyraminu u kmene u *L. lactis* subsp. *cremoris* CCDM 946 v prostředí s 0,25 % (w/v) laktózy.



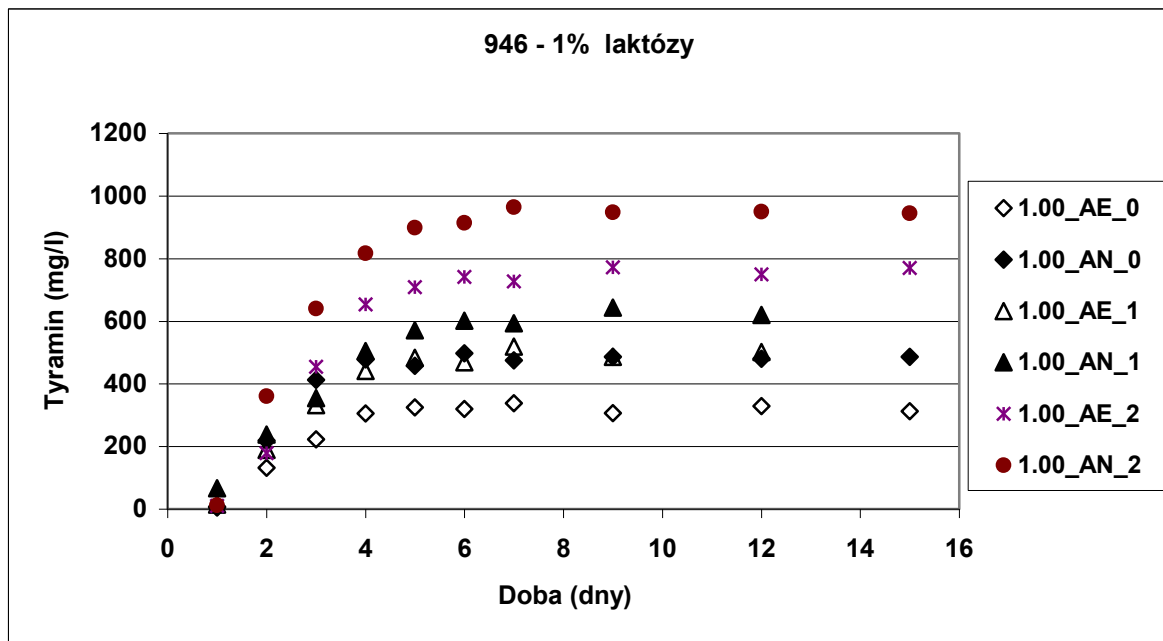
Obrázek 14: Produkce tyraminu u kmene u *L. lactis* subsp. *cremoris* CCDM 946 v prostředí s 0,5 % (w/v) laktózy.



Obrázek 15: Produkce tyraminu u kmene u *L. lactis* subsp. *cremoris* CCDM 946 v prostředí s 0,75 % (w/v) laktózy.



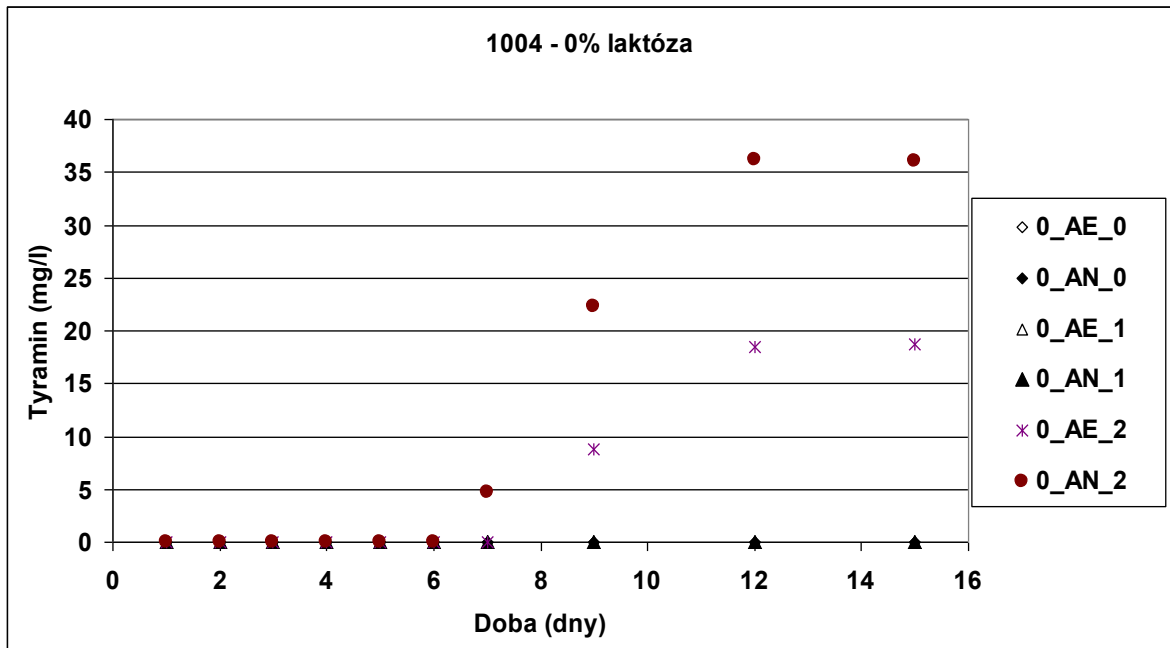
Obrázek 16: Produkce tyraminu u kmene u *L. lactis* subsp. *cremoris* CCDM 946 v prostředí s 1 % (w/v) laktózy.



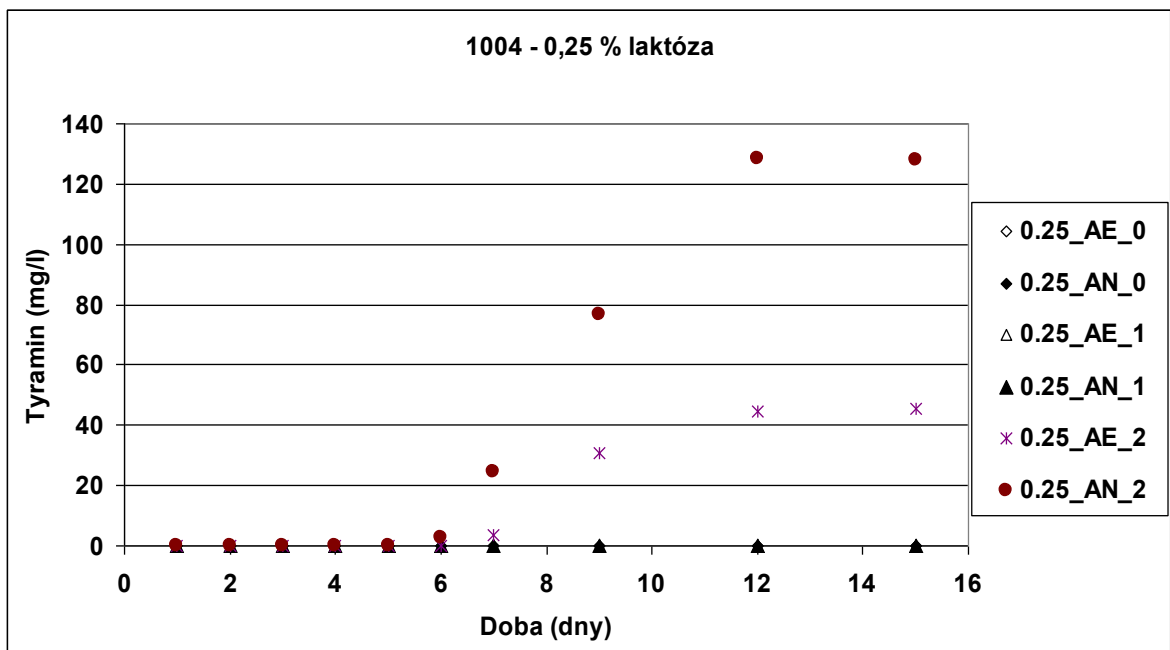
7.1.3 Vliv vnějších faktorů na produkci tyraminu u *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 1004

V případě kmene *L. lactis* subsp. *lactis* CCDM 1004 byla tvorba tyraminu ve srovnání s předcházejícími testovanými kmeny dosti malá (obrázek 17 – 21). Tvorba tohoto biogenního aminu byla patrná jen u mikroorganismů kultivovaných v médiu s 2 % NaCl (w/v), a to až po týdenní kultivaci. Podobně jako u předchozích dvou kmenů byla zaznamenána vyšší produkce tyraminu v médiu po kultivaci bez přístupu kyslíku (anaerobní prostředí), jelikož pro své metabolické pochody kyslík striktně nevyžadují.

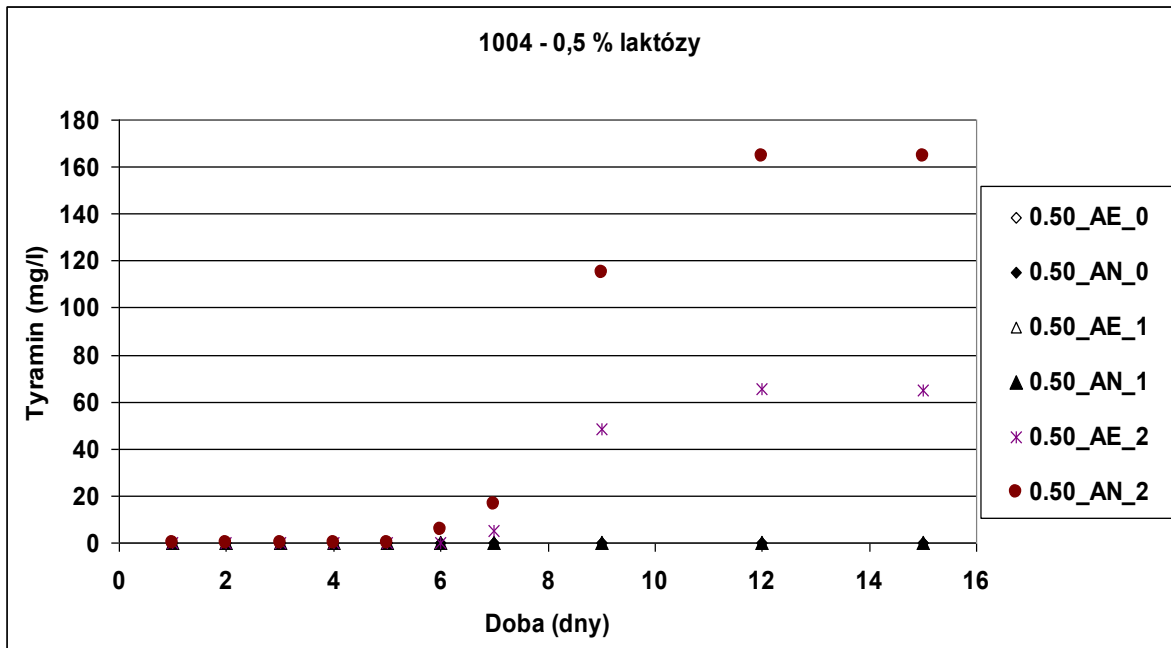
Obrázek 17: Produkce tyraminu u kmene u *L. lactis* subsp. *lactis* CCDM 1004 v prostředí bez laktózy.



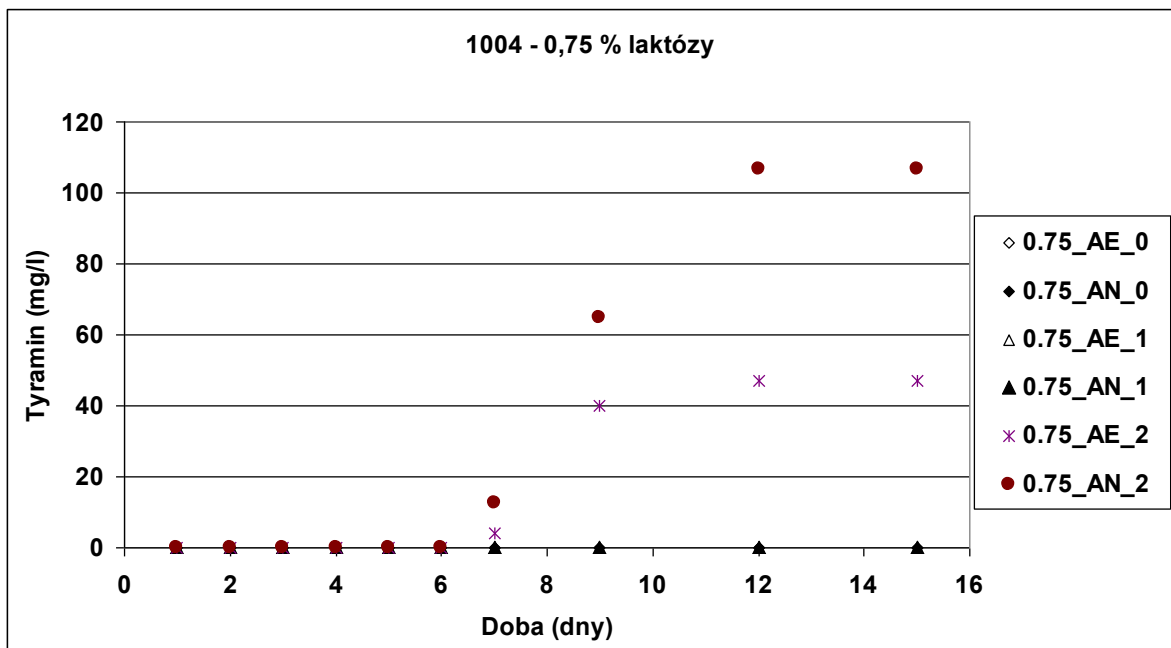
Obrázek 18: Produkce tyraminu u kmene u *L. lactis* subsp. *lactis* CCDM 1004 v prostředí s 0,25 % (w/v) laktózy.



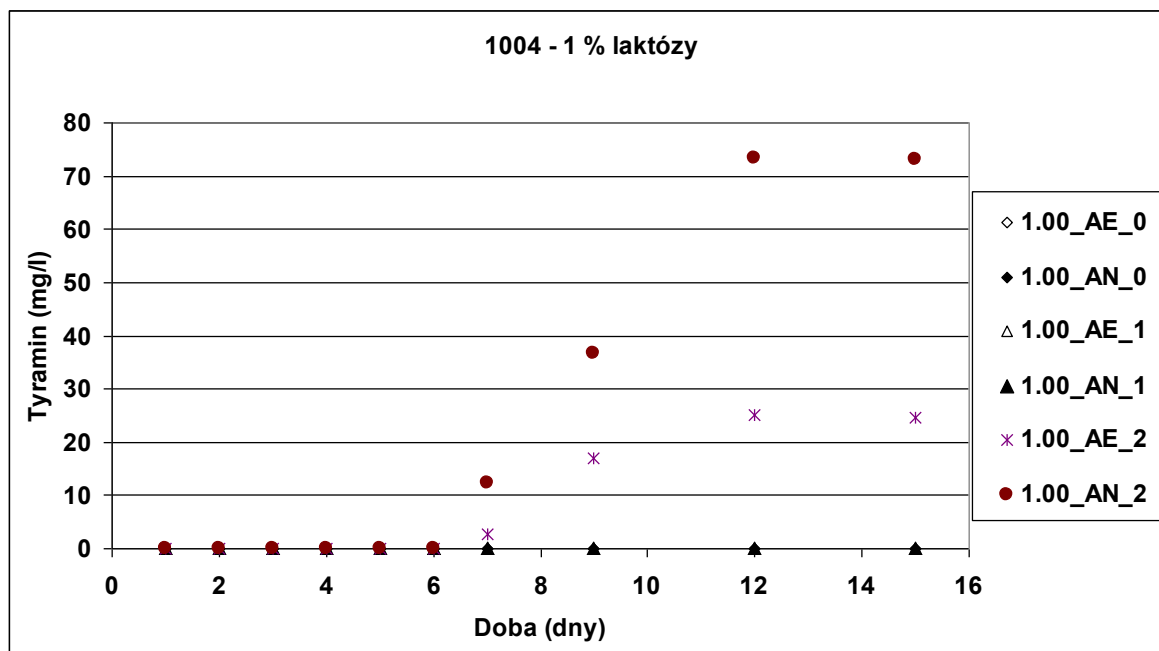
Obrázek 19: Produkce tyraminu u kmene u *L. lactis* subsp. *lactis* CCDM 1004 v prostředí s 0,5 % (w/v) laktózy.



Obrázek 20: Produkce tyraminu u kmene u *L. lactis* subsp. *lactis* CCDM 1004 v prostředí s 0,75 % (w/v) laktózy.



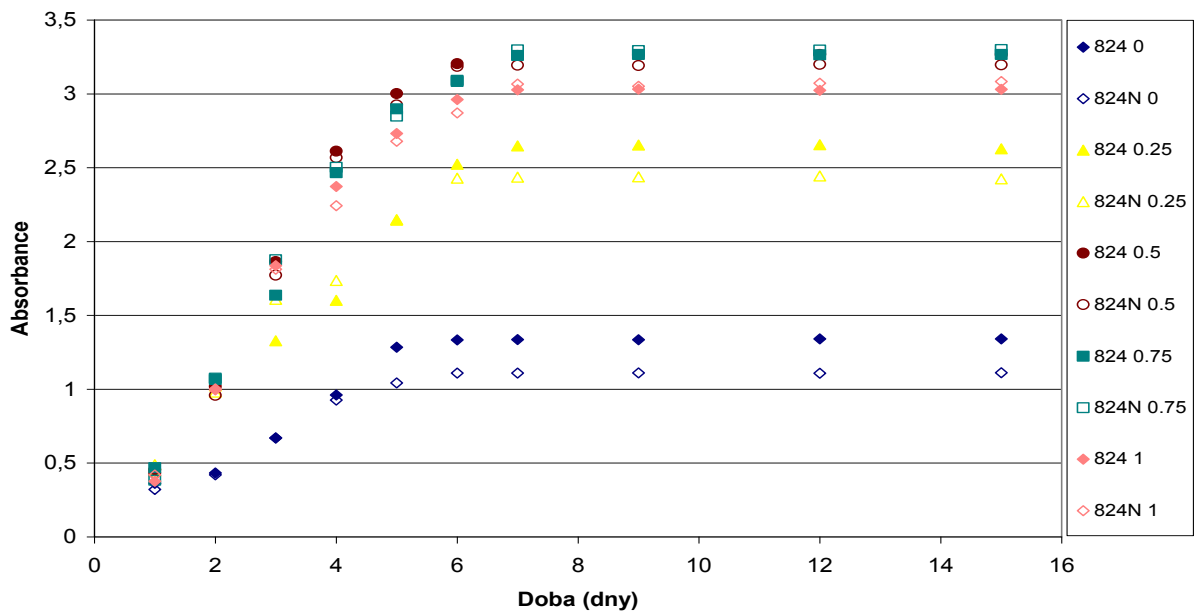
Obrázek 21: Produkce tyraminu u kmene u *L. lactis* subsp. *lactis* CCDM 1004 v prostředí s 1 % (w/v) laktózy.



7.2 Měření nárůstu buněk

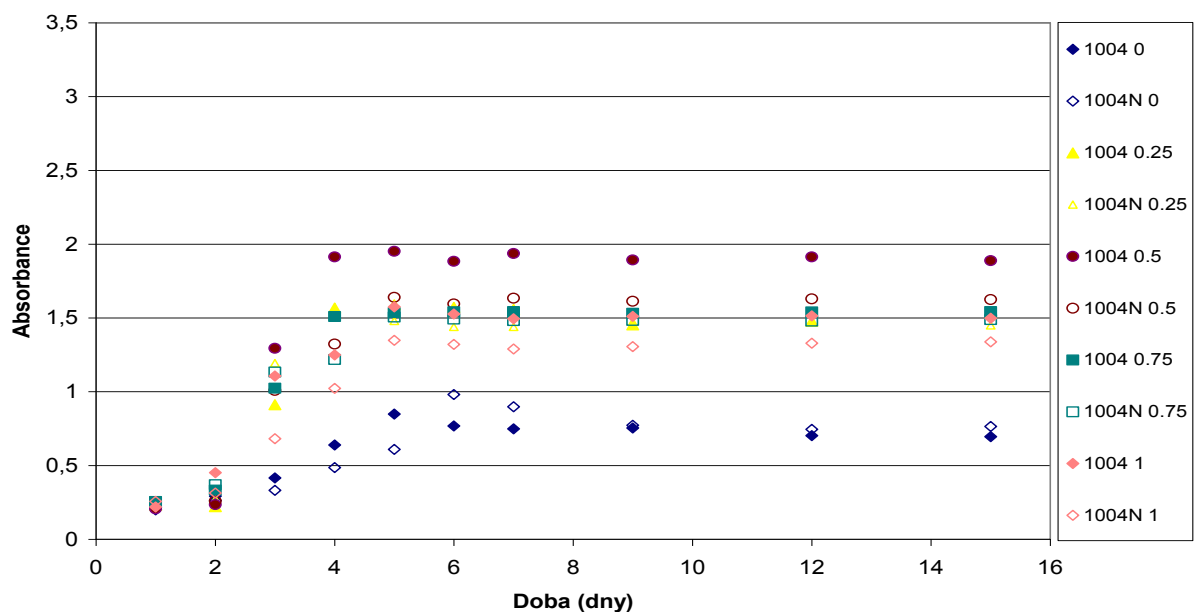
Měření optické hustoty buněk (příloha I - III) byl sledován růst zkoumaných kmenů bakterií mléčného kvašení v závislosti na vybraných faktorech prostředí. Do 7 dne kultivace byl nárůst zkoumaných kmenů největší. Po zbylou dobu kultivace byl daný nárůst již téměř neměnný. Ze všech tří zkoumaných kmenů nejvyšších hodnot zákalu suspenze dosahoval kmen *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 824. Především pak, probíhala-li kultivace v médiu o obsahu 2 % (w/v) NaCl a 0,5 – 0,75 % (w/v) laktózy (obr. 22), kde bylo dosaženo hodnot až 3,3. Nejmenších hodnot pak dosahoval testovaný kmen *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 1004. Úplně nejnižších hodnot měřené optické hustoty tento kmen dosahoval po kultivaci v prostředí bez laktózy a bez soli, a to hodnoty 0,7 (obr. 23). Vliv rozdílnosti aerobního a anaerobního kultivačního prostředí na růst těchto kmenů bakterií mléčného kvašení zásadní význam nemělo.

Obrázek 22: Grafické znázornění průběhu změn absorbance u kmene *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 824, kultivováno s přidavkem 2 % (w/v) NaCl.



N – anaerobní prostředí, hodnoty 0 - 1 vyjadřují koncentraci laktózy % (w/v).

Obrázek 23: Grafické znázornění průběhu změn absorbance u kmene *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 1004, kultivováno bez přidavku NaCl.



N – anaerobní prostředí, hodnoty 0 - 1 vyjadřují koncentraci laktózy % (w/v).

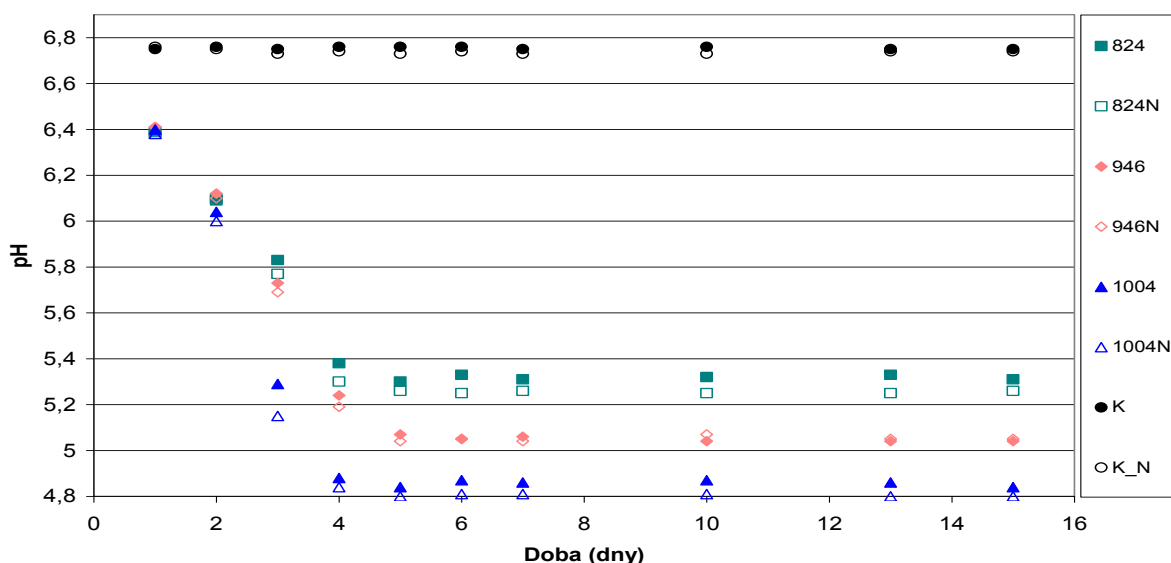
7.3 Stanovení pH kultivačního média

Dalším sledovaným znakem bylo pH kultivačních médií po kultivaci testovaných kmenů bakterií (příloha IV-VI). Důsledkem nárůstu bakterií mléčného kvašení byla zvýšena produkce kyseliny mléčné a tím i pokles pH daného kultivačního média. Největší pokles pH byl zaznamenán v prvních pěti dnech kultivace. V dalších dnech pak pH mírně oscilovalo kolem hodnoty z 5. dne. Dle očekávání byl větší pokles pH u vzorků s koncentrací laktózy 1% (w/v). Vliv aerobního/anaerobního prostředí nemělo na hodnotu pH výraznější vliv. Co se týká koncentrace soli, tak nižších hodnot pH kultivační médium dosahovalo při jejím vyšším obsahu.

Po celou dobu bylo sledováno také kontrolní kultivační médium (tj. bez zaočkovaných bakterií). Jeho pH se pohybovalo v rozmezí 6,70-6,80.

Nejnižší pH (4,8) bylo naměřeno u kmene *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 1004 po sedmidenní kultivaci v anaerobním prostředí s 1% (w/v) laktózy a 2% (w/v) NaCl. (obr. 24).

Obrázek 24: Grafické znázornění průběhu změn pH během kultivace testovaných bakterií mléčného kvašení s přidavkem 1 % (w/v) laktózy a 2 % (w/v) NaCl.



Čísla označují testované kmene, N – anaerobní prostředí, K – kontrolní kultivační médium.

7.4 Souhrnná diskuze

Tato práce byla zaměřena na sledování faktorů vnějšího prostředí (přítomnost laktózy, NaCl, aerobióza/anaerobióza) na dekarboxylázovou aktivitu bakterií rodu *Lactococcus*. Skupina laktokoků byla vybrána zejména z důvodu nedostatku studií vlivu podmínek na dekarboxylázovou aktivitu těchto technologicky využívaných bakterií.

Laktokoky, u nichž byla suspenze buněk připravena kultivací přes noc s prekurzorem tyraminu (aminokyselinou tyrozinem), byly kultivovány v bujónu M17 s přidavkem 0,2 % (w/v) tyrozinu při teplotě 10 ± 1 °C. Přípravou suspenze buněk kultivací s prekurzorem biogenního aminu docílíme toho, že u sledovaných buněk je již započata dekarboxylázová aktivita a je tak eliminován vliv přizpůsobování se bakterií novým podmínkám prostředí. Bylo zjištěno, že pokud se ponechají buňky se schopností dekarboxylovat určitou aminokyselinu delší dobu v prostředí bez prekurzoru, dojde ke zpoždění v produkci biogenních aminů po různě dlouhou dobu a zároveň také ke snížení jejich produkce [45].

Nastavené podmínky průběhu celého experimentu byly voleny tak, aby se jednotlivé faktory (obsah laktózy, NaCl, aerobní/anaerobní prostředí) přiblížily podmínkám technologického procesu při výrobě přírodních sýrů holandského typu. Z tohoto důvodu byla rovněž zvolena i kultivační teplota 10 ± 1 °C, která se využívá při zrání přírodních sýrů.

Získané výsledky této práce ukazují, že *L. lactis* subsp. *cremoris* CCDM 824 a CCDM 946 produkují tyramin za všech sledovaných podmínek. Nárůst tohoto biogenního aminu je přitom značně závislý na nastavených kultivačních podmínkách vnějšího prostředí. Za vhodných podmínek se mohou bakterie mléčného kvašení rychleji množit a tím může být větší i jejich dekarboxylázová aktivita.

U *L. lactis* subsp. *lactis* CCDM 1004 byl tyramin tvořen pouze za určitých podmínek (kultivace v prostředí se 2 % w/v NaCl), čili dekarboxylázová aktivita tohoto kmene byla poměrně malá.

Tyto výsledky prokazují, že schopnost produkce biogenních aminů bakteriemi závisí na kultivačních podmínkách a zároveň, že tato vlastnost je kmenově, ne druhově nebo rodově, specifická [4,46].

Prvním faktorem, který byl při této práci sledován, byl přídavek laktózy, jakožto zdroj živin pro studované laktokoky. V kultivačním médiu bez laktózy byla tvorba tyraminu vždy menší (u všech testovaných koncentrací NaCl). Zároveň byl zaznamenán také mnohem pomalejší nárůst bakterií než v přítomnosti laktózy. Můžeme tedy říci, že kultivační médium bez přídavku laktózy je pro testované bakterie rodu *Lactococcus*, které ke svému růstu vyžadují komplexní média, méně vhodné.

Naopak nejvyšší množství tyraminu bylo u testovaných kmenů detekováno v prostředí s 0,5 % (w/v) laktózy, přičemž s dalším zvyšováním koncentrace laktózy se produkce tyraminu již nezvyšovala, respektive snižovala. Vyšší koncentrace přítomného disacharidu na tvorbu tyraminu zde působí spíše inhibičně. Ke zrychlenému růstu a množení studovaných bakterií mléčného kvašení přitom postačovala i minimální koncentrace laktózy. Již její obsah 0,25 % w/v v kultivačním médiu byl dostatečným množstvím živin a zdrojů energie pro jejich růst [47].

Druhým sledovaným faktorem této práce byl vliv NaCl. Vyšší produkce tyraminu byla stanovena v kultivačních médiích o vyšší koncentraci NaCl.

V jiném experimentu byla zaznamenána produkce biogenních aminů (zejména tyraminu a fenyletylaminu) u *Enterococcus faecalis* v prostředí s 2 % (w/v) NaCl. Pokud byla koncentrace NaCl dále zvyšována, došlo v závislosti na počátečním pH prostředí u tohoto kmene ke snižování produkce biogenních aminů [48]. Tato hraniční koncentrace růstu biogenních aminů je druhově specifická. Při jiných studiích totiž bylo zjištěno, že halotolerantní psychrotrofní bakterie *Morganella psychrotolerans* produkuje více histaminu pokud roste v prostředí se 4 % (w/v) NaCl než v prostředí s 2 % (w/v) NaCl [49]. Obdobně byl sledován vliv NaCl na produkci biogenních aminů u gramnegativních bakterií rodu *Enterobacter* a bylo zjištěno, že tyto bakterie produkují více kadaverinu a histaminu v prostředí s 1,2 – 3 % (w/v) NaCl než v médiu s 0,2 % (w/v) NaCl, přičemž detekované množství biogenních aminů se zvyšovalo se zvyšující se koncentrací NaCl. Pokud bylo do média přidáno ještě více NaCl (4,5 % nebo 6,8 % w/v) došlo již ke snížení produkce biogenních aminů. V případě putrescinu bylo u kmene *Enterobacter cloacae* zaznamenána vyšší produkce po kultivaci s 0,5 % (w/v) a 1 % (w/v) NaCl než v prostředí bez NaCl. Pokud byla koncentrace soli dále zvýšena, došlo u tohoto kmene ke snížení produkce putrescinu [24].

Lze tudíž vyslovit hypotézu, že pokud bychom testovali ještě vyšší koncentrace NaCl (> 2 % w/v), došlo by u testovaných kmenů laktokoků od určitého množství NaCl ke snížení produkce tyraminu [50].

Třetí faktor, ovlivňující dekarboxylázovou aktivitu laktokoků, je vliv aerobního/anaerobního kultivačního prostředí. Vyšší produkce tyraminu byla u všech sledovaných laktokoků stanovena v prostředí anaerobním. Jelikož ale docházelo k podobným, avšak vždy menším, nárůstům i v prostředí s vyloučením kyslíku, můžeme říci, že studované kmeny jsou aerotolerantní. Kyslík pro ně není toxický, ale ke svému růstu jej nevyžadují [51].

Jestliže srovnáme růstovou křivku testovaných laktokoků a křivku produkce biogenních aminů, zjistíme, že produkce biogenních aminů započala během logaritmické fáze jejich růstu a odpovídá tak největšímu nárůstu tyraminu mezi 3. a 7. kultivačním dnem.

V této práci byla také sledována dekarboxylázová aktivita laktokoků v závislosti na pH daného kultivačního média. Je známo, že syntéza a aktivita dekarboxyláz značně závisí na pH kultivačních médií [48,24]. Ke zvýšené aktivitě dekarboxyláz, a tím i k vyšší produkci biogenních aminů, dochází při přidavku sacharidu. Přítomnost cukru má za následek vyšší produkci kyseliny mléčné, čímž se okyselí kultivační médium. Avšak na druhou stranu lze předpokládat, že příliš nízké hodnoty pH budou mít na produkci těchto metabolitů spíše negativní dopad. Je tedy možné, že pro maximální produkci biogenních aminů existuje optimální hodnota pH a po jejím překročení dojde ke snížení dekarboxylázové aktivity bakterií.

Při srovnání testovaných kmenů mezi sebou byl jako nejvýznamnější producent biogenního aminu tyraminu označen kmen *L. lactis* subsp. *cremoris* CCDM 946. Nejvyšších hodnot produkce tyraminu, 1400 mg/kg, dosahoval při anaerobní kultivaci s přidavkem 0,5 % laktózy a 2% NaCl. Menší tvorbu tyraminu způsoboval kmen *L. lactis* subsp. *cremoris* CCDM 824. Jeho maximální dosažená hodnota, 1200 mg/kg, byla také vytvořena v anaerobním kultivačním médiu obsahujícím 0,5 % laktózy a 2 % NaCl. Naopak produkci tyraminu u kmene *L. lactis* subsp. *lactis* CCDM 1004 došlo pouze tehdy, byla-li tato bakterie kultivována v přítomnosti 2 % NaCl.

I u technologicky významných bakterií mléčného kvašení byla zjištěna tvorba toxikologicky významných biogenních aminů. Proto je nezbytné, aby kultury mikroorganismů, které se v potravinářských provozech používají při výrobě sýrů a fermentovaných mléčných výrobků, byly na jejich produkci testovány. Na základě těchto testů by měla proběhnout selekce a vyřazení kmenů s vysokou produkcí biogenních aminů nebo popř. optimalizovat technologický proces výroby tak, aby byla produkce biogenních aminů co nejnižší, čímž by bylo možné zvýšit bezpečnost potravin.

ZÁVĚR

V této práci byly sledovány bakterie mléčného kvašení druhů *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* a *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* na produkci biogenních aminů, a to v závislosti na vybraných faktorech vnějšího prostředí.

Dle výsledků iontově výměnné chromatografie lze konstatovat, že biogenní amin tyramin byl vždy více produkován při anaerobním prostředí než při aerobním a nejvyšších množství produkce dosahoval při nejvyšších testovaných koncentracích NaCl (2%). Při snižujícím se obsahu NaCl bylo produkováno méně tyraminu. Limitujícím faktorem pro tvorbu tyraminu bylo také množství laktózy v kultivačním médiu. Nejvíce tyraminu bylo detekováno při 0,5 % obsahu laktózy.

Kultivace byla sledována po dobu patnácti dní, přičemž nejvyšší nárůst byl sledován od třetího do sedmého dne, kdy zároveň došlo k největšímu nárůstu počtu buněk laktokoků, schopných dekarboxylace. Po sedmém dnu kultivace již byly potřebné živiny vyčerpány, počet buněk se již dále nezvyšoval, a tím byla také pozastavena možná dekarboxylace s tvorbou tyraminu.

Kmeny *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* 824 a *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* 946 produkovaly tyramin za všech testovaných podmínek. Pozitivní produkce tyraminu u kmeny *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 1004 byla pouze v případě kultivace při 2 % NaCl.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] *Přehled změn probíhající v potravinářských surovinách a potravinách během zpracování a skladování.* [online]. [cit. 2011-03-15]. Dostupný z WWW: <http://www.vscht.cz/ktk/www_324/studium/KP/KP1.pdf>.
- [2] LUKÁŠOVÁ J., *Význam mikrobiologie pro zajištění zdravotní nezávadnosti a jakosti potravin.* [online]. [cit. 2011-03-15]. Dostupný z WWW: <<http://www.vetweb.cz/projekt/clanek.asp?pid=2&cid=3482>>.
- [3] KŘÍŽEK M., KALACH P., *Biogenní aminy v potravinách a jejich role ve výživě.* Czech Journal of Food Science, 16: 151-159, 1998.
- [4] ARENA E. M., MANCA DE NADRA C. M., *Biogenic amine production by Lactobacillus.* Journal of Applied Microbiology, 90:158-162, 2001.
- [5] SMĚLÁ D., PECHOVÁ P., KOMPRDA T., KLEJDUS B., KUBÁŇ V., *Chromatografické stanovení biogenních aminů v trvanlivých salámech během fermentace a skladování.* Chemické listy 98:432-437, 2004.
- [6] STANDAROVÁ E., VORLOVÁ L., BORKOVCOVÁ I., *Zastoupení vybraných biogenních aminů v sýrech s bílou plísní na povrchu.* Acta fytotechnica et zootecnica – Mimoriadne číslo, s. 610-617, 2009.
- [7] YONGJIN H., WENSHUI X., XIAOYONG L., *Changes in biogenic amines in fermented silver carp sausages inoculated with mixed starter cultures.* Food Chemistry 104:188-195, 2007.
- [8] JEŽKOVÁ A., Dohnal V., *Vývoj screeningové metody pro monitorování výskytu biogenních aminů v dekarboxylačním médiu.* [online]. [cit. 2011-02-05]. Dostupný z WWW: <<http://www.old.af.mendelu.cz/mendelnet2006/articles/tp/jezkova.pdf>>.
- [9] NOVICKÁ K., KOMPRDA T., *Biogenní aminy v sterilovaném a pasterovaném taveném sýru.* [online]. [cit. 2010-03-25]. Dostupný z WWW: <<http://old.af.mendelu.cz/mendelnet2004/obsahy/tech/novicka.pdf>>.
- [10] GREIF G., GREIFOVÁ M., DVORAN J., KAROVIČOVÁ J., BUCHTOVÁ V., *Štúdium rastu a produkcie biogénnych amínov niektorými mikroorganizmami za modelových podmienok.* Czech Journal of Food Science, 1:15-21, Vol.17.

- [11] KODÍČEK M., *Biochemické pojmy - výkladový slovník*. VŠCHT Praha, 171 s., 2004.
- [12] BURDYCHOVÁ R., *Zástupci startovacích kultur mohou tvořit biogenní aminy*. [online]. [cit. 2008-04-04]. Dostupný z WWW: <<http://www.gate2biotech.cz/zastupci-startovacich-kultur-mohou-tvorit-biogenniaminy/>>.
- [13] KRÍŽEK M., *Možnosti ovlivnění obsahu biogenních aminů v silážích*. Veterinární medicína, 40:111-115, 1995.
- [14] *Enzymy*. [online]. [cit.2008-04-16]. Dostupný z WWW: <<http://www.sps-ul.cz/old/soubory/stdtexty/25enzymy.doc>>.
- [15] *Aminokyseliny*. [online]. [cit.20010-04-24]. Dostupný z WWW: <<http://biochemie.wz.cz/aminokyseliny.html>>.
- [16] PODEŠVOVÁ T., *Dekarboxylázová aktivita mikroorganismů*. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta technologická, Bakalářská práce, 2008.
- [17] FADDA S., VIGNOLO G., OLIVER G., *Tyramine degradation and tyramine/histamine production by lactic acid bacteria and Kocuria strains*. Biotechnology Letters 23: 2015-2019, 2001.
- [18] BUŇKOVÁ L., BUŇKA F., HLOBILOVÁ M., DRÁB V., KRÁČMAR S., *Komparace různých metod detekce dekarboxylázové aktivity u bakterií mléčného kvašení*. Potravinářstvo 4(mimoriadne číslo): 372-380. 2010.
- [19] *Ba-cz*. [online]. [cit.2008-04-16]. Dostupný z WWW: <<http://home.zf.jcu.cz/~krizek/ba-cz/ba-cz.html>>.
- [20] *Přírodně toxické a cizorodé látky v poživatinách, aditiva, bakteriální a plísňová znečištění potravin*. [online]. [cit.2009-11-22]. Dostupný z WWW: <http://home.zf.jcu.cz/public/departments/koz/vyz/pred_08.pdf>.
- [21] STEINHAUSEROVÁ I., *Otravy biotoxiny ryb a mořských živočichů*. Veterinářství 54:172-175, 2004.
- [22] STANDAROVÁ E., BORKOVCOVÁ I., VORLOVÁ L., *Obsah biogenních aminů v sýrech z české obchodní sítě*. Veterinářství 58:735-739, 2008.
- [23] *Biogenní aminy v mléčných výrobcích*. [online]. [cit. 2011-03-17]. Dostupný

- z WWW: <<http://www.gate2biotech.cz/biogenni-aminy-v-mlecnych-vyrobcich/>>.
- [24] GREIF G., GREIFOVÁ M., KAROVIČOVÁ J., *Effects of NaCl concentration and initial pH value on biogenic amine formation dynamics by Enterobacter spp. bacteria in model conditions*. Journal of Food and Nutrition Research, Vol. 45 No.1, pp. 21-29, 2006.
- [25] KOMPRDA T., BURDYCHOVÁ R., DOHNAL V., CWIKOVÁ O., SLÁDKOVÁ P., *Some factors influencing biogenic amines and polyamines content in Dutch-type semi – hard cheese*. European Food Research and Technology, 227:29–36, 2008.
- [26] GOSETTI F., MAZZUCCO E., GIANOTTI V., POLATI S., GENNARO C. M., *High performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry determination of biogenic amines in typical Piedmont cheeses*. Journal of Chromatography A 1149: 151-157, 2007.
- [27] HOŘÁK K., *Fyziologie a biochemie bakterií*. Univerzita J. E. Purkyně, Brno, s. 152, 1979.
- [28] MAXA V., RADA V., *Význam bifidobakterií a bakterií mléčného kvašení pro výživu a zdraví*. Česká zemědělská univerzita (skripta), Praha, 1996.
- [29] ŠTEGNEROVÁ H., NÁPRAVNÍKOVÁ E., STEINHAUSEROVÁ I., ŠVEC P., *Identifikace bakterií mléčného kvašení v mase baleném v podmínkách ochranné Atmosféry*. Veterinářství 57: 39-42, 2007.
- [30] FACKLAM R., ELLIOTT J. A., *Identification, Classification, and Clinical Relevance of Catalase-Negative, Gram-Positive Cocci, Excluding the Streptococci and Enterococci*. Clinical Microbiology Reviews 8: 479-495, 1995.
- [31] HYLMAR B., *Výroba kysaných mléčných výrobků*. SNTL Praha, 1986.
- [32] *Typy kvašení* [online]. [cit. 2010-04-15]. Dostupný z WWW: <<http://www.sci.muni.cz/mikrob/mikrofloraGIT/odk3.htm>>.
- [33] HRUBÝ S., *Probiotika a naše zdraví*. [online]. [cit. 2010-04-15]. Dostupný z WWW: <<http://vademecum-zdravi.cz/probiotika-a-nase-zdravi/>>.
- [34] BURDYCHOVÁ R., DOHNAL V., *Skríning probiotických kultur určených pro*

- výrobu fermentovaných potravin na schopnost tvorby biogenních aminů. *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis* 61: 25-30, 2008.
- [35] *Probiotika*. [online]. [cit. 2010-02-23]. Dostupný z WWW: <<http://flairflow4.vscht.cz/syntCG1.doc>>.
- [36] DAPKEVICIUS E. N. L. M., NOUT R. J. M., ROMBOUTS M. F., HOUBEN H. J., WYMENGA W., *Biogenic amine formation and degradation by potential fish silage starter microorganisms*. *International Journal of Food Microbiology* 57: 107-114, 2000.
- [37] DUŠKOVÁ M., *Identifikace vybraných genů probiotických bakterií mléčného kvašení pomocí PCR*. Diplomová práce, Masarykova univerzita Brno, 2006
- [38] POKORNÁ L., *Sbírka mlékařských kultur Laktoflora '91*. Milcom-servis a.s., Praha, 1991.
- [39] SEDLÁČEK I., *Taxonomie prokaryot*. Vydavatelství Masarykova univerzita, 1. vydání, 38-101, Brno, 2007.
- [40] GÖRNER F., VALÍK L., *Aplikovaná mikrobiologie poživatin*. 1. vydání, Malé centrum, Bratislava, ISBN 80-967064-9-7, s. 528, 2004.
- [41] *Sbírka mlékařských kultur LAKTOFLORA 91, katalog kultur se zaměřením na využití kultur ve výrobní praxi*. Milcolm a.s. Praha: SNTL, 50s, 1991.
- [42] *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* [online]. [cit. 2011-02-23]. Dostupný z WWW: <<http://www.sci.muni.cz/mikrob/Miniatlas/lac-2.htm>>.
- [43] HLOBILOVÁ M., *Srovnání metod pro detekci biogenních aminů u bakterií mléčného kvašení*. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta technologická, Diplomová práce, 2008.
- [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*, 229:533–538, 2009.

- [45] BOVER-CID S., MIGUÉLEZ-ARRIZADO M. J., BECKER B., HOLZAPFEL W. H., VIDAL-CAROU M. C. *Amino acid decarboxylation by Lactobacillus curvatus CTC273 affected by the pH and glucose availability*. Food Microbiology, 25: 269-277, 2008.
- [46] BOVER-CID S., HUGAS M., IZQUIERDO-PULIDO M., VIDAL-CAROU M. C., *Amino acid decarboxylase activity of bacteria isolated from fermented pork sausages*. International Journal of Food Microbiology, 66: 185-189, 2001.
- [47] KAPRÁLEK F., *Fyziologie bakterií*. SPN Praha, 1986.
- [48] GARDINI F., MARTUSCELLI M., CARUSO M. C., GALGANO F., CRUDELE M. A., FAVATI F., GUERZONI M. E., SUZZI G., *Effects of pH, temperature and NaCl concentration on the growth kinetics, proteolytic activity and biogenic amine production of Enterococcus faecalis*. International Journal of Food Microbiology, 64: 105-117, 2001.
- [49] EMBORG J., DALGAARD P., *Modelling the effect of temperature, carbon dioxide, water activity and pH on growth and histamine formation on Morganella psychrotolerans*. International Journal of Food Microbiology, 128: 226-233, 2008.
- [50] BUŇKOVÁ L., *Růstové vlastnosti a dekarboxylázová aktivita vybraných potravinářsky významných bakterií*. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Habilitační práce, 2009.
- [51] SALMINEN S., von WRIGHT, A., *Lactic Acid Bacteria. Microbiology and Functional Aspects*. 2nd ed. New York: Marcel Dekker Inc. 1998.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

BA	Biogenní aminy
BMK	Bakterie mléčného kvašení
CCDM	Sbírka mlékařských mikroorganismů Laktoflora (Cultures Collection of Dairy Microorganisms)
HPLC	Vysokoučinná kapalinová chromatografie
IEC	Iontově výměnná chromatografie
<i>L.</i>	<i>Lactococcus</i>
OPA	<i>o</i> -ftaldialdehyd, deprivatizační činidlo
PCR	Polymerázová řetězová reakce

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1. Vznik biogenních aminů.....	14
Obr. 2. Dekarboxylační reakce.....	20
Obr. 3. Homofermentativní mléčné kvašení.....	22
Obr. 4. Heterofermentativní mléčné kvašení.....	22
Obr. 5. <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> : Vzhled povrchových kolonií po aerobní kultivaci na M17 agaru s glukózou.....	27
Obr. 6. <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> : Barveno podle Grama po aerobní kultivaci v M17 bujonu s glukózou.....	27
Obr. 7. Produkce tyraminu u kmene u <i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> CCDM 824 v prostředí bez laktózy.....	35
Obr. 8. Produkce tyraminu u kmene u <i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> CCDM 824 v prostředí s 0,25 % (w/v) laktózy.....	35
Obr. 9. Produkce tyraminu u kmene u <i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> CCDM 824 v prostředí s 0,5 % (w/v) laktózy.....	36
Obr. 10. Produkce tyraminu u kmene u <i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> CCDM 824 v prostředí s 0,75 % (w/v) laktózy.....	36
Obr. 11. Produkce tyraminu u kmene u <i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> CCDM 824 v prostředí s 1 % (w/v) laktózy.....	37
Obr. 12. Produkce tyraminu u kmene u <i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> CCDM 946 v prostředí bez laktózy.....	38
Obr. 13. Produkce tyraminu u kmene u <i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> CCDM 946 v prostředí s 0,25 % (w/v) laktózy.....	38
Obr. 14. Produkce tyraminu u kmene u <i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> CCDM 946 v prostředí s 0,5 % (w/v) laktózy.....	39
Obr. 15. Produkce tyraminu u kmene u <i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> CCDM 946 v prostředí s 0,75 % (w/v) laktózy.....	39

Obr. 16. Produkce tyraminu u kmene u <i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> CCDM 946 v prostředí s 1 % (w/v) laktózy.....	40
Obr. 17. Produkce tyraminu u kmene u <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> CCDM 1004 v prostředí bez laktózy.....	41
Obr. 18. Produkce tyraminu u kmene u <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> CCDM 1004 v prostředí s 0,25 % (w/v) laktózy.....	41
Obr. 19. Produkce tyraminu u kmene u <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> CCDM 1004 v prostředí s 0,5 % (w/v) laktózy.....	42
Obr. 20. Produkce tyraminu u kmene u <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis s</i> CCDM 1004 v prostředí s 0,75 % (w/v) laktózy.....	42
Obr. 21. Produkce tyraminu u kmene u <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> CCDM 1004 v prostředí s 1 % (w/v) laktózy.....	43
Obr. 22. Grafické znázornění průběhu změn absorbance u kmene <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> CCDM 824.....	44
Obr. 23. Grafické znázornění průběhu změn absorbance u kmene <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> CCDM 1004.....	44
Obr. 24. Grafické znázornění průběhu změn pH během kultivace bakterií mléčného kvašení s přidavkem 1 % (w/v) laktózy a 2 % (w/v) NaCl.....	45

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1. Složení sodnocitrátových pufrů použitých při detekci biogenních aminů.....32

SEZNAM PŘÍLOH

PŘÍLOHA P I: Optická hustota buněk kmene *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 824.

PŘÍLOHA P II: Optická hustota buněk kmene *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 946.

PŘÍLOHA P III: Optická hustota buněk kmene *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 1004.

PŘÍLOHA P IV: Hodnoty pH kultivačního média po kultivaci sledovaných kmenů laktokoků bez přídavku NaCl a s přídavkem laktózy o jednotlivých koncentracích.

PŘÍLOHA P V: Hodnoty pH kultivačního média po kultivaci sledovaných kmenů laktokoků s přídavkem 1 % (w/v) NaCl a s přídavkem jednotlivých koncentrací laktózy.

PŘÍLOHA P VI: Hodnoty pH kultivačního média po kultivaci sledovaných kmenů laktokoků s přídavkem 2 % (w/v) NaCl a s přídavkem jednotlivých koncentrací laktózy.

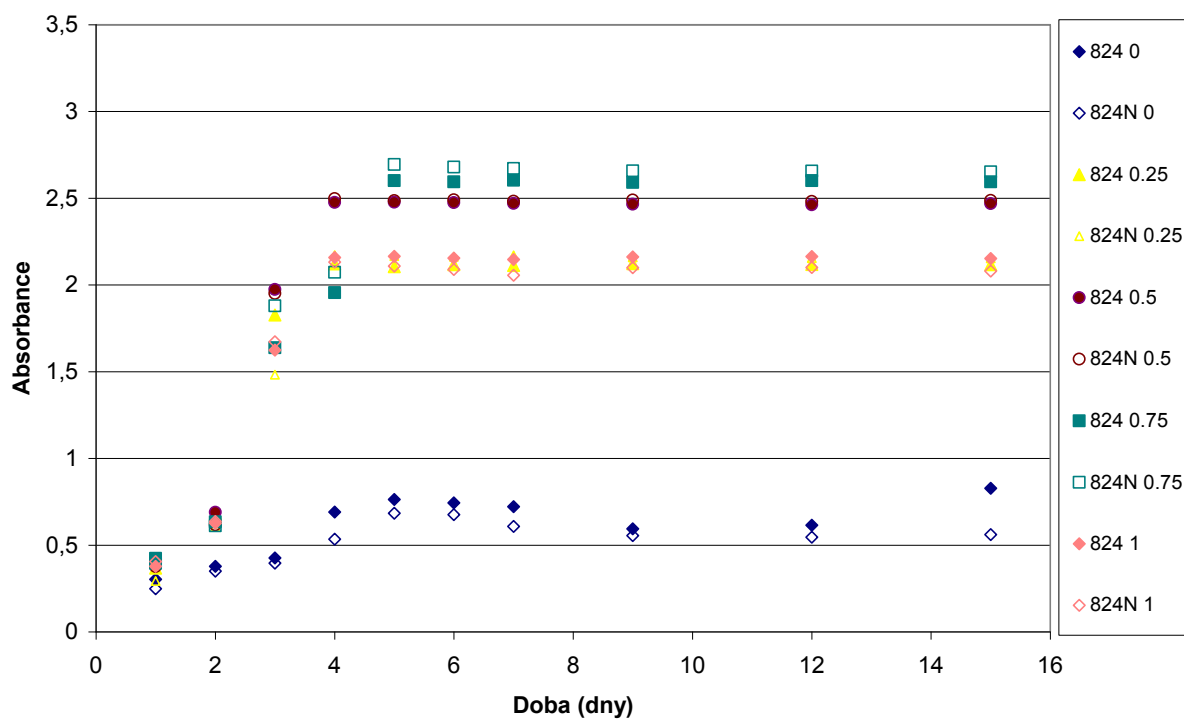
PŘÍLOHA P VII: Článek publikovaný v recenzovaném vědeckém časopise.

PŘÍLOHA P VIII: Článek publikovaný ve vědeckém časopise s impakt faktorem.

PŘÍLOHA P I:

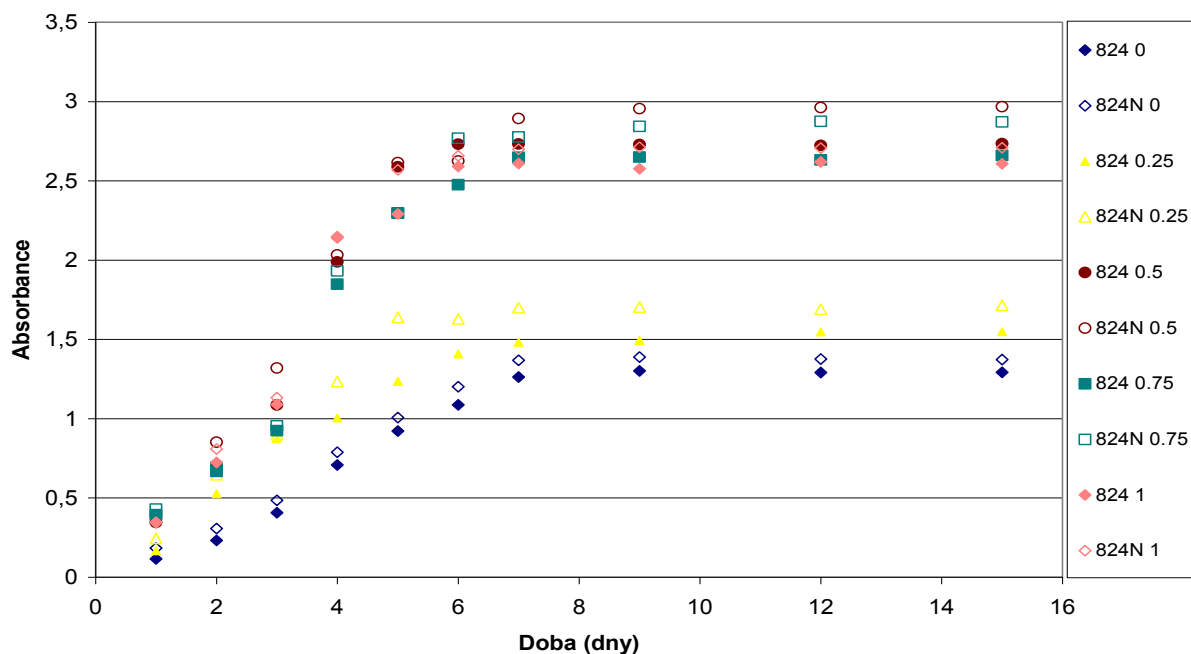
Optická hustota buněk kmene *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 824

Grafické vyhodnocení absorbance kmene *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 824, kultivováno bez přídavku NaCl, s přídavkem laktózy o jednotlivých koncentracích (0-1 % w/v). N - označuje anaerobní prostředí.

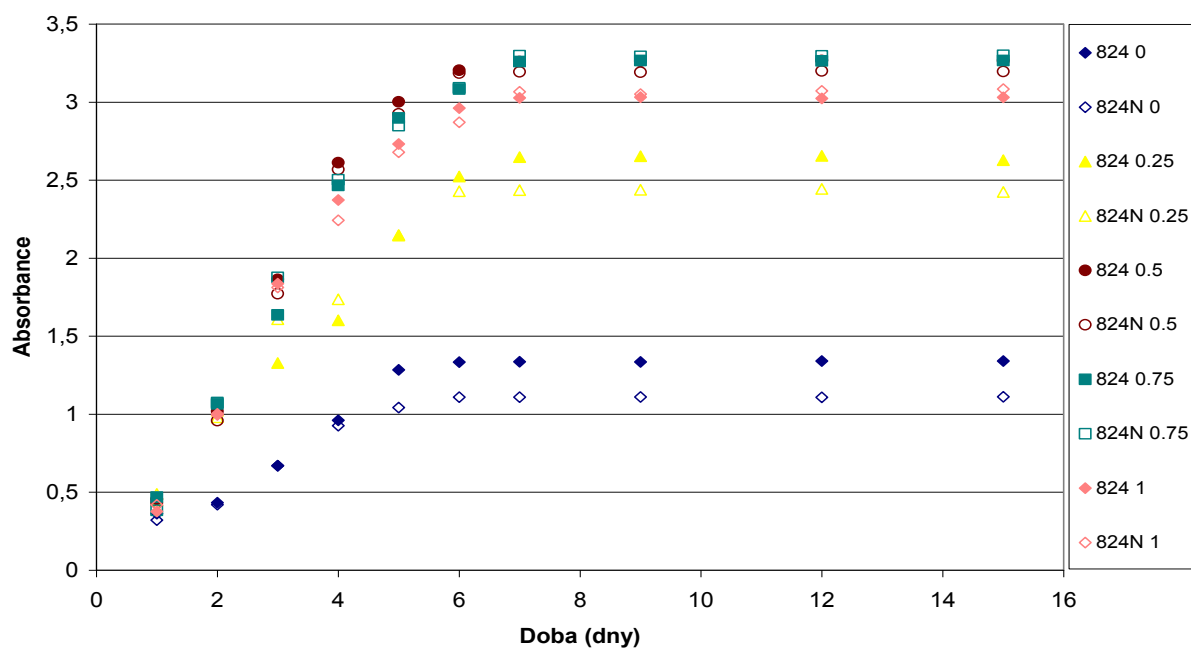


Grafické vyhodnocení absorbance kmene *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 824, kultivováno s 1 % NaCl, s přidavkem laktózy o jednotlivých koncentracích (0-1 % w/v).

N - označuje anaerobní prostředí.



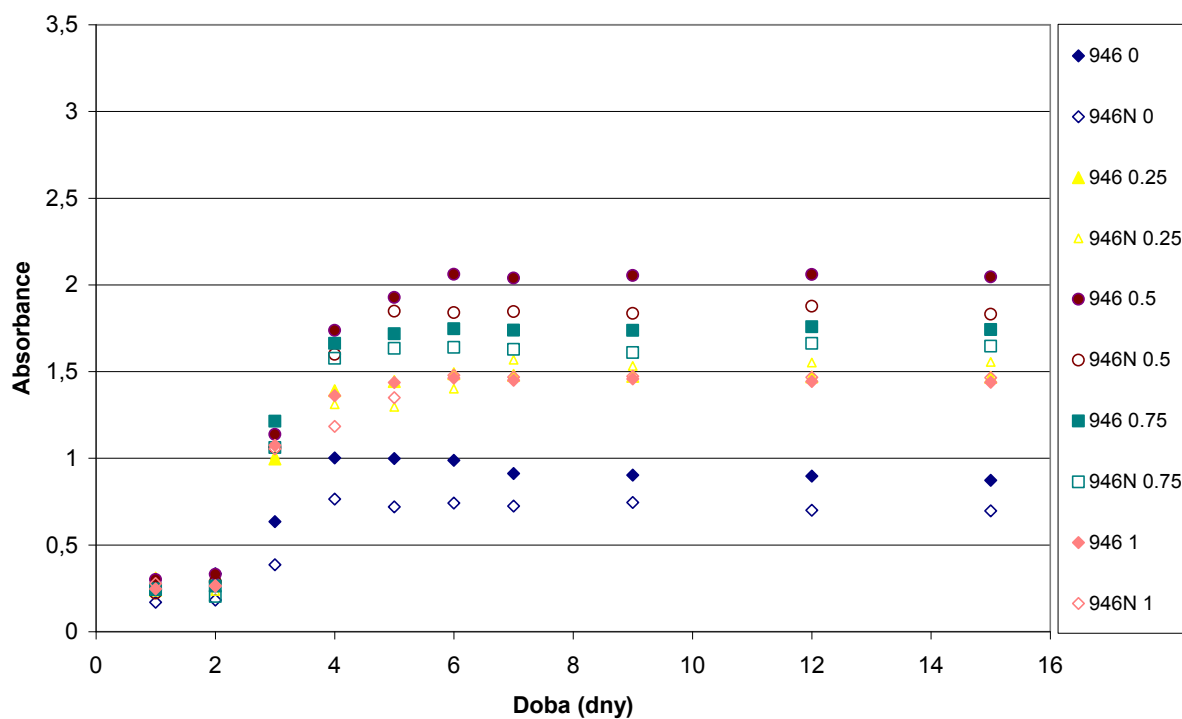
Grafické vyhodnocení absorbance kmene *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 824, kultivováno s přidavkem 2 % NaCl, s přidavkem laktózy o jednotlivých koncentracích (0-1 % w/v). N - označuje anaerobní prostředí.



PŘÍLOHA P II:

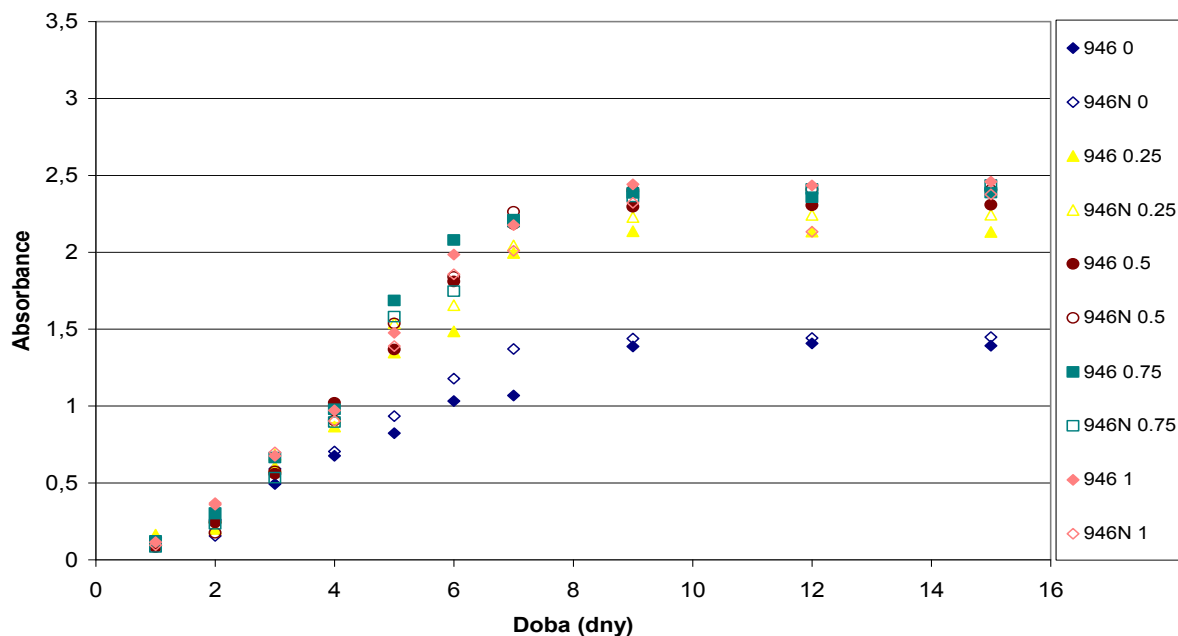
Optická hustota buněk kmene *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 946

Grafické vyhodnocení absorpance kmene *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 946, kultivováno bez přídavku NaCl, s přídavkem laktózy o jednotlivých koncentracích (0-1 % w/v). N - označuje anaerobní prostředí.

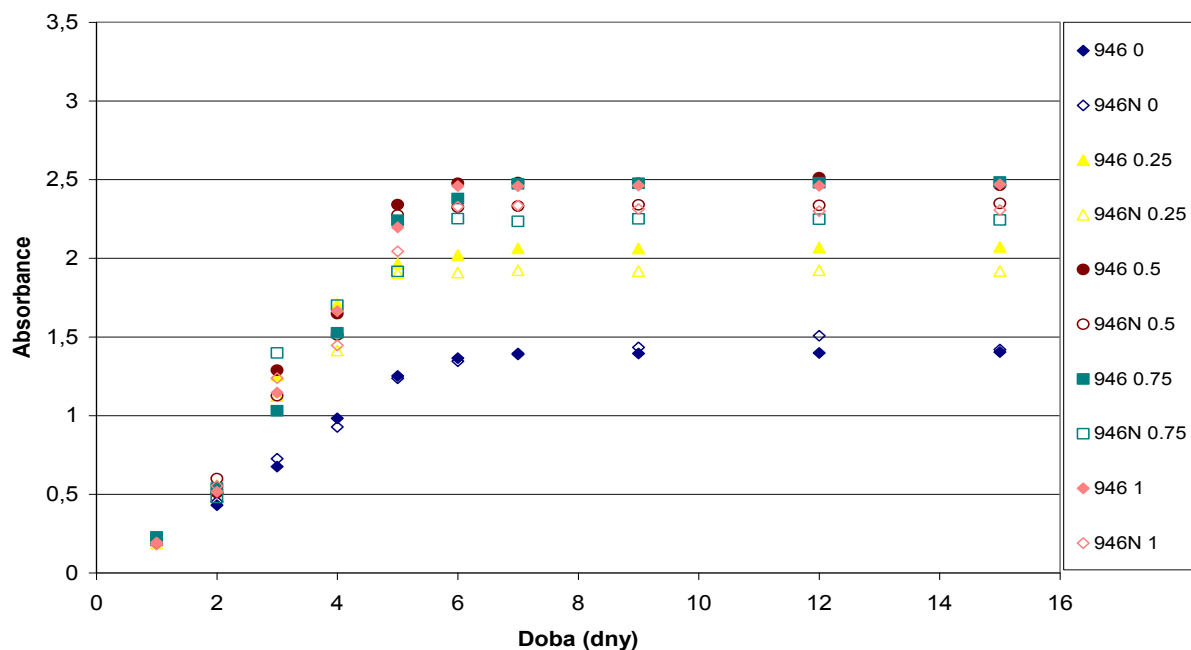


Grafické vyhodnocení absorbance kmene *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 946, kultivováno s 1 % NaCl, s přidavkem laktózy o jednotlivých koncentracích (0-1 % w/v).

N - označuje anaerobní prostředí.



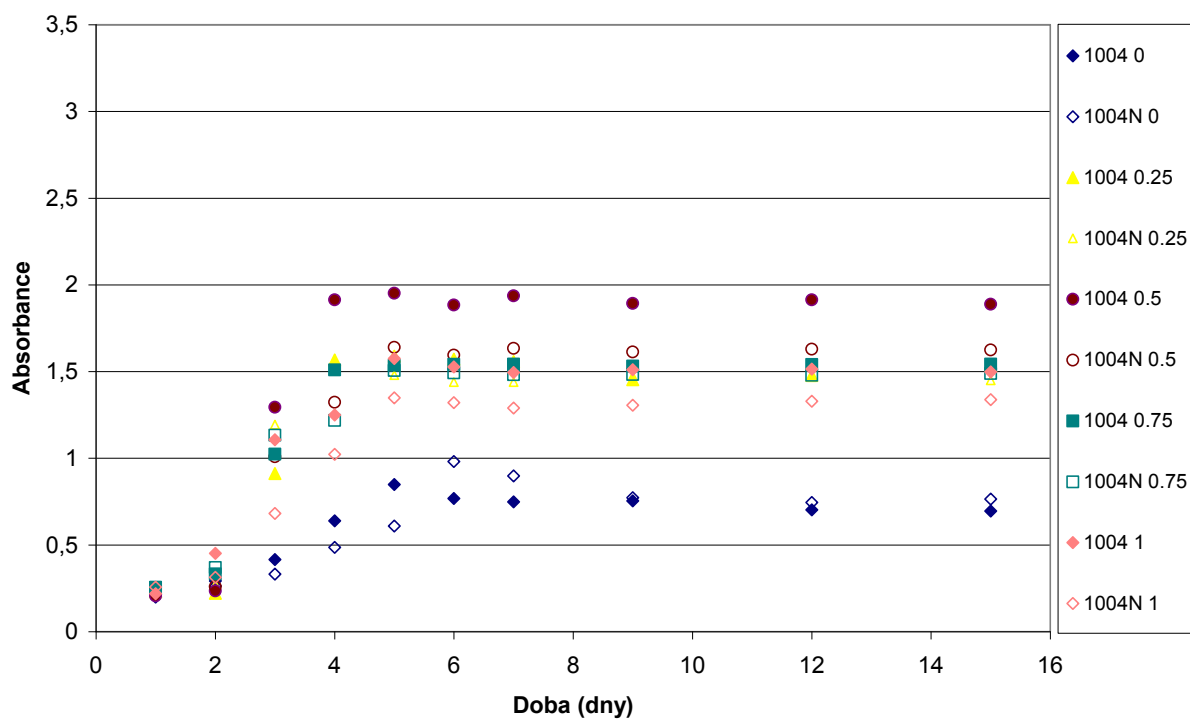
Grafické vyhodnocení absorbance kmene *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 946, kultivováno s přidavkem 2 % NaCl, s přidavkem laktózy o jednotlivých koncentracích (0-1 % w/v). N - označuje anaerobní prostředí.



PŘÍLOHA P III:

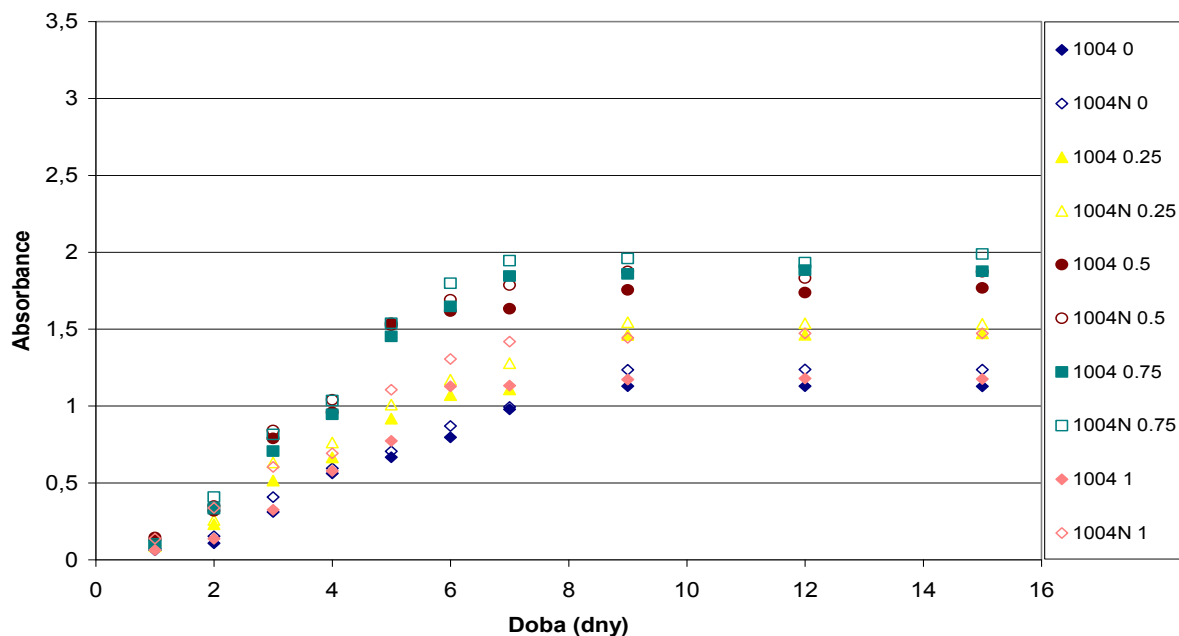
Optická hustota buněk kmene *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 1004

Grafické vyhodnocení absorbance kmene *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 1004, kultivováno bez přídavku NaCl, s přídavkem laktózy o jednotlivých koncentracích (0-1 % w/v). N - označuje anaerobní prostředí.

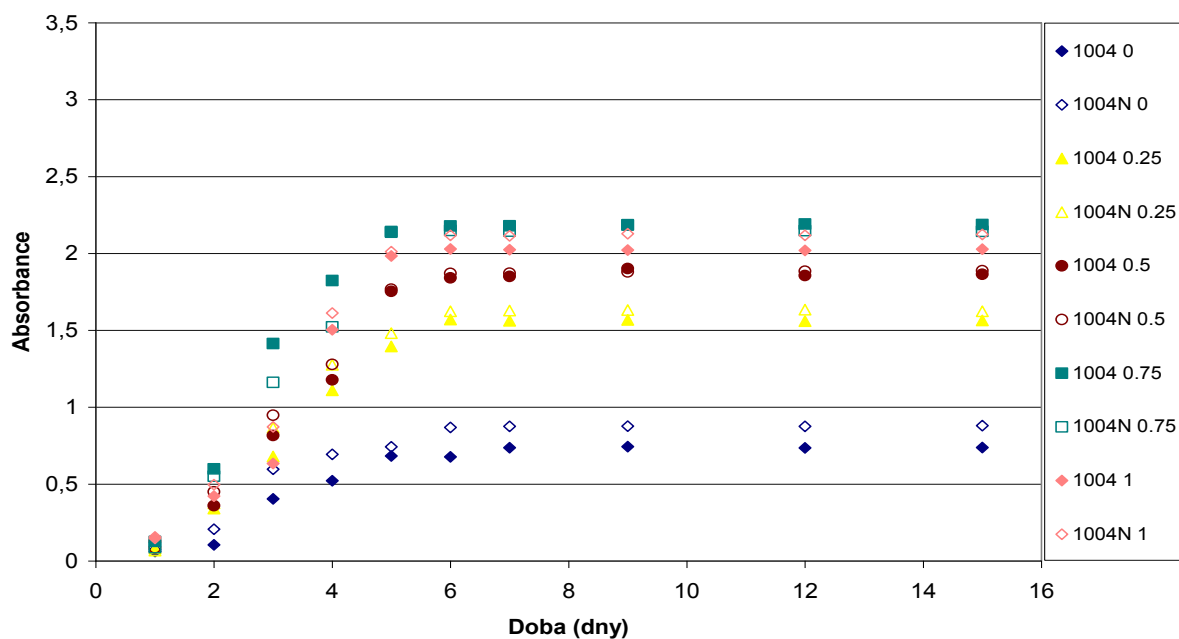


Grafické vyhodnocení absorbance kmene *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 1004, kultivováno s 1 % NaCl, s přidavkem laktózy o jednotlivých koncentracích (0-1 % w/v).

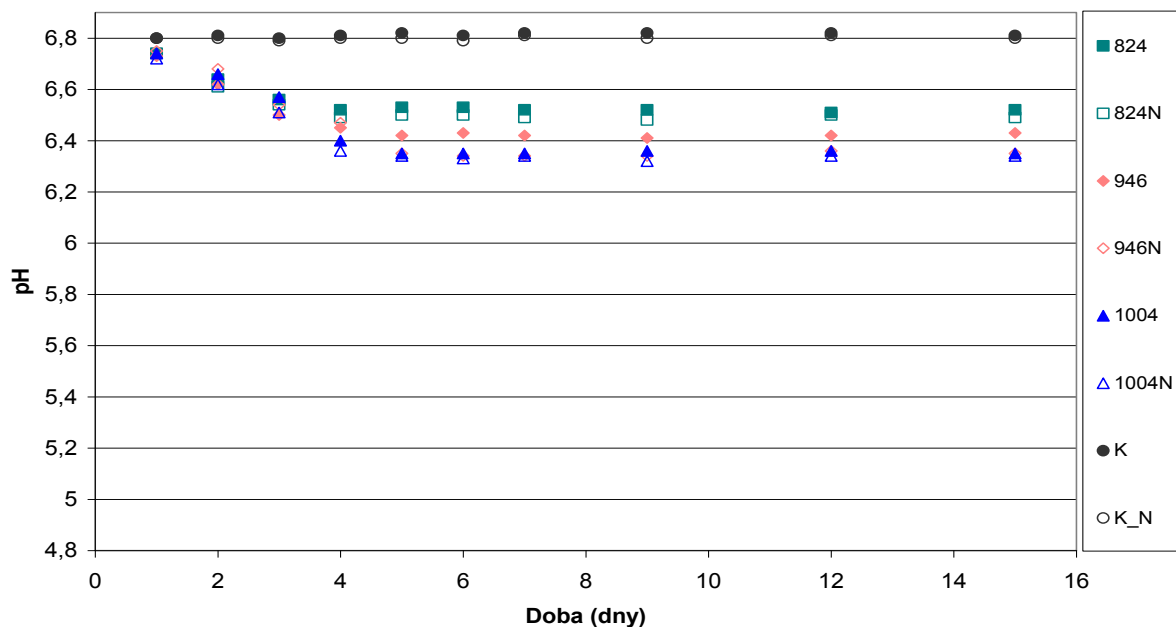
N - označuje anaerobní prostředí.



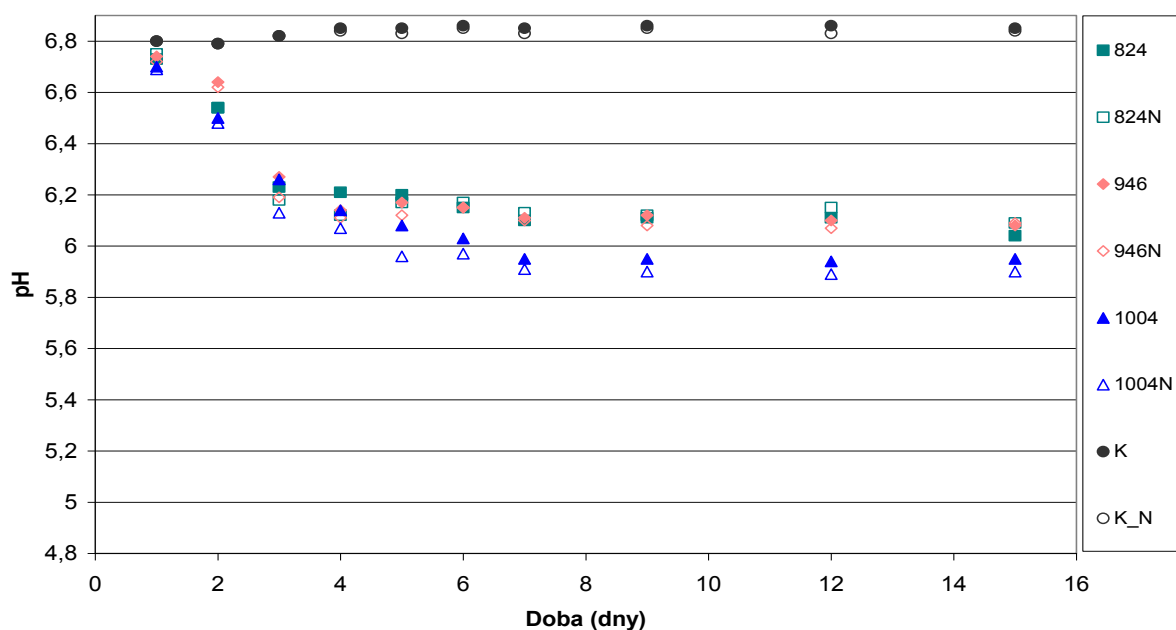
Grafické vyhodnocení absorbance kmene *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 1004, kultivováno s přidavkem 2 % NaCl, s přidavkem laktózy o jednotlivých koncentracích (0-1 % w/v). N - označuje anaerobní prostředí.



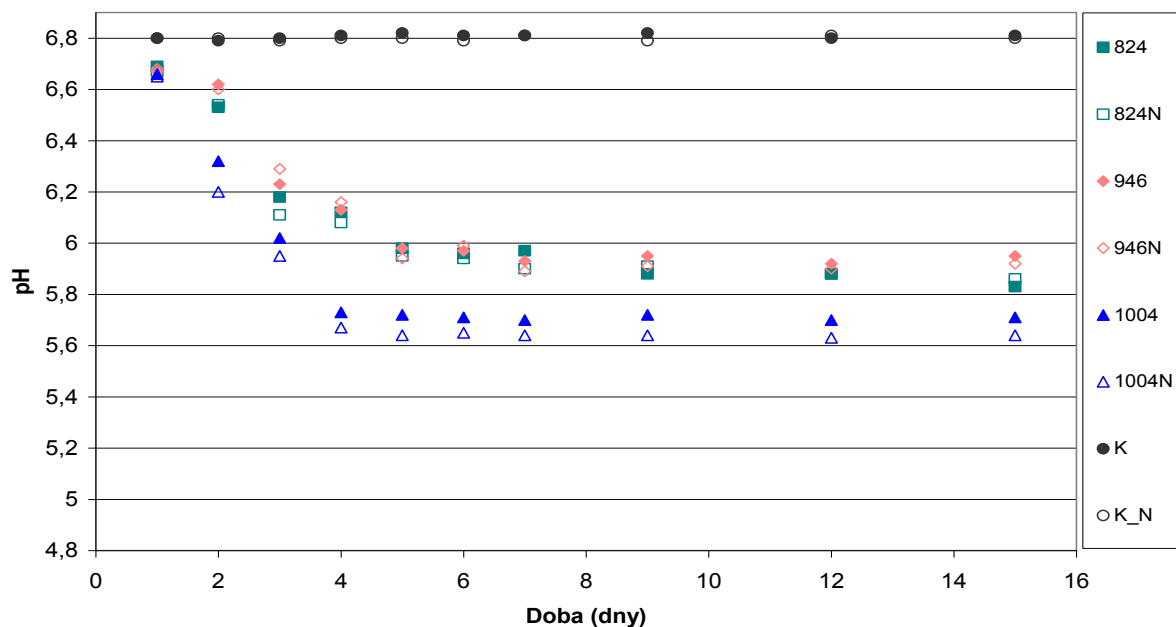
Grafické znázornění změn pH během kultivace bakterií mléčného kvašení bez přídavku NaCl s přídavkem 0,25 % (w/v) laktózy. N – anaerobní prostředí, K – kontrolní kultivační médium.



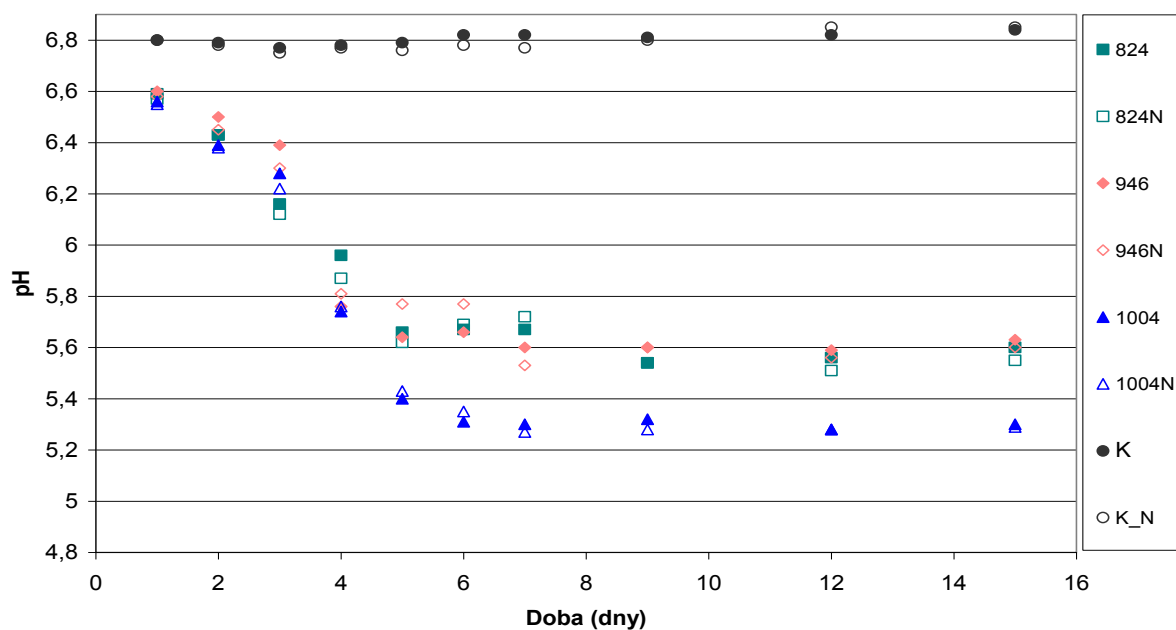
Grafické znázornění změn pH během kultivace bakterií mléčného kvašení bez přídavku NaCl s přídavkem 0,5 % (w/v) laktózy. N – anaerobní prostředí, K – kontrolní kultivační médium.



Grafické znázornění změn pH během kultivace bakterií mléčného kvašení bez přídavku NaCl s přídavkem 0,75 % (w/v) laktózy. N – anaerobní prostředí, K – kontrolní kultivační médium.



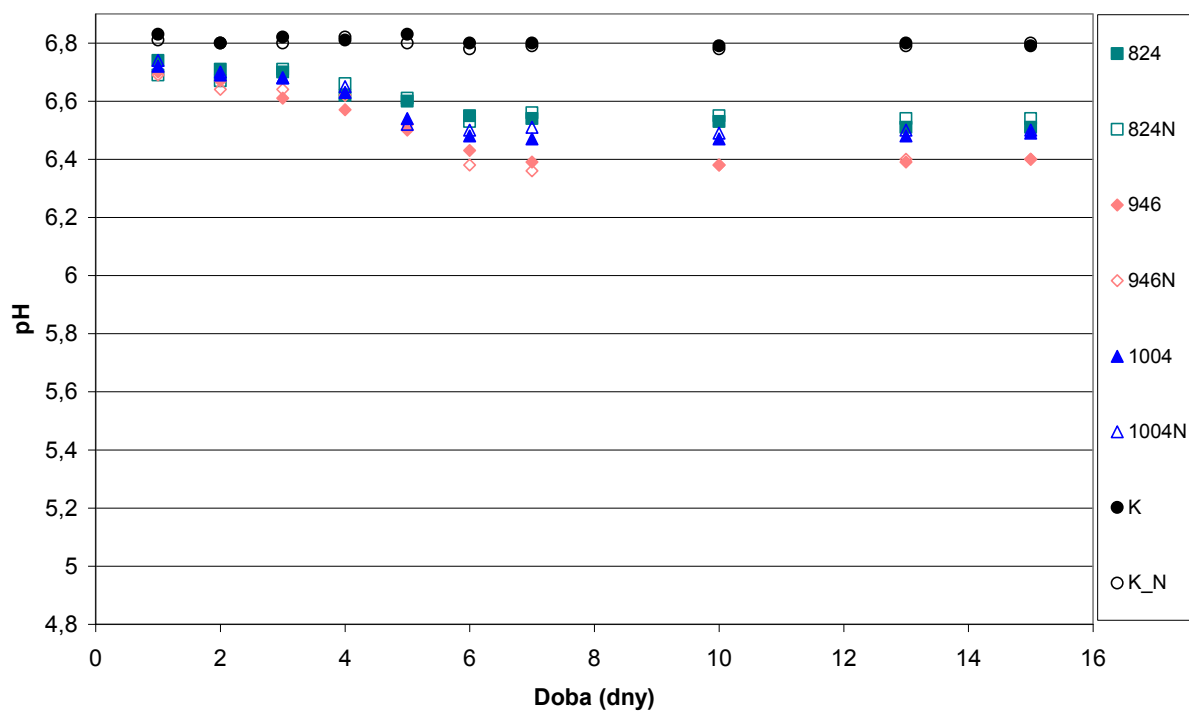
Grafické znázornění změn pH během kultivace bakterií mléčného kvašení bez přídavku NaCl s přídavkem 1 % (w/v) laktózy. N – anaerobní prostředí, K – kontrolní kultivační médium.



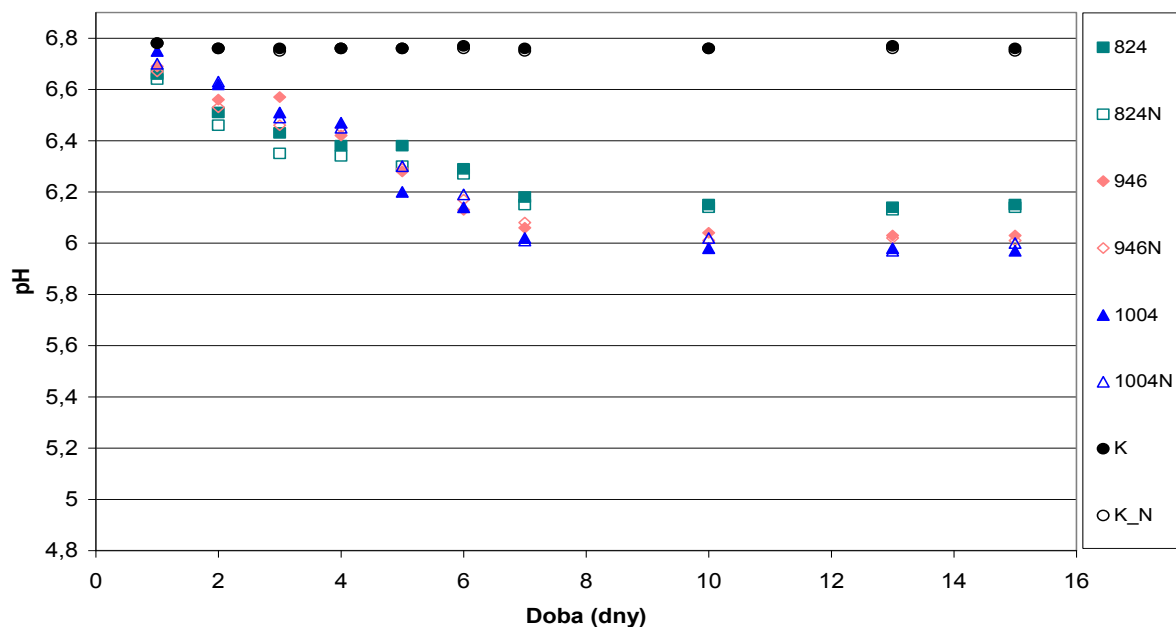
PŘÍLOHA P V:

Hodnoty pH kultivačního média po kultivaci sledovaných kmenů laktokoků v přítomnosti 1% (w/v) NaCl a s přidavkem laktózy o jednotlivých koncentracích.

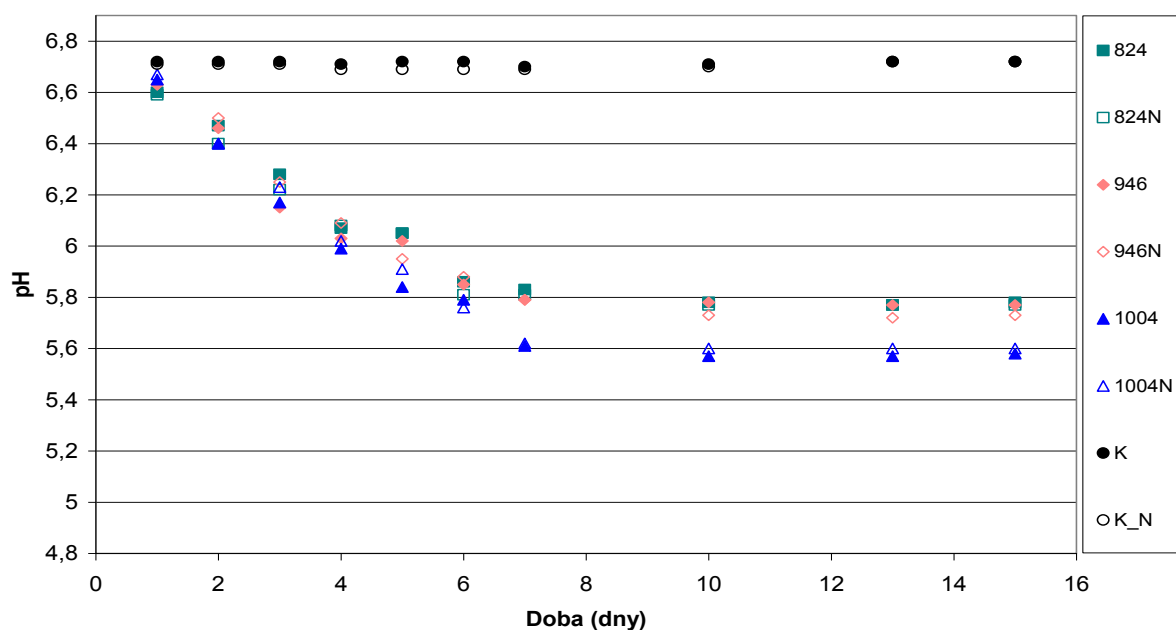
Grafické znázornění změn pH během kultivace bakterií mléčného kvašení s přidavkem 1 % NaCl a bez přidavku laktózy. N – anaerobní prostředí, K – kontrolní kultivační médium.



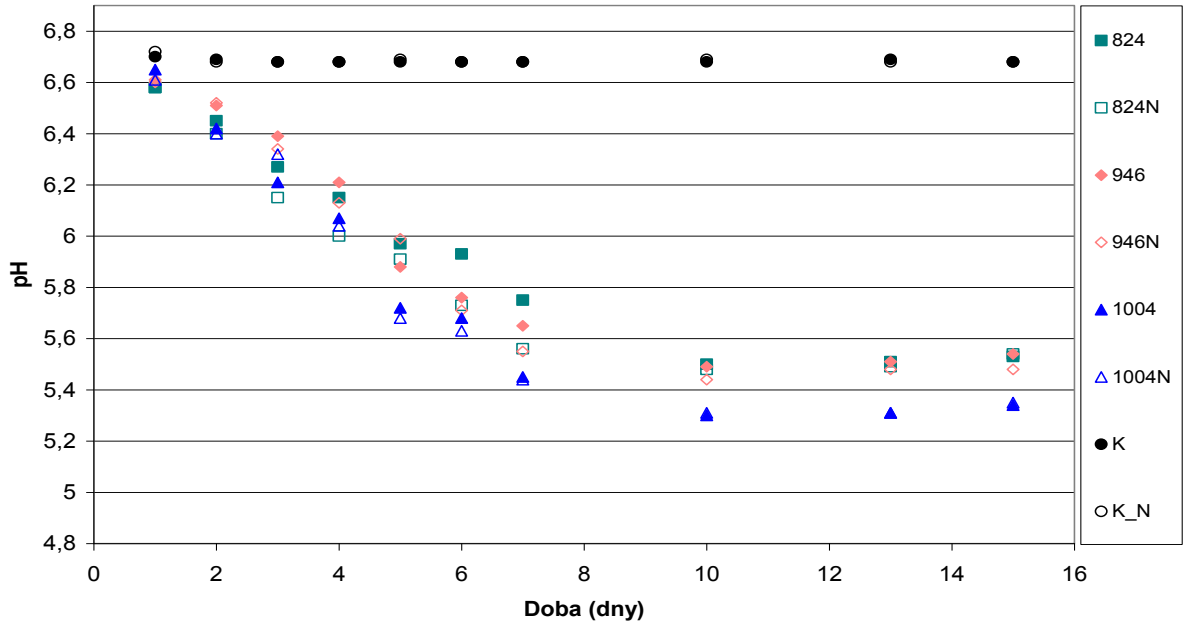
Grafické znázornění změn pH během kultivace bakterií mléčného kvašení s přidavkem 1 % NaCl a s přidavkem laktózy 0,25 % (w/v). N – anaerobní prostředí, K – kontrolní kultivační médium.



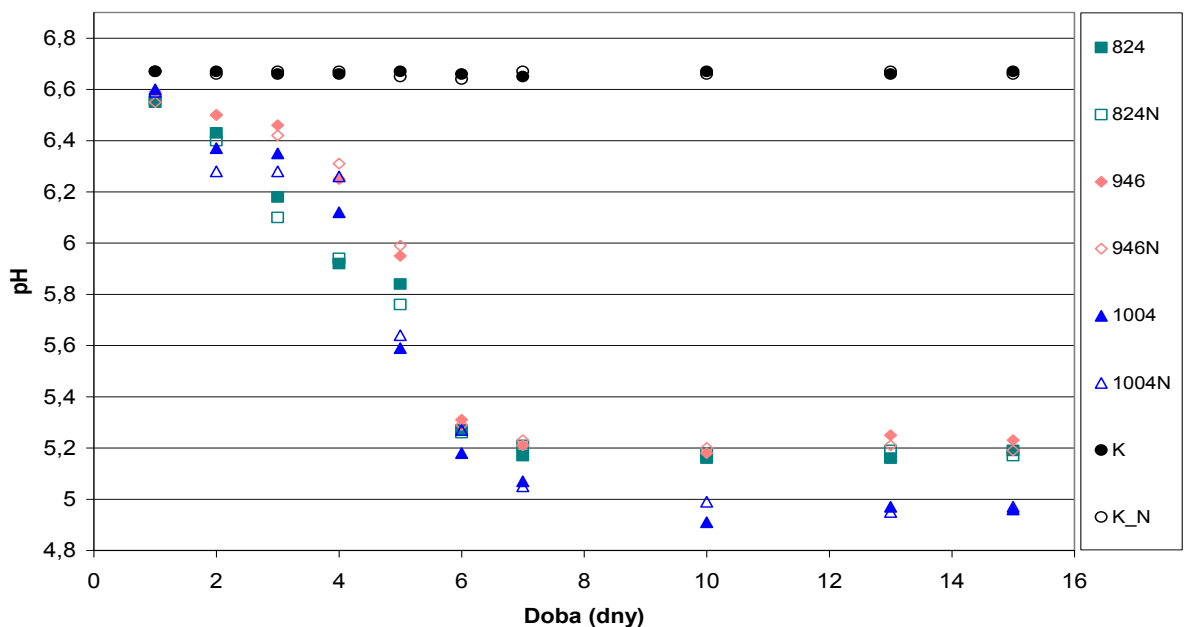
Grafické znázornění změn pH během kultivace bakterií mléčného kvašení s přidavkem 1 % NaCl a s přidavkem laktózy 0,5 % (w/v). N – anaerobní prostředí, K – kontrolní kultivační médium.



Grafické znázornění změn pH během kultivace bakterií mléčného kvašení s přidavkem 1 % NaCl a s přidavkem laktózy 0,75 % (w/v). N – anaerobní prostředí, K – kontrolní kultivační médium.



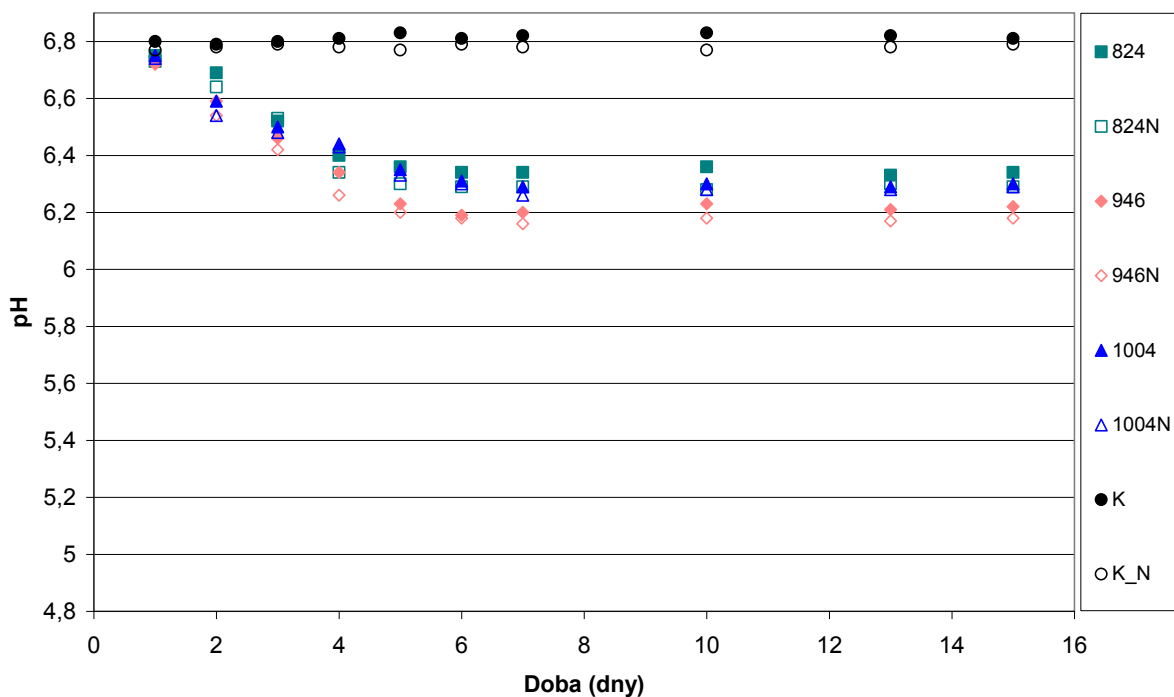
Grafické znázornění změn pH během kultivace bakterií mléčného kvašení s přidavkem 1 % NaCl a s přidavkem laktózy 1 % (w/v). N – anaerobní prostředí, K – kontrolní kultivační médium.



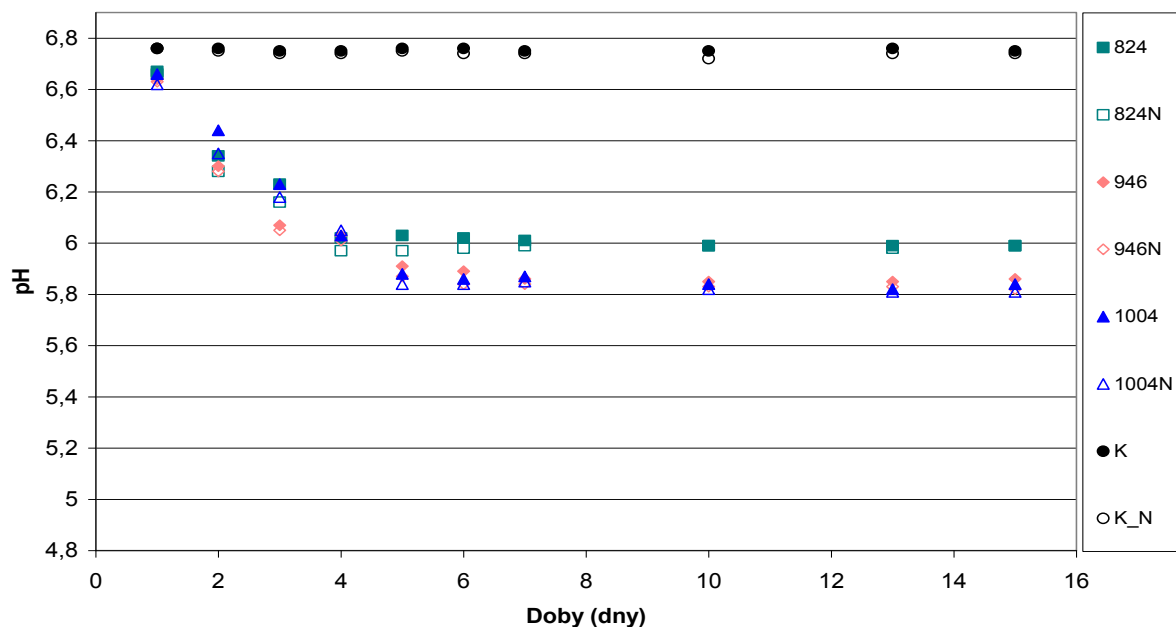
PŘÍLOHA P VI:

Hodnoty pH kultivačního média po kultivaci sledovaných kmenů laktokoků v přítomnosti 2% (w/v) NaCl a s přidavkem laktózy o jednotlivých koncentracích.

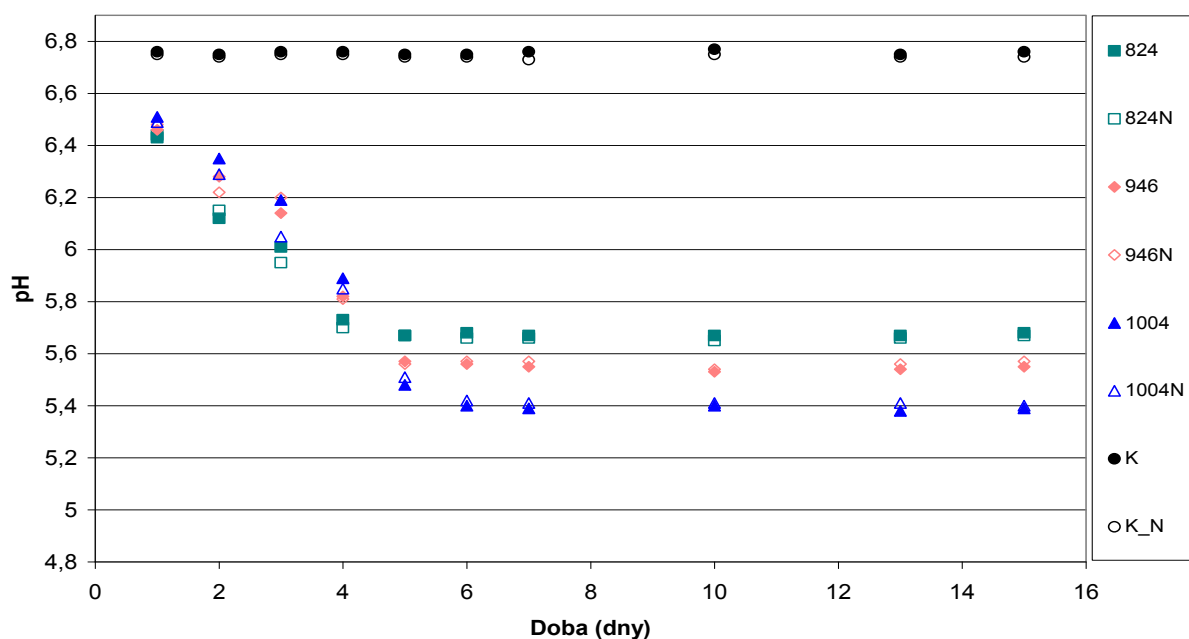
Grafické znázornění změn pH během kultivace bakterií mléčného kvašení s přidavkem 2 % NaCl a bez přidavku laktózy. N – anaerobní prostředí, K – kontrolní kultivační médium.



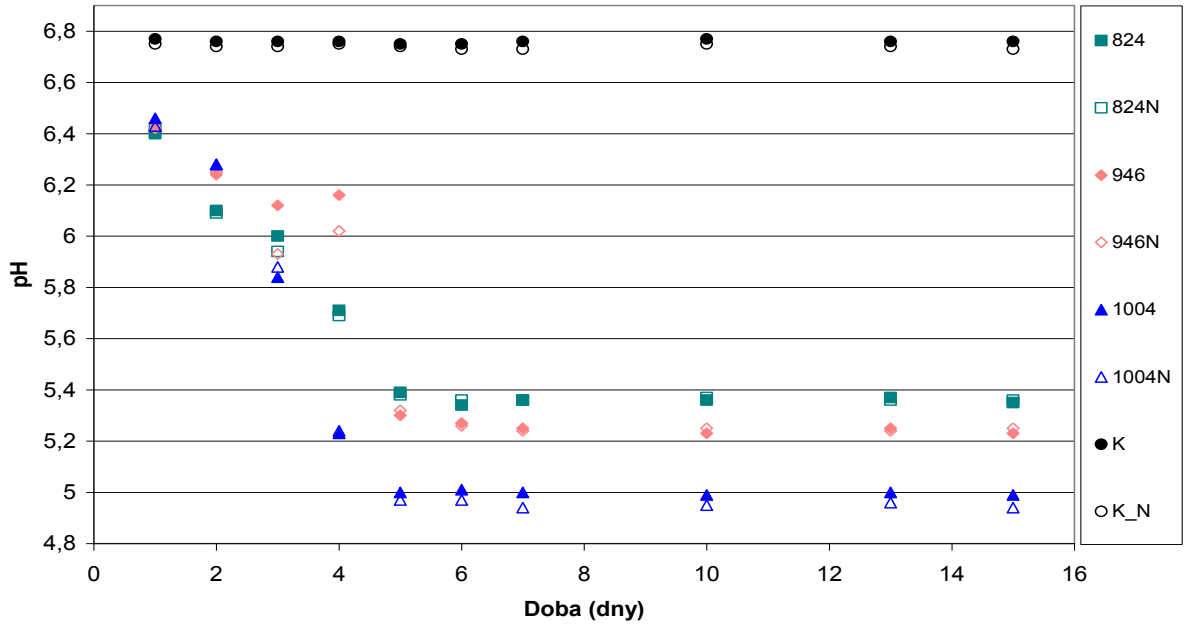
Grafické znázornění změn pH během kultivace bakterií mléčného kvašení s přidavkem 2 % NaCl a s přidavkem laktózy 0,25 % (w/v). N – anaerobní prostředí, K – kontrolní kultivační médium.



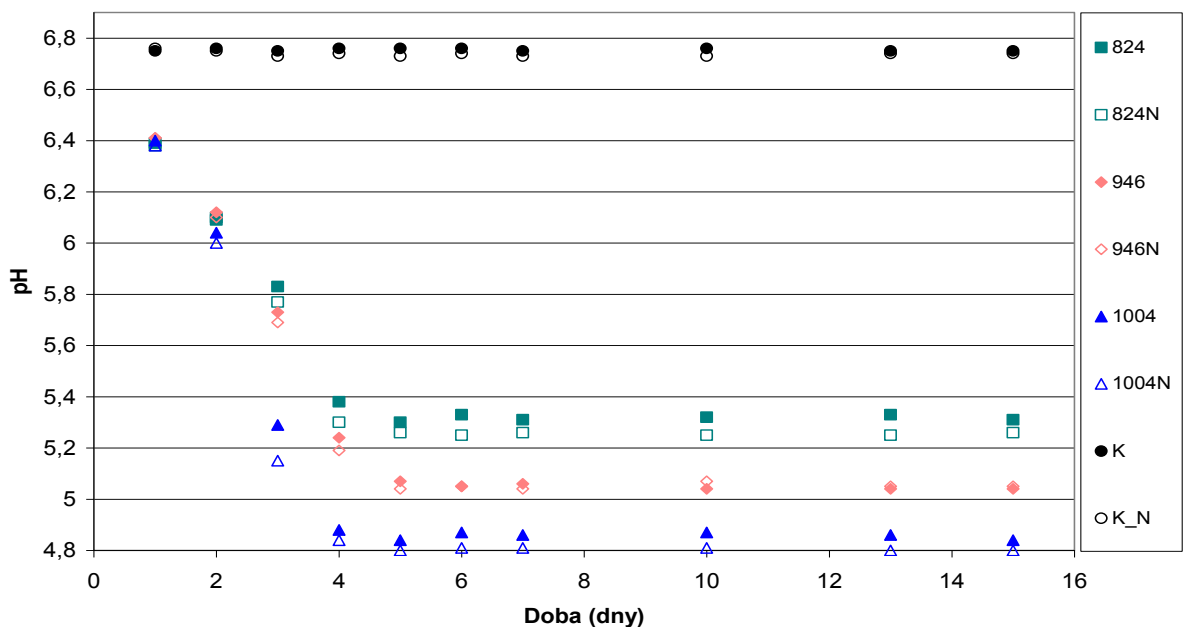
Grafické znázornění změn pH během kultivace bakterií mléčného kvašení s přidavkem 2 % NaCl a s přidavkem laktózy 0,5 % (w/v). N – anaerobní prostředí, K – kontrolní kultivační médium.



Grafické znázornění změn pH během kultivace bakterií mléčného kvašení s přidavkem 2 % NaCl a s přidavkem laktózy 0,75 % (w/v). N – anaerobní prostředí, K – kontrolní kultivační médium.



Grafické znázornění změn pH během kultivace bakterií mléčného kvašení s přidavkem 2 % NaCl a s přidavkem laktózy 1 % (w/v). N – anaerobní prostředí, K – kontrolní kultivační médium.



potravinářstvo

**VLIV AEROBNÍHO/ANAEROBNÍHO PROSTŘEDÍ NA DEKARBOXYLÁZOVOU
AKTIVITU VYBRANÝCH BAKTERIÍ MLÉČNÉHO KVAŠENÍ**
**EFFECT OF AERO-/ANAEROBIOSIS ON DEKARBOXYLASE ACTIVITY OF
SELECTED LACTIC ACID BACTERIA**

Leona Buňková, František Buňka, Eva Pollaková, Tereza Podešvová, Vladimír Dráb, Stanislav Kráčmar

ABSTRACT

Biogenic amines are undesirable compounds produced in foods mainly through bacterial decarboxylase activity. The aim of this study was to investigate some environmental conditions (particularly aero/anaerobiosis, sodium chloride concentration (0–2% w/w), and amount of lactose (0–1% w/w)) on the activity of tyrosine decarboxylase enzymes of selected six technological important *Lactococcus lactis* strains. The levels of parameters tested were chosen according to real situation in fermented dairy products technology (especially cheese-making). Tyramine was determined by the ion-exchange chromatography with post-column ninhydrine derivatization and spectrophotometric detection. Tyrosine decarboxylation occurred during the active growth phase. Under the model conditions used, oxygen availability had influence on tyramine production, anaerobiosis seemed to favour the enzyme activity because all *L. lactis* strains produced higher tyramine amount.

Keywords: *Lactococcus*, tyramine, ion-exchange chromatography, aero/anaerobiosis.

ÚVOD

Biogenní aminy jsou nízkomolekulární alifatické, aromatické nebo heterocyklické bazické sloučeniny odvozené od aminokyselin. Jsou významnými sloučeninami, které se vyskytují v živých organismech jako metabolické meziprodukty a produkty, které vykazují biologickou aktivitu. Základní podmínkou vzniku biogenních aminů je přítomnost aminokyselin v daném substrátu, přítomnost mikroorganismů s dekarboxylázovou aktivitou a vhodné podmínky pro růst a množení mikroorganismů. (Fernández et al., 2007; Landete et al., 2007; Bover-Cid et al., 2008).

Tvorba biogenních aminů bakteriemi může být ovlivněna mnohými vnějšími faktory, které mohou ovlivňovat zejména kinetiku dekarboxylázových reakcí. Mezi vnější faktory, které ovlivňují tvorbu biogenních aminů u bakterií, patří teplota a pH prostředí, aero-/anaerobióza, dostupnost zdrojů uhlíku (např. glukózy), přítomnost růstových faktorů, růstová fáze buněk, koncentrace NaCl (vodní aktivita) aj. (Greif et al., 1997, 1998, 2006; Gardini et al., 2001, 2005; Santos et al., 2003; Fernández et al., 2007; Bover-Cid et al., 2008; Emborg and Dalgaard, 2008a, b). Kromě výše zmíněných faktorů mohou produkci biogenních aminů ovlivňovat další chemické látky, např. etanol, některé sacharidy, fenolické sloučeniny nebo oxid siřičitý (Gardini et al., 2005; Alberto et al., 2007; Mazzoli et al., 2009).

Biogenní aminy mohou být produkovány i kmeny BMK, které se běžně využívají pro technologické účely jako starterové kultury (Buňková et al., 2009), a proto je vhodné tyto kmeny před použitím v mlékárenství otestovat na dekarboxylázovou aktivitu. Stejně tak by pro technologické účely bylo vhodné znát kinetiku tvorby biogenních aminů za podobných podmínek prostředí, které mohou nastat během technologického procesu výroby fermentovaných mléčných výrobků. Tyto informace se však v soudobé odborné literatuře vyskytují jen zřídka.

Cílem této studie tedy bylo sledovat vliv aerobního a anaerobního prostředí na produkci tyraminu u 6 kmenů bakterií rodu *Lactococcus* (Buňková et al., 2009). Tyto bakterie se v průběhu biotechnologického procesu výroby mléčných výrobků využívají jako starterové kultury.

MATERIÁL A METODIKA

Vliv aerobního a anaerobního prostředí na produkci tyraminu byl testován u 3 kmenů *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (CCDM 48, CCDM 53 a CCDM 141) a 3 kmenů *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* (CCDM 824, CCDM 946 a CCDM 1004). Všechny kmeny byly získány ze Sbírký kultur mlékařských mikroorganismů Laktoflora® (CCDM).

Kultivace výše zmíněných kmenů, pozitivních na produkci tyraminu, probíhala v bujónu M17 s přidávkou 0,2 % (w/v) tyrozinu při 10 ± 1 °C v rozmezí 1 až 15 dnů. Příslušné kultivační médium o objemu 5 ml bylo zaočkováno vždy 25 µl suspenze bakterií narostených přes noc v M17 bujónu s přidávkou 0,2 % tyrozinu. Kultivační médium bylo obohaceno o laktózu v koncentraci 0,5 % (w/v) a NaCl (0; 1 a 2 % w/v).

Vliv aerobního/anaerobního prostředí na produkci biogenních aminů byl sledován tak, že polovina zkumavek byla kultivována aerobně a druhá anaerobně. Anaerobního prostředí bylo dosaženo zakápnutím kultivačního média sterilním parafinovým olejem (1 ml). Odběr vzorků pro analýzy probíhal 0., 1., 5., 10. a 15. den kultivace a to tak, že vždy byly náhodně odebrány od každého kmene a každé úrovně faktoru 2 zkumavky. Celý experiment byl opakován třikrát.

Po inkubaci bakterií byly buňky odstraněny centrifugací (10000 × g, 5 min) a supernatant byl filtrován přes 0,45 µm filtr. Produkce tyraminu byla zjišťována pomocí iontově-výměnné chromatografie (IEC; Automatický analyzátor aminokyselin AAA400, Ingos Praha, ČR) v médiu po odstranění buněk a po filtraci podle Buňková et al. (2009). Každý izolát byl analyzován alespoň třikrát. Standard tyraminu byl získán ze Sigma-Aldrich. Výsledky IEC byly statisticky vyhodnoceny pomocí Kruskal-Wallisova testu a Wilcoxonova testu.

VÝSLEDKY A DISKUZE

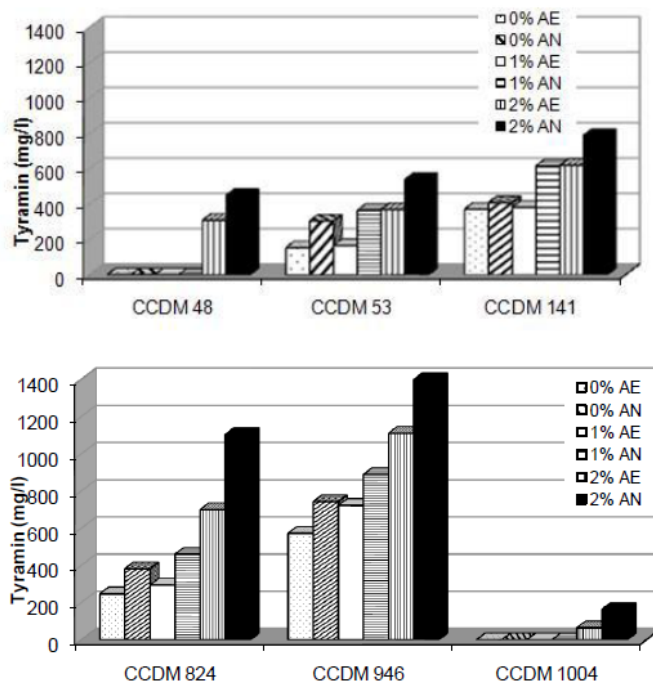
V předcházející studii (Buňková et al., 2009) byla u 6 kmenů *L. lactis* zjištěna produkce biogenního aminu tyraminu. Tyto kmeny byly nyní využity pro testování vlivu aerobního a anaerobního prostředí na produkci

potravinářstvo

tyraminu. Teplota kultivace byla volena tak, aby se přiblížila podmínkám technologického procesu výroby přírodních sýrů a aby tato studie napomohla předvídat průběh tvorby biogenních aminů ve fermentovaných mléčných výrobcích (zejména přírodních sýrech), které prochází zracím procesem. Testované kmeny laktokoků byly proto kultivovány při teplotě 10 ± 1 °C, která se využívá během technologického procesu zrání přírodních sýrů. U všech testovaných kmenů se maximální produkce tyraminu po 10. dnu kultivace již neměnila.

Z testovaných kmenů *L. lactis* subsp. *lactis* (CCDM 48, CCDM 53 a CCDM 141) byl jako nejproduktivnější označen kmen *L. lactis* subsp. *lactis* CCDM 141, u něhož byla zjištěna maximální produkce tyraminu až 790 mg/l kultivačního média. U testovaných kmenů *L. lactis* subsp. *lactis* byla pozorována nejvyšší produkce tyraminu v médiu obohaceném o 2 % NaCl po kultivaci v anaerobním prostředí (Obrázek 1A). K nejvyšší produkci tyraminu došlo při kultivaci bez přítomnosti kyslíku. K produkci tyraminu u kmene *L. lactis* subsp. *lactis* CCDM 48 došlo pouze tehdy, pokud byly tyto bakterie kultivovány v přítomnosti nejvyšší aplikované koncentrace soli (2 % NaCl). V ostatních případech (bez NaCl a 1 % NaCl)

tyraminu byla pozorována při kultivaci v prostředí se 2 % NaCl bez přístupu kyslíku. Tato zjištěná produkce tyraminu se statisticky významně odlišovala ($P < 0,05$) od produkce zjištěné při kultivaci za ostatních testovaných podmínek (Obrázek 1B). Testovaný kmen *L. lactis* subsp. *cremoris* CCDM 1004 se do jisté míry choval podobně jako kmen *L. lactis* CCDM 48. Dekarboxylázová aktivita byla u kmene CCDM 1004 poměrně slabá a tyramin byl detekován pouze během kultivace v prostředí se 2 % NaCl. Mnoho studií se věnuje vlivu nejrůznějších faktorů vnějšího prostředí (např. teploty, pH, přítomnosti sacharidů, NaCl a jiných chemických látek) na produkci biogenních aminů u bakterií čeledi *Enterobacteriaceae* (Greif et al., 1997, 1998, 2006; Emborg and Dalgaard, 2008a, b) nebo u mléčných bakterií rodu *Lactobacillus* (Alberto et al., 2007; Arena et al., 2008; Bover-Cid et al., 2008; Mazzoli et al., 2009), *Enterococcus* (Gardini et al., 2001; Fernández et al., 2007) a *Oenococcus* (Gardini et al., 2005). Avšak studií, věnujících se faktorům, které ovlivňují produkci biogenních aminů u bakterií rodu *Lactococcus*, není příliš mnoho. Z důvodu absence studií vlivu podmínek prostředí na produkci biogenních aminů u laktokoků a také proto, že se jedná o technologicky



Obrázek 1: Produkce tyraminu po 15 dnech kultivace při 10 ± 1 °C u testovaných kmenů *L. lactis* subsp. *lactis* (A) a *L. lactis* subsp. *cremoris* (B) v M17 bujónu s 0,5 % laktózy a 0, 1 nebo 2 % NaCl v aerobním (AE) a anaerobním (AN) prostředí.

nebyla u tohoto kmene přítomnost tyraminu detekována. U testovaných bakterií *L. lactis* subsp. *cremoris* byla zaznamenána největší produkce tyraminu u kmene CCDM 946 (až $1\,400\text{ mg.l}^{-1}$ kultivačního média), nejnižší pak u CCDM 1004. U všech testovaných kmenů *L. lactis* subsp. *cremoris* lze pozorovat trend, že maximální produkce

významné bakterie hojně využívané v mlékárenství, jsme sledovali vliv aerobního a anaerobního prostředí na dekarboxylázovou aktivitu tyramin pozitivních bakterií rodu *Lactococcus*.

Výsledky naší studie ukazují, že 4 z 6 testovaných kmenů laktokoků (*L. lactis* subsp. *lactis* CCDM 53, CCDM 141 a

L. lactis subsp. *cremoris* CCDM 824 a CCDM 946) produkovaly tyramin za každých podmínek, které byly testovány. Zbývající 2 kmeny (*L. lactis* subsp. *lactis* CCDM 48 a *L. lactis* subsp. *cremoris* CCDM 1004) vykazovaly produkci tyraminu pouze za určitých podmínek (kultivace v prostředí se 2 % NaCl). Tyto výsledky prokazují, že schopnost produkce biogenních aminů bakteriemi závisí na kultivačních podmínkách a zároveň, že tato vlastnost je charakteristikou daného kmene (Arena and Manca de Nadra, 2001; Bover-Cid et al., 2001) Jestliže srovnáme růst testovaných laktokoků a křivku produkce biogenních aminů, zjistíme, že produkce biogenních aminů započala během logaritmické fáze jejich růstu. Podobný trend zaznamenali u *Lb. curvatus* také Bover-Cid et al. (2008).

U všech testovaných technologicky významných kmenů *L. lactis* byla za daných podmínek zjištěna vyšší produkce tyraminu za anaerobních podmínek. Bover-Cid et al. (2008) nezjistili výraznější vliv v dostupnosti kyslíku na produkci biogenních aminů u *Lactobacillus curvatus*, a zároveň však poukazují na to, že anaerobní prostředí pravděpodobně napomáhá dekarboxylázové aktivitě enzymů.

ZÁVĚR

U všech testovaných kmenů *L. lactis*, pozitivních na produkci tyraminu, byla zjištěna vyšší produkce tohoto biogenního aminu po kultivaci bez přístupu kyslíku. Zároveň bylo detekováno nejvyšší množství tyraminu v kultivačním médiu s přidavkem 2 % NaCl.

LITERATURA

ALBERTO, M. R., ARENA, M. E., MANCA DE NADRA, M. C., 2007. Putrescine production from agmatine by *Lactobacillus hilgardii*: Effect of phenolic compounds. In *Food Control*, roč. 18, 2007, s. 898-903.

ARENA, M. E., LANDETE, J. M., MANCA DE NADRA, M. C., PARDO, I., FERRER, S., 2008. Factors affecting the production of putrescine from agmatine by *Lactobacillus hilgardii* X₁B isolated from wine. In *Journal of Applied Microbiology*, roč. 105, 2008, s. 158-165.

ARENA, M. E., MANCA DE NADRA, M. C., 2001. Biogenic amine production by *Lactobacillus*. In *Journal of Applied Microbiology*, roč. 90, 2001, s. 158-162.

BOVER-CID, S., HUGAS, M., IZQUIERDO-PULIDO, M., VIDAL-CAROU, M. C., 2001. Amino acid-decarboxylase activity of bacteria isolated from fermented pork sausages. In *International Journal of Food Microbiology*, roč. 66, 2001, s. 185-189.

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. In *Food Microbiology*, roč. 25, 2008, s. 269-277.

BUNĀKOVÁ, L., BUNĀKA, F., HLOBILOVÁ, M., VANÁTKOVÁ, Z., NOVÁKOVÁ, D., DRÁB, V., 2009. Tyramine production of technological important strains of *Lactobacillus*, *Lactococcus* and *Streptococcus*. In *European Food Research and Technology*, roč. 229, 2009, s. 533-538.

EMBORG, J., DALGAARD, P., 2008a. Modelling the effect of temperature, carbon dioxide, water activity and pH on growth and histamine formation on *Morganella psychrotolerans*. In *International Journal of Food Microbiology*, roč. 128, 2008, s. 226-233.

EMBORG, J., DALGAARD, P., 2008b. Growth, inactivation and histamine formation of *Morganella*

psychrotolerans and *Morganella morganii* – development and evaluation of predictive models. In *International Journal of Food Microbiology*, roč. 128, 2008, s. 234-243.

FERNÁNDEZ, M., LINARES, D. M., RODRÍGUEZ, A., ALVAREZ, M. A., 2007. Factors affecting tyramine production in *Enterococcus durans* IPLA 655. In *Applied Microbiology and Biotechnology*, roč. 73, 2007, s. 1400-1406.

GARDINI, F., MARTUSCELLI, M., CARUSO, M. C., GALGANO, F., CRUDELE, M. A., FAVATI, F., GUERZONI, M. E., SUZZI, G., 2001. Effects of pH, temperature and NaCl concentration on the growth kinetics, proteolytic activity and biogenic amine production of *Enterococcus faecalis*. In *International Journal of Food Microbiology*, roč. 64, 2001, s. 105-117.

GARDINI, F., ZACCARELLI, A., BELLETI, N., FAUSTINI, F., CAVAZZA, A., MARTUSCELLI, M., MASTROCOLA, D., SUZZI, G., 2005. Factors influencing biogenic amine production by a strain of *Oenococcus oeni* in a model system. In *Food Control*, roč. 16, 2005, s. 609-616.

Štúdium rastu a produkcie biogénnych aminov niektorými mikroorganizmami za modelových podmienok. In *Czech Journal of Food Science*, roč. 17, 1998, s. 15-21.

GREIF, G., GREIFOVÁ, M., KAROVIČOVÁ, J., 1997. Tvorba kadaverínu a amoniaku činnosťou niektorých baktérií za modelových podmienok. In *Czech Journal of Food Science*, roč. 16, 1997, s. 53-56.

GREIF, G., GREIFOVÁ, M., KAROVIČOVÁ, J., 2006. Effects of NaCl concentration and initial pH value on biogenic amine formation dynamics by *Enterobacter* spp. bacteria in model conditions. In *Journal of Food and Nutrition Research*, roč. 45, 2006, s. 21-29.

LANDETE, J. M., FERRER, S., PARDO, I., 2007. Biogenic amine production by lactic acid bacteria, acetic bacteria and yeast isolated from wine. In *Food Control*, roč. 18, 2007, s. 1569-1574.

MAZZOLI, R., LAMBERTI, C., COISSON, J. D., PURROTTI, M., ARLORIO, M., GIUFFRIDA, M. G., GIUNTA, C., PESSIONE, E., 2009. Influence of ethanol, malate and arginine on histamine production of *Lactobacillus hilgardii* isolated from Italian red wine. In *Amino Acids*, roč. 36, 2009, s. 81-89.

SANTOS, W. C., SOUZA, M. R., CERQUEIRA, M. M. O. P., GLÓRIA, M. B. A., 2003. Bioactive amine formation in milk by *Lactococcus* in the presence or not of rennet and NaCl at 20 and 32 °C. In *Food Chemistry*, roč. 81, 2003, s. 595-606.

Poděkování

Práce vznikla za podpory projektu MŠMT: MSM 7088352101.

Kontaktní adresa:

RNDr. Leona Buňková, Ph.D. Ústav technologie tuků, tenzidů a kosmetiky.
Tel: 00420 576 031 154, email: bunkova@ft.utb.cz,
doc. Ing. František Buňka, Ph.D., Bc. Eva Pollaková, Bc. Tereza Podešvová, Ústav technologie a mikrobiologie potravin,
prof. Ing. Stanislav Kráčmar, DrSc., Ústav biochemie a analýzy potravin,
Fakulta technologická, Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, nám. T.G. Masaryka 275, 762 72 Zlín, Česká republika.
Vladimír Dráb, Sběrka kultur mlékařských mikroorganismů Laktoflora, MILCOM, Soběslavská 841, 390 02 Tabor, Česká republika



The effect of lactose, NaCl and an aero/anaerobic environment on the tyrosine decarboxylase activity of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* and *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*

Leona Buňková^{a,*}, František Buňka^b, Eva Pollaková^a, Tereza Podešvová^a, Vladimír Dráb^c

^a Department of Fat, Tenside and Cosmetics Technology, Faculty of Technology, Tomas Bata University in Zlín, nam. T. G. Masaryka 275, Zlín, Czech Republic

^b Department of Food Technology and Microbiology, Faculty of Technology, Tomas Bata University in Zlín, nam. T. G. Masaryka 275, Zlín, Czech Republic

^c Cultures Collection of Dairy Microorganisms Laktoflora, MILCOM, Sobeslavská 841, 390 02 Tabor, Czech Republic

ARTICLE INFO

Article history:

Received 16 June 2010

Received in revised form 25 February 2011

Accepted 24 March 2011

Keywords:

Lactococcus lactis subsp. *lactis*

Lactococcus lactis subsp. *cremoris*

Tyramine

Lactose

NaCl

Aero/anaerobiosis

Ion-exchange chromatography

ABSTRACT

The aim of this work was to study, under model conditions, combined effects of the concentration of lactose (0–1% w/v), NaCl (0–2% w/v) and aero/anaerobiosis on the growth and tyramine production in 3 strains of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* and 2 strains of *L. lactis* subsp. *cremoris*. The levels of the factors tested were chosen with respect to the conditions which can occur during the real process of natural cheese production, including the culture temperature (10 ± 1 °C). In all strains tested, tyrosine decarboxylation was most influenced by NaCl concentration; the highest production of tyramine was obtained within the culture with the highest (2% w/v) salt concentration applied. Two of the strains *L. lactis* subsp. *lactis* produced tyramine only in broth with the highest NaCl concentration tested. In the remaining 3 strains of *L. lactis*, tyramine was detected under all conditions applied. The tested concentration of lactose and aero/anaerobiosis had a less significant effect on tyramine decarboxylation. However, it was also found that at the same concentrations of NaCl and lactose, a higher amount of tyramine was detected under anaerobic conditions. In all strains tested, tyramine decarboxylation started during the active growth phase of the cells.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Biogenic amines are low-molecular, basic, aliphatic, aromatic or heterocyclic compounds derived from amino acids occurring in living organisms in the form of metabolic intermediates and products showing biological activity. The essential condition for the formation of biogenic amines is the presence of amino acids in a given substrate, the presence of microorganisms with decarboxylase activity and suitable conditions for the growth and activity of microorganisms. The formation process of biogenic amines is catalyzed by microbial enzymes (decarboxylases). The production of these compounds proceeds through several steps, starting from proteins via peptides to amino acids, the decarboxylation of which leads to biogenic amine formation (Halász et al., 1994). Lactic acid bacteria (LAB), including the representatives of *Lactococcus* genus, also belong to microorganisms with decarboxylase enzymes (Arena et al., 2007; Aymerich et al., 2006; Bover-Cid et al., 2008; Buňková et al., 2009; de Llano et al., 1998; Fadda et al., 2001; Fernández et al., 2007; Gardini et al., 2001; Landete et al., 2007; Marcobal et al., 2006; Roig-Sagués et al., 1997). It has been found that the ability to produce biogenic amines is specific

to certain strains of microorganisms rather than to certain species. This means that various strains of the same species can differ in the production of biogenic amines (Arena and Manca de Nadra, 2001; Aymerich et al., 2006; Bover-Cid et al., 2001; Buňková et al., 2009).

The production of biogenic amines by bacteria can be influenced by several external factors through affecting the kinetics of decarboxylase reactions, the growth of the aminogenic microorganisms and also the expression of their decarboxylase potential. The external factors influencing the production of biogenic amines in bacteria include temperature and pH of the environment, aero/anaerobiosis, availability of carbon sources (e.g. glucose), the presence of growth factors, growth phase of the cells, NaCl concentration (water activity), etc. (Bover-Cid et al., 2008; Emborg and Dalgaard, 2008a, 2008b; Fernández et al., 2007; Gardini et al., 2001, 2005; Greif et al., 1997, 1998, 2006; Santos et al., 2003). Contrary to the influence of glucose on the biogenic amines production, which has been studied by e.g. Bover-Cid et al. (2008), the effect of different lactose concentrations on the production of biogenic amines in lactic acid bacteria has not been described in the available literature.

Biogenic amines can also be produced by LAB strains which are commonly used for technological purposes as starter cultures (Buňková et al., 2009). Therefore, it is recommended to test these strains for decarboxylase activity before they are used in dairy industry. It would also be useful to describe the kinetics of biogenic

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

amine production under conditions which are similar to those during the technological process of the cheesemaking. However, this information occurs very rarely in current technical literature.

The aim of the work was to evaluate, in factorial design, the effect of selected factors (the concentration of lactose, NaCl and an aerobic/anaerobic environment) on tyramine production in 5 bacterial strains of *Lactococcus* genus which were assigned as tyramine producers in study of Buňková et al. (2009). These bacteria are commonly used within the biotechnological process of cheese production as starter cultures. The levels of factors were, hence, chosen with respect to the conditions which can occur within this technological process.

2. Materials and methods

The effect of selected external factors (the addition of lactose at a concentration of 0; 0.25; 0.50; 0.75 and 1.00% w/v; NaCl at a concentration of 0; 1 and 2%; and an aerobic/anaerobic environment; 30 different conditions) which can influence the production of biogenic amines during cheese manufacturing was tested in 3 strains of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* (CCDM 48, CCDM 141 and CCDM 1004) and 2 strains of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* (CCDM 824 and CCDM 946). All strains were isolated from milk and plant environments and were obtained from the Cultures Collection of Dairy Microorganisms Laktoflora® (Czech Republic). Choice of the strains was motivated by their practical use as primary mesophilic cultures for cheese, fermented milk and/or cream

production. Lactose and NaCl were obtained from Lach-Ner, Neratovice, Czech Republic.

Cultivation of the above-mentioned strains was performed in M17 broth (Oxoid, Basingstoke, UK) with the addition of 0.2% (w/v) tyrosine (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) at a temperature of 10 ± 1 °C within the interval of 1 to 15 days, which is used within the technological process of natural cheese ripening. Five milliliters of cultivation medium was always inoculated with 25 μ l of overnight culture (ca 10^7 CFU/mL) cultivated in M17 broth enriched by 0.2% (w/v) tyrosine. The effect of an aerobic/anaerobic environment on the production of biogenic amines was studied by comparison of the results determined on test tubes cultured aerobically and anaerobically while keeping remaining factors identical. The anaerobic environment was achieved by covering the culture medium with sterile paraffin oil (1 mL; PLIVA-Lachema Diagnostika, Brno, Czech Republic). Sampling for the analysis was performed on the 0th, 1st, 2nd, 3rd, 4th, 5th, 6th, 7th, 10th, 12th and 15th day of cultivation by taking 2 random test tubes of each strain and each level of tested factors. Thus in total, 660 tubes of each strain were analyzed in the experiment and the whole experiment was repeated three times.

After the cultivation of bacteria, the cells were removed by centrifugation ($10,000 \times g$ for 30 min at 4 °C) and the supernatant was filtered through a 0.45 μ m filter. Tyramine content in supernatant was determined by means of ion exchange chromatography (IEC; Amino acid analyser AAA400, Ingos Prague, Czech Republic) in the medium

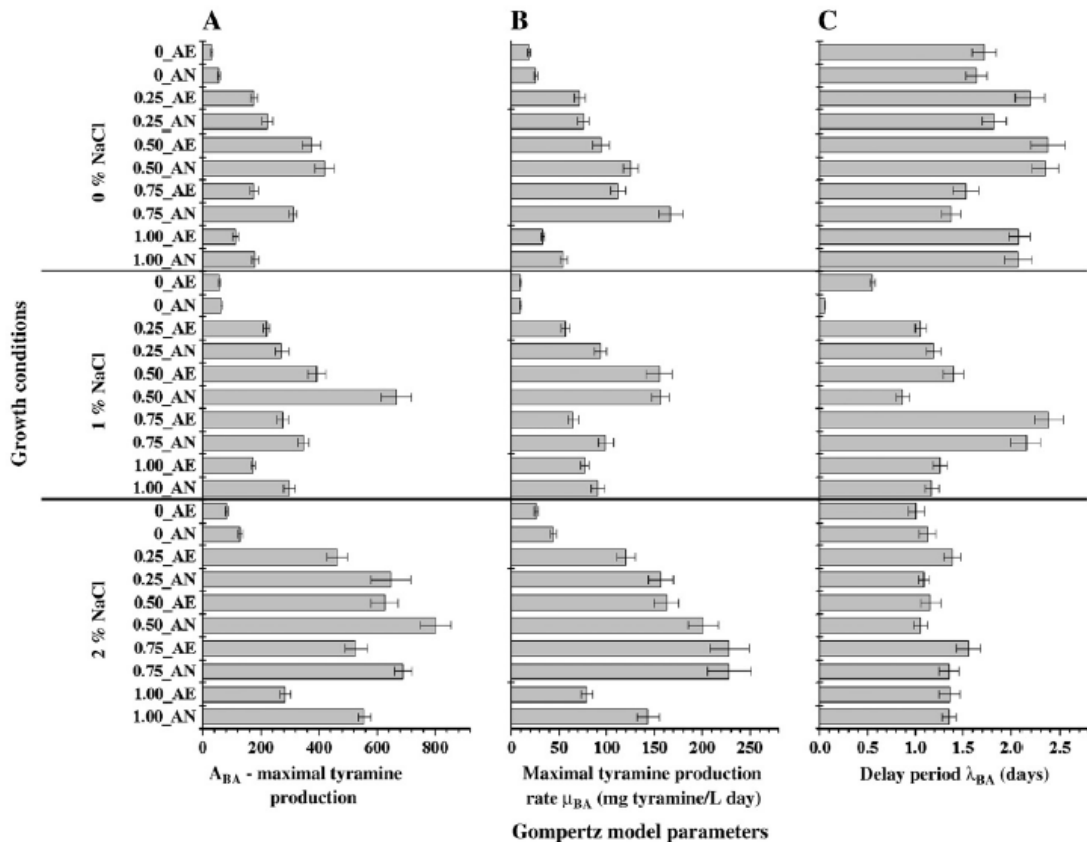


Fig. 1. Gompertz model parameters: (A) maximum tyramine production A_{BA} ; (B) maximum tyramine production rate μ_{BA} (mg tyramine/L day) and (C) delay period λ_{BA} (in days) expressing the influence of environment factors on the production of tyramine in *L. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* CCDM 141. AE – aerobic environment; AN – anaerobic environment; and the numbers refer to lactose concentration (in %). The error bars represent standard deviations ($n=6$).

after the cell removal and filtration according to Buňková et al. (2009). Each tube was analyzed three times. Tyramine standard for IEC analyses was obtained from Sigma-Aldrich.

The development of tyramine content in the tested *L. lactis* strains was modeled by means of Gompertz models (modification according to Zwietering et al., 1990). The dependence of the tyramine content (y ; mg/L) on time (t ; hours) was expressed as follows:

$$y = A_{BA} \cdot \exp \left\{ - \exp \left[\frac{\mu_{BA} \cdot e}{A_{BA}} (\lambda_{BA} - t) + 1 \right] \right\} \quad (1)$$

where: μ_{BA} is the maximum tyramine production rate (mg tyramine/L h); λ_{BA} is the delay period (the time until the tyramine production was firstly detected; hours); and A_{BA} is the asymptote defined as maximum tyramine production. For the calculation of μ_{BA} , λ_{BA} and A_{BA} parameters, non-linear regression analysis (Marquardt–Levenburg method) was used for the following conditions: $\mu_{BA} > 0$, $\lambda_{BA} > 0$ and $A_{BA} > 0$. For each level of each factor tested, the dependence of the tyramine content (y) on time (t) was modeled (using Gompertz model) six times (2 replicate tubes in three experiments). From values obtained by regression analysis, mean and standard deviation were calculated (shown in Figs. 1–4). For a graphic illustration, the μ_{BA} and λ_{BA} values were converted from hours to days.

Apart from biogenic amine production measured by means of IEC, during the entire testing period the following factors were also studied: (i) pH of the culture medium after incubation of bacteria

(pH-meter CyberScan pH/Ion 510; Eutech Instruments, Vernon Hills, USA) and (ii) the increase in number of cells in M17 broth in dependence on lactose and salt concentrations in aerobic and anaerobic conditions. Bacteria were counted on M17 agar plates (30 ± 1 °C; 2 days) on the 0th, 12th, 24th, 36th and 48th hour and then on the 3rd, 4th, 5th, 6th, 7th, 10th, 12th and 15th day of cultivation. The dependence of the logarithm of the relative population size ($y = \ln(N_t/N_0)$; where N_t is total number of CFU/mL in time t and N_0 is total number of CFU/mL at the beginning of cultivation) on the time of culturing (t) was described by means of the three-parameter Gompertz model:

$$y = A \cdot \exp \left\{ - \exp \left[\frac{\mu_m \cdot e}{A} (\lambda - t) + 1 \right] \right\} \quad (2)$$

where: μ_m is the maximum specific growth rate (1/h); λ is the lag-time (h); A is the asymptote [$A = \ln(N_m/N_0)$] defined as the maximum value of the logarithm of the relative population size reached (Zwietering et al., 1990). The Marquardt–Levenburg method was also used for $\mu > 0$, $\lambda > 0$ and $A > 0$. The asymptote A was converted into A' (Table 1) according to equation:

$$A' = \log(N_0 \cdot e^A). \quad (3)$$

The absolute rate of tyramine production (mg/L day) can be related to the absolute growth rate (CFU/mL day) by a constant yield

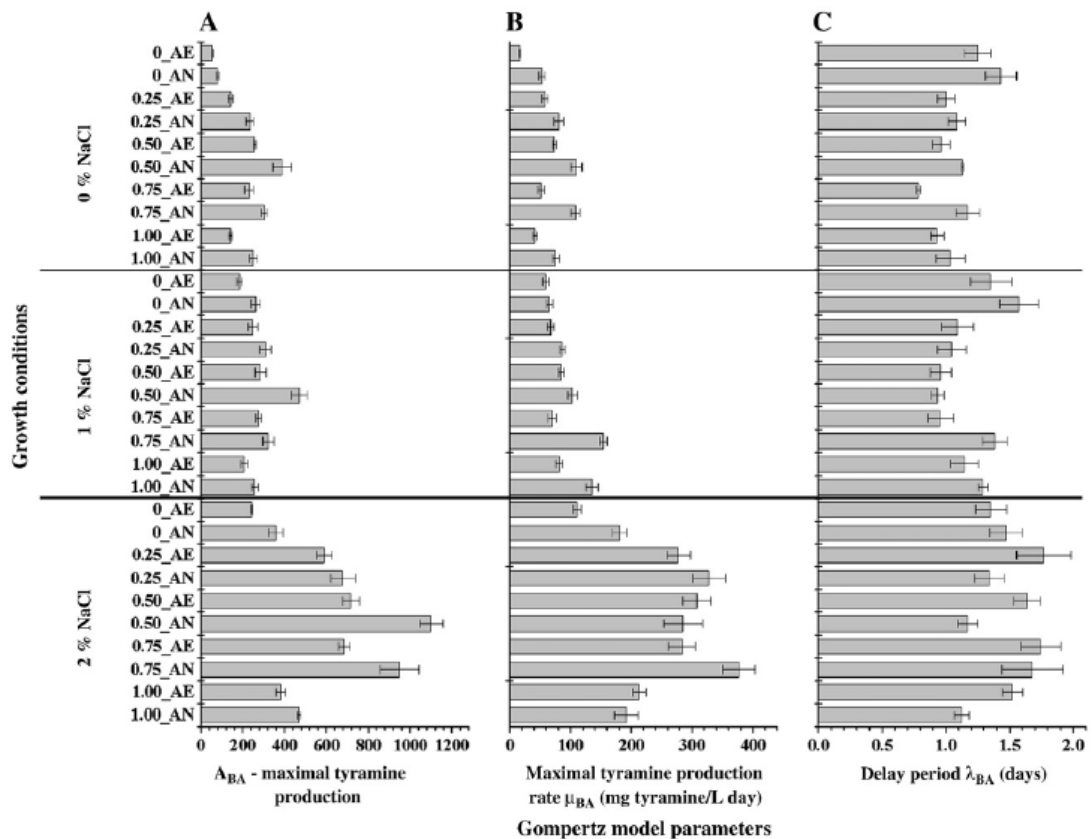


Fig. 2. Gompertz model parameters: (A) maximum tyramine production A_{BA} ; (B) maximum tyramine production rate μ_{BA} (mg tyramine/L day) and (C) delay period λ_{BA} (in days) expressing the influence of environment factors on the production of tyramine in *L. lactis* subsp. *cremoris* CCDM 824. AE – aerobic environment; AN – anaerobic environment; and the numbers refer to lactose concentration (in %). The error bars represent standard deviations (n = 6).

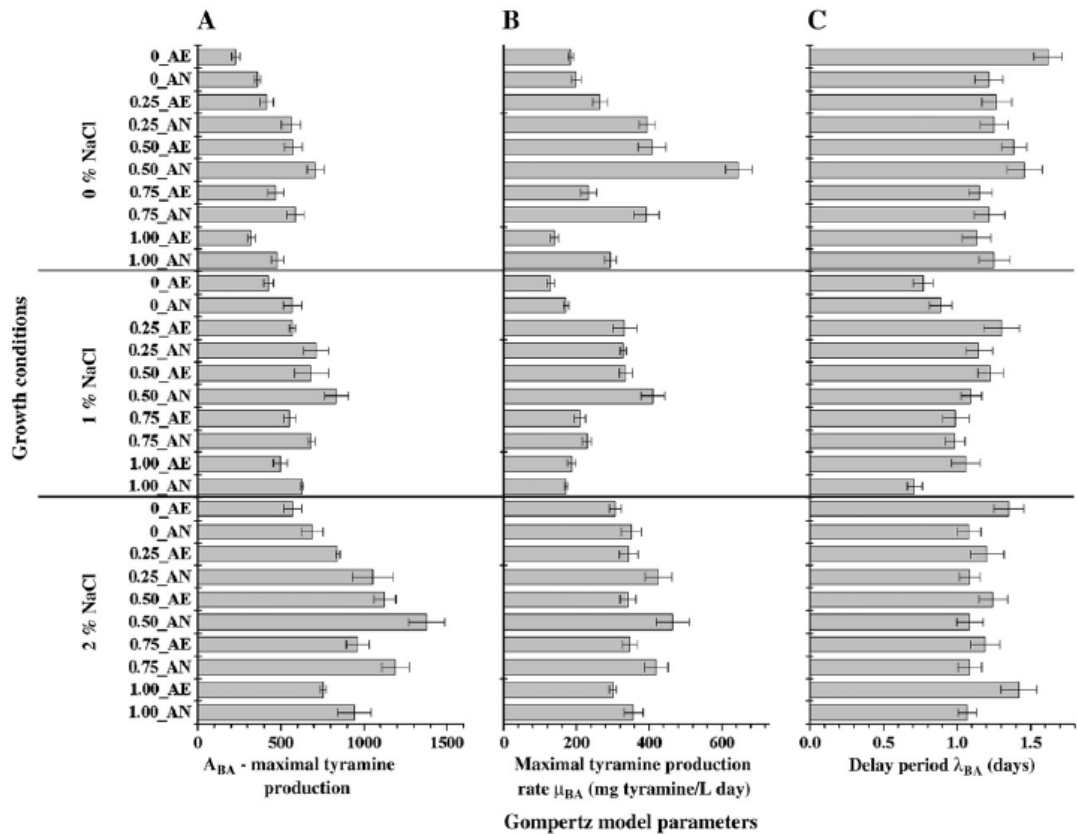


Fig. 3. Gompertz model parameters: (A) maximum tyramine production A_{BA} ; (B) maximum tyramine production rate μ_{BA} (mg tyramine/L day) and (C) delay period λ_{BA} (in days) expressing the influence of environment factors on the production of tyramine in *L. lactis* subsp. *cremoris* CCDM 946. AE – aerobic environment; AN – anaerobic environment; and the numbers refer to lactose concentration (in %). The error bars represent standard deviations ($n = 6$).

factor for tyramine formation ($Y_{TYR/CFU}$, mg tyramine/CFU) according to Eq. (4) (Emborg and Dalgaard, 2008a):

$$TYR_t = TYR_0 + Y_{TYR/CFU} \cdot (N_t - N_0) \cdot 1000, \quad (4)$$

where TYR_t and TYR_0 (mg/L) are the concentrations of tyramine at time t and 0, respectively; and N_t and N_0 are total numbers of CFU/mL in time t and 0, respectively. The Marquadt–Levenburg method was applied for $Y_{TYR/CFU} > 0$. The parameter $Y_{TYR/CFU}$ was expressed in $\text{mg} \times 10^9/\text{CFU}$ (Table 2).

For the calculations of all experimental data, statistical software Unistat® 5.5 (Unistat Ltd., London, UK) was used. For each non-linear regression model, the correlation coefficient (r) was calculated. In the next step, the goodness-of-fit test (Fisher–Snedocor test) was used for evaluation of significance of correlation coefficients (r) obtained. Kruskal–Wallis and Mann–Whitney tests were carried out for comparison of Gompertz parameters determined from growth curves and tyramine development curves, respectively. The values of yield factors ($Y_{TYR/CFU}$) calculated for individual levels of studied factors were statistically evaluated in the same way.

3. Results

Correlation coefficients (r) of dependence between the logarithm of the relative population size and the time of cultivation ranged

between 0.827 and 0.990 ($P < 0.05$). Correlation coefficients (r) for dependence of the tyramine content and the time of cultivation were within an interval of (0.712; 0.948). Correlation coefficients (r) of models calculating yield factors ($Y_{TYR/CFU}$) showed values between 0.682 and 0.852 ($P < 0.05$).

3.1. Growth of bacteria under the conditions tested

Within the factors evaluated, only the presence of lactose influenced the growth of lactococci tested. A significant difference ($P < 0.05$) was found in the logarithm of total CFU number in medium cultivated without the presence (0%) of lactose in comparison with the broth containing lactose, irrespective of its concentration (Table 1; A' -value calculated from the Gompertz model of growth curve according to Eq. (3)). However, lactose concentration as such (range of 0.25–1.00% w/v) did not have a significant influence on the growth of bacterial strains tested ($P \geq 0.05$). Also, a similar growth of bacteria was found ($P \geq 0.05$) in the presence of tested NaCl concentrations and in an aerobic/anaerobic environment. Growth of bacteria in aerobic or in anaerobic environment did not have a significant influence on the Gompertz model parameters of tested strains ($P \geq 0.05$). The only exception to the above-mentioned results was the strain of *L. lactis* subsp. *lactis* CCDM 48, in which the growth of cells was not influenced by any of the factors studied ($P \geq 0.05$).

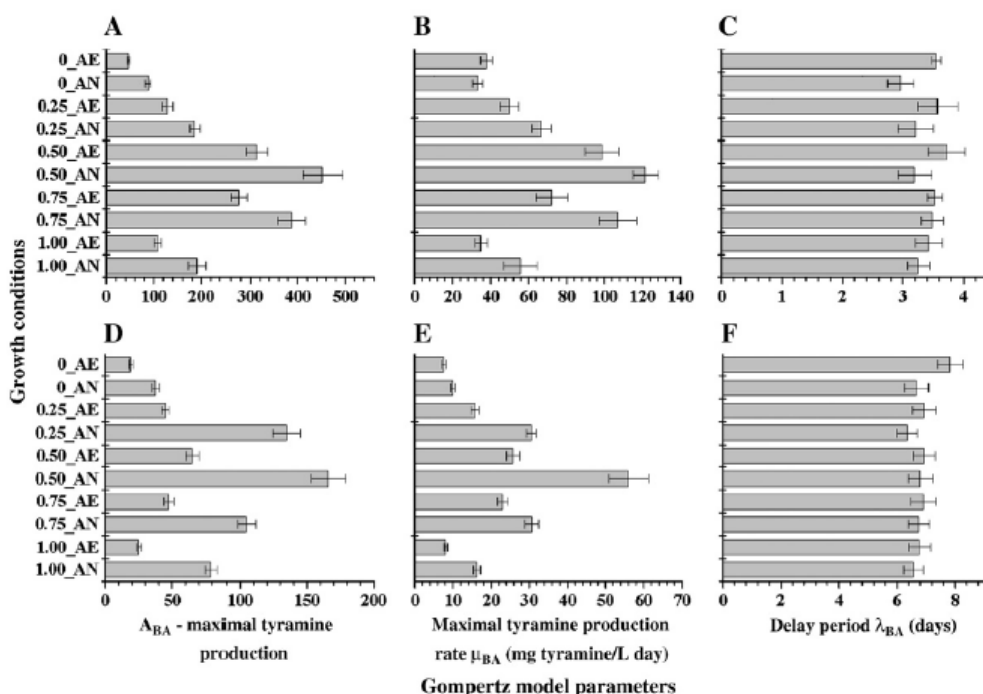


Fig. 4. Gompertz model parameters: (A and D) maximum tyramine production A_{BA} ; (B and E) maximum tyramine production rate μ_{BA} (mg tyramine/L day) and (C and F) delay period λ_{BA} (in days) expressing the influence of environment factors on the production of tyramine in *L. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* (CCDM 48 – parts A–C and CCDM 1004 – parts D–F) under the concentration of 2% w/w NaCl. AE – aerobic environment; AN – anaerobic environment; and the numbers refer to lactose concentration (in %). The error bars represent standard deviations ($n=6$).

During the whole experiment, the control culture medium (without inoculated cells) had a pH within 6.85–6.88. With the increasing culture time and the rising number of cells, a decrease in pH of the culturing environment occurred due to the production of lactic acid, between the 3rd and 5th days. During the following days, the pH of the cultivation medium remained almost unchanged ($P \geq 0.05$; data not shown). On the 15th day, the culture media with a higher concentration of lactose (0.75 and 1.00% w/w) showed a more significant decrease ($P < 0.05$) in pH (the range of 5.16–4.81) in comparison to the broths with a lower content of lactose (0.25 and 0.50% w/w; the pH-value between 5.19 and 5.84). A different NaCl content or type of the environment (aerobiosis/anaerobiosis) did not have a significant influence on final pH of broth after the cultivation ($P \geq 0.05$).

3.2. Tyramine production in the strains tested

In the tested bacteria of *L. lactis* subsp. *cremoris* (CCDM 824 and CCDM 946) and *L. lactis* subsp. *lactis* (CCDM 48, CCDM 141 and CCDM 1004), the highest production of tyramine was determined in the *L. lactis* subsp. *cremoris* CCDM 946 strain, which was shown to produce as much as 1400 mg/L of the culture medium after 15 days of cultivation. Within the strains of *L. lactis* subsp. *lactis*, higher production of tyramine was detected in CCDM 141 (790 mg/L). The Gompertz parameters for tyramine production of five above mentioned strains are presented in Figs. 1–4.

The maximum tyramine production (A_{BA}), maximum rate of tyramine production (μ_{BA}) and yield factor for tyramine production ($Y_{TYR/CFU}$) were lower ($P < 0.05$) when bacteria were cultivated in the medium with 0% or 1% (w/v) NaCl compared to the incubation in the environment with the highest NaCl concentration (2% w/v) (Figs. 1–3, parts A and B, and Table 2). The results in Table 2 also show, that the

production of tyramine was increased in anaerobic environment in comparison with aerobic environment ($P < 0.05$). In all salt concentrations tested, the highest production of tyramine (represented as maximum tyramine production, A_{BA}) was determined during the cultivation with 0.5% (w/v) lactose without oxygen access. On the other hand, if the absolute value of tyramine production was recalculated on production of individual cells (represented as yield factor, $Y_{TYR/CFU}$) the maximum yield of tyramine per CFU was determined in cultivation broth without lactose ($P < 0.05$). In strains CCDM 824, CCDM 946 and CCDM 141, the production of tyramine was detected very early, typically between the 1st and 2nd day of cultivation. Under some conditions (2.0% NaCl w/v; 0.5% lactose w/v and anaerobiosis) tyramine production started even earlier, already after 20 and 36 h (Figs. 1–3 part C).

In the strains *L. lactis* subsp. *lactis* CCDM 48 and CCDM 1004, tyramine was formed only in the environment with 2% (w/v) NaCl (Fig. 4). Decarboxylase activity of individual cells of strain CCDM 1004 was very weak. This can be concluded from the yield factor ($Y_{TYR/CFU}$) that was at least ten-fold lower compared to other strains tested (Table 2). A higher production of biogenic amine in the strains CCDM 48 and CCDM 1004 was detected in an anaerobic environment ($P < 0.05$; at the identical concentration of lactose). On the other hand, in the cultivation medium without lactose, no statistically significant difference ($P \geq 0.05$) between the maximum tyramine production rate (μ_{BA}) in aerobic and anaerobic environments was found. At all tested concentrations of lactose in an aerobic or anaerobic environment, *L. lactis* CCDM 48 started to produce tyramine between the 3rd and 4th day (Fig. 4C). In the strain CCDM 1004, in comparison with the other strains tested, the longest delay period of tyramine production was determined. Tyramine was first detected between the 6th and 8th day (Fig. 4F).

Table 1
Gompertz model parameters (A' , μ and λ) of growth curve for *L. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* (CCDM 48, CCDM 141 and CCDM 1004) and *L. lactis* subsp. *cremoris* (CCDM 824 and CCDM 946) for different conditions with NaCl and lactose additions.

Strain	NaCl concentration (% w/v)	Gompertz model parameter ^a	Lactose content (% w/v)		
			None ^b	0.25–1.00 ^c	
CCDM 48	0	A'	6.89 ± 0.06	6.79–7.06	
		μ	0.38 ± 0.02	0.35–0.43	
		λ	25.05 ± 0.12	24.96–25.07	
	1	A'	6.74 ± 0.05*	6.86–7.01	
		μ	0.33 ± 0.02	0.32–0.36	
		λ	25.02 ± 0.13	25.01–25.12	
	2	A'	6.79 ± 0.03*	7.02–7.24	
		μ	0.36 ± 0.02	0.34–0.39	
		λ	25.07 ± 0.10	25.09–25.24	
	CCDM 141	0	A'	6.53 ± 0.02*	7.58–7.82
			μ	0.38 ± 0.06*	0.43–0.51
			λ	24.85 ± 0.10	24.82–25.08
1		A'	6.65 ± 0.11*	7.64–7.79	
		μ	0.32 ± 0.02*	0.38–0.40	
		λ	24.95 ± 0.01	25.05–25.16	
2		A'	6.67 ± 0.06*	7.68–7.81	
		μ	0.39 ± 0.02*	0.42–0.45	
		λ	24.88 ± 0.02	25.01–25.09	
CCDM 1004		0	A'	6.57 ± 0.17*	7.44–7.67
			μ	0.35 ± 0.02*	0.39–0.48
			λ	24.94 ± 0.11	24.90–25.09
	1	A'	6.63 ± 0.15*	7.41–7.61	
		μ	0.31 ± 0.01*	0.38–0.46	
		λ	24.97 ± 0.13	24.92–25.06	
	2	A'	6.61 ± 0.14*	7.51–7.61	
		μ	0.32 ± 0.03*	0.36–0.43	
		λ	24.96 ± 0.22	24.99–25.07	
	CCDM 824	0	A'	6.54 ± 0.16*	7.74–7.83
			μ	0.41 ± 0.01	0.42–0.44
			λ	24.91 ± 0.12	24.96–25.12
1		A'	6.71 ± 0.13*	7.70–7.80	
		μ	0.33 ± 0.04*	0.38–0.42	
		λ	24.99 ± 0.16*	25.06–25.08	
2		A'	6.85 ± 0.17*	7.79–7.90	
		μ	0.38 ± 0.02*	0.45–0.48	
		λ	24.93 ± 0.14	24.96–25.04	
CCDM 946		0	A'	6.69 ± 0.13*	7.50–7.70
			μ	0.36 ± 0.02	0.36–0.49
			λ	24.97 ± 0.25	24.98–25.09
	1	A'	6.82 ± 0.07*	7.60–7.71	
		μ	0.34 ± 0.02	0.34–0.43	
		λ	25.04 ± 0.04	25.01–25.08	
	2	A'	6.84 ± 0.02*	7.53–7.78	
		μ	0.36 ± 0.03*	0.40–0.44	
		λ	24.99 ± 0.21	24.95–25.11	

^a Gompertz model parameters: A' – the recalculated asymptote A (according to Eq. (3)) defined as the maximal amount of viable cell count reached; μ – maximum specific growth rate (1/h); and λ – lag time (h).

^b The values of Gompertz model parameters (for experiments without lactose addition) were obtained and are given as mean ± S.D. ($n = 12$; values were calculated from results for both aerobic and anaerobic environments). The values of the parameter for experiments without lactose addition, which significantly differ from the values of the parameter for conditions with 0.25–1.00% w/v lactose, are signed by asterisk.

^c The values of Gompertz model parameters for experiments with 0.25–1.00% w/v lactose are presented as an interval of minimum and maximum values. The intervals contain values for conditions of both aerobic and anaerobic environments.

4. Discussion

The results of the study show that 3 of 5 strains of the lactococci tested (*L. lactis* subsp. *lactis* CCDM 141 and *L. lactis* subsp. *cremoris* CCDM 824 and CCDM 946) produced tyramine under all conditions tested. The remaining 2 strains (*L. lactis* subsp. *lactis* CCDM 48 and CCDM 1004) showed tyramine production only under certain conditions (cultivation in the presence of 2% w/v NaCl). These results prove that the ability of bacteria to produce biogenic amines depends on culture conditions and the kinetics of the process is a characteristic of an individual strain (Arena and Manca de Nadra,

2001; Bover-Cid et al., 2001). If the growth curve of the tested lactococci is compared with the curve of biogenic amine production, it is obvious that the production of tyramine started during the exponential phase of the bacteria growth. A similar trend of tyrosine decarboxylase activity was also found out in *Lactobacillus curvatus* by Bover-Cid et al. (2008).

A higher production of tyramine was determined in the environment with a higher concentration (2% w/v) of NaCl in all strains tested. Analogous results were published by Emborg and Dalgaard (2008a) who reported that *Morganella psychrotolerans* bacterium produces more histamine when growing in an environment with 4% (w/v) NaCl than in an environment with 2% (w/v) NaCl. Similarly, Greif et al. (2006) found out that some strains of *Enterobacter* genus produce more cadaverine and histamine in an environment with 1.2–3.0% (w/v) NaCl than in a medium with 0.2% (w/v) NaCl. A further increasing of NaCl concentration in the medium (4.5% or 6.8% w/v) resulted in a decrease in biogenic amine production. Also, in the current study it was found out that an increased amount of tyramine was detected in the medium with a higher NaCl concentration (in range of 0–2% w/v). The highest level of NaCl applied corresponds to the NaCl content in many groups of cheeses (e.g. Dutch-type or Swiss-type) (Fox et al., 2000). In two strains tested in the current study, no production of tyramine was detected after the cultivation in the medium without salt or with 1% (w/v) NaCl. However, different results were obtained by Santos et al. (2003), who noted a lower production of biogenic amines in lactococci cultivated in an environment with 0.5% (w/v) NaCl. This can be explained by the differences in incubation temperature, as these authors used higher temperatures for incubation (20 and 32 °C) compared to the current study (10 °C). Pereira et al. (2009) suggested that Na^+ ions that are involved in regulation of intracellular pH, play an essential role in the tyrosine decarboxylation pathway. Na^+ ions are important in sodium/proton antiport system, as they are exchanged with H^+ ions that are removed out of cells. This phenomenon can explain the higher tyramine production in medium with NaCl addition.

A further factor studied in our paper was addition of lactose. Under absence of lactose in M17 broth, a lower growth of bacterial cells and a lower maximum tyramine production (A_{BA}), in all NaCl concentrations tested, were found. On the other hand, the yield factors for tyramine production ($Y_{TYR/CFU}$) were the highest under these cultivation conditions. This phenomenon can be attributed to the fact that a cultivation medium without lactose is less suitable for the tested lactococci, which need complex media for their growth. According to Molenaar et al. (1993), decarboxylation of amino acid may serve as a source of metabolic energy. Thus, in sub-optimal cultivation conditions, represented by medium without saccharide source of energy – lactose, the cells can obtain necessary energy also from decarboxylation processes and therefore the amount of tyramine produced by a cell as a final product of this metabolic pathway, increases. When lactose was added to cultivation broth, the yield factor ($Y_{TYR/CFU}$), expressing tyramine concentration per CFU, decreased likely because the cell could obtain energy more effectively from saccharides. On the other hand, the absolute amount of tyramine produced by cells increased, which can be explained by higher amount of cells in medium. The highest absolute tyramine production, within the strains tested, was mostly determined in the anaerobic environment with 0.5% (w/v) lactose. A further increase in lactose concentration above 0.5%, with the same NaCl concentration led to a decreasing production of tyramine. However, the effect of different lactose concentrations on the production of biogenic amines in lactic acid bacteria has not been published in the literature. Contrary to findings from current work, Bover-Cid et al. (2008) did not find a significant influence of glucose on the production of tyramine in *Lactobacillus curvatus*. Also, Connil et al. (2002) refer to the fact that an increasing concentration of glucose does not significantly influence tyramine production in the bacteria of *Carnobacterium* genus.

Table 2

The values of yield factor for tyramine formation $Y_{TYR/CRJ}$ ($\text{mg} \times 10^9/\text{CFU}$) of strains *L. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* (CCDM 48, CCDM 141 and CCDM 1004) and *L. lactis* subsp. *cremoris* (CCDM 824 and CCDM 946) for different conditions with NaCl and lactose additions and aerobic or anaerobic environment (mean \pm S.D. and $n = 6$).

NaCl (% w/v)	Lactose (% w/v)	Environment	$Y_{TYR/CRJ}$ of strain ($\text{mg} \times 10^9/\text{CFU}$)				
			CCDM 48**	CCDM 141	CCDM 1004**	CCDM 824	CCDM 946
0	0	Aerobic	N***	7.25 \pm 0.7 ^a A ₂	N	11.17 \pm 0.88 ^a A ₂	41.32 \pm 2.38 ^a A ₂
0	0	Anaerobic	N	14.03 \pm 1.25 ^b A ₃	N	21.90 \pm 1.80 ^b A ₃	70.47 \pm 4.43 ^b A ₃
0	0.25	Aerobic	N	3.80 \pm 0.35 ^a A ₁	N	2.38 \pm 0.20 ^a A ₁	9.56 \pm 0.42 ^a A _{1,c}
0	0.25	Anaerobic	N	5.49 \pm 0.40 ^b A ₂	N	3.77 \pm 0.32 ^b A ₂	14.25 \pm 1.34 ^b A _{2,c}
0	0.50	Aerobic	N	4.25 \pm 0.30 ^a A ₁	N	3.35 \pm 0.27 ^a A ₁	10.63 \pm 1.06 ^a A ₁
0	0.50	Anaerobic	N	4.93 \pm 0.28 ^b A ₂	N	4.92 \pm 0.29 ^b A ₂	14.38 \pm 1.23 ^b A ₂
0	0.75	Aerobic	N	2.81 \pm 0.18 ^a A ₁	N	3.08 \pm 0.20 ^a A ₁	10.31 \pm 0.92 ^a A _{1,c}
0	0.75	Anaerobic	N	5.06 \pm 0.11 ^b A ₂	N	4.33 \pm 0.23 ^b A ₂	14.60 \pm 1.22 ^b A _{2,c}
0	1.00	Aerobic	N	1.64 \pm 0.18 ^a A ₁	N	2.19 \pm 0.23 ^a A ₁	9.10 \pm 0.72 ^a A ₁
0	1.00	Anaerobic	N	2.57 \pm 0.24 ^b A ₂	N	4.02 \pm 0.30 ^b A _{2,d}	12.55 \pm 1.58 ^b A ₂
1.0	0	Aerobic	N	6.55 \pm 0.41 ^a B ₂	N	25.08 \pm 2.26 ^a B ₂	49.78 \pm 3.30 ^a B ₂
1.0	0	Anaerobic	N	10.85 \pm 0.94 ^b B ₃	N	54.22 \pm 3.08 ^b B ₃	78.59 \pm 4.04 ^b B ₃
1.0	0.25	Aerobic	N	4.00 \pm 0.37 ^a B ₁	N	4.53 \pm 0.27 ^a B ₁	10.25 \pm 0.47 ^a B ₁
1.0	0.25	Anaerobic	N	5.16 \pm 0.30 ^b B ₂	N	5.81 \pm 0.25 ^b B ₂	14.61 \pm 0.95 ^b B ₂
1.0	0.50	Aerobic	N	5.08 \pm 0.39 ^a B ₁	N	3.62 \pm 0.31 ^a B ₁	11.19 \pm 0.53 ^a B _{1,c}
1.0	0.50	Anaerobic	N	8.91 \pm 0.73 ^b B ₃	N	6.19 \pm 0.42 ^b B ₃	13.78 \pm 0.99 ^b B _{3,c}
1.0	0.75	Aerobic	N	3.71 \pm 0.13 ^a B ₁	N	4.28 \pm 0.40 ^a B ₁	9.85 \pm 0.93 ^a B ₁
1.0	0.75	Anaerobic	N	5.10 \pm 0.39 ^b B ₂	N	5.25 \pm 0.23 ^b B ₂	13.06 \pm 0.91 ^b B _{2,c}
1.0	1.00	Aerobic	N	2.41 \pm 0.23 ^a B ₁	N	2.88 \pm 0.17 ^a B ₁	9.91 \pm 0.96 ^a B ₁
1.0	1.00	Anaerobic	N	4.29 \pm 0.31 ^b B ₂	N	3.95 \pm 0.27 ^b B ₂	11.73 \pm 1.02 ^b B _{2,c}
2.0	0	Aerobic	5.96 \pm 0.52 ^a a	12.83 \pm 1.26 ^a C ₂	1.61 \pm 0.16 ^a a	30.77 \pm 2.03 ^a C ₂	70.20 \pm 6.00 ^a C ₂
2.0	0	Anaerobic	10.98 \pm 0.88 ^b a	24.05 \pm 1.74 ^b C ₃	2.99 \pm 0.22 ^b a	58.08 \pm 3.03 ^b C ₃	93.26 \pm 4.39 ^b C ₃
2.0	0.25	Aerobic	8.81 \pm 0.70 ^b b	7.66 \pm 0.64 ^a C ₁	0.51 \pm 0.09 ^a b	8.07 \pm 0.55 ^a C ₁	14.79 \pm 1.28 ^a C _{1,c}
2.0	0.25	Anaerobic	12.84 \pm 1.12 ^b b	11.05 \pm 0.99 ^b B ₂	1.39 \pm 0.12 ^b a	10.08 \pm 0.88 ^b C ₂	24.68 \pm 1.83 ^b B ₂
2.0	0.50	Aerobic	12.76 \pm 1.17 ^a c	7.86 \pm 0.74 ^a C ₁	0.59 \pm 0.05 ^a b	7.60 \pm 0.81 ^a B ₁	15.68 \pm 1.31 ^a B ₁
2.0	0.50	Anaerobic	17.58 \pm 1.64 ^b c	10.80 \pm 0.86 ^b C ₂	1.54 \pm 0.10 ^b a	11.19 \pm 0.96 ^b C ₂	23.10 \pm 1.70 ^b B ₂
2.0	0.75	Aerobic	13.89 \pm 1.56 ^a c	8.53 \pm 0.61 ^a C ₁	0.49 \pm 0.08 ^a b	8.18 \pm 0.73 ^a C ₁	16.35 \pm 1.01 ^a B ₁
2.0	0.75	Anaerobic	18.71 \pm 1.84 ^b c	10.74 \pm 0.84 ^b B ₂	1.04 \pm 0.10 ^b a	10.82 \pm 0.91 ^b C ₂	21.81 \pm 1.00 ^b B ₂
2.0	1.00	Aerobic	6.10 \pm 0.38 ^a d	4.17 \pm 0.46 ^a C ₁	0.25 \pm 0.02 ^a c	4.51 \pm 0.29 ^a C ₁	12.97 \pm 1.27 ^a B ₁
2.0	1.00	Anaerobic	10.44 \pm 0.75 ^b a	7.73 \pm 1.01 ^b C ₂	0.72 \pm 0.07 ^b a	5.71 \pm 0.53 ^b C ₂	16.81 \pm 0.56 ^b B ₂

* Means within a column (the difference between environment) followed by different superscript letters differ ($P < 0.05$); and the values in individual NaCl and lactose additions were evaluated separately. Means within a column (the difference between lactose addition) followed by different subscript letters differ ($P < 0.05$); and the values in individual NaCl addition and environment were evaluated separately. Means within a column (the difference between NaCl addition) followed by different capital letters differ ($P < 0.05$); and the values in individual lactose addition and environment were evaluated separately.

** The effect of different NaCl additions was not evaluated in strains CCDM 48 and CCDM 1004 because tyramine was detected only in broth with 2% w/v NaCl.

*** N – tyramine was not detected.

Decarboxylase activity can also be influenced by pH of the environment (Bover-Cid et al., 2008; Gardini et al., 2001; Greif et al., 2006). If the cultivation environment is acidified by a higher lactic acid production, the decarboxylase activity can increase and thus the amount of the final product also increases. Tyramine production was increasing to a certain level of saccharide concentration and after this concentration was exceeded, the amount of biogenic amine remained unchanged or even decreased. A similar phenomenon was also observed for *Lactobacillus plantarum* in the presence of glucose or fructose (Arena et al.; 2007). Hence, a hypothesis can be suggested that in the case of different lactose concentrations, the decarboxylase activity in lactococci might have been influenced by a drop in pH caused by acidification of the medium. This can be corroborated by pH measurements of cultivation media; the decrease of pH-values of broth after cultivation with increase of the lactose concentration was namely observed in presented study. According to Halász et al. (1994), the biogenic amine production is higher in an acidic environment. Furthermore, in a very acidic environment, bacteria are more intensely encouraged to produce these enzymes, as a part of their defense mechanisms against the acidity. Higher concentrations of lactose could result in lower pH-values (below the optimum of tyrosine decarboxylase) which could reduce activity of latter mentioned enzyme.

The last factor studied was influence of an aerobic/anaerobic environment on tyramine production. In all strains tested under given conditions, a higher production of tyramine was determined under anaerobic conditions. This is in accordance with findings published by Bover-Cid et al. (2008), who also found that an anaerobic environment enhances decarboxylase activity of *Lactobacillus* enzymes.

5. Conclusion

Under model conditions simulating real technological process during production of natural cheeses, three of five tested strains of *L. lactis* (CCDM 141, CCDM 824 and CCDM 946) produced tyramine under all conditions tested. In the remaining two strains (CCDM 48 and CCDM 1004), tyramine production was detected only in the presence of 2% (w/v) NaCl in the cultivation medium. The highest production of biogenic amines was in all five strains of *L. lactis* studied determined in the presence of 2% (w/v) NaCl and 0.5% (w/v) lactose during anaerobic cultivation.

Acknowledgement

This study was supported by a project of the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic: MSM 7088352101 and MSM 2672286101.

References

- Arena, M.E., Manca de Nadra, M.C., 2001. Biogenic amine production by *Lactobacillus*. Journal of Applied Microbiology 90, 158–162.
- 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 putative tyrosine decarboxylase gene. Current Microbiology 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. Journal of Applied Microbiology 100, 40–49.
- Bover-Cid, S., Hugas, M., Izquierdo-Pulido, M., Vidal-Carou, M.C., 2001. Amino acid-decarboxylase activity of bacteria isolated from fermented pork sausages. International Journal of Food Microbiology 66, 185–189.

- 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.
- Buňková, L., Buňka, F., Hlobilová, M., Vaňátková, Z., Nováková, D., Dráb, V., 2009. Tyramine production of technological important strains of *Lactobacillus*, *Lactococcus* and *Streptococcus*. *European Food Research and Technology* 229, 533–538.
- Connil, N., Plissoneau, L., Onno, B., Pilet, M.F., Prevost, H., Dousset, X., 2002. Growth of *Carnobacterium divergens* V41 and production of biogenic amines and divercin V41 in sterile cold-smoked salmon extract at varying temperatures, NaCl levels and glucose concentrations. *Journal of Food Protection* 65, 333–338.
- de Llano, G.D., Cuesta, P., Rodríguez, A., 1998. Biogenic amine production by wild lactococcal and leuconostoc strains. *Letters in Applied Microbiology* 26, 270–274.
- Emborg, J., Dalgaard, P., 2008a. Modelling the effect of temperature, carbon dioxide, water activity and pH on growth and histamine formation on *Morganella psychrotolerans*. *International Journal of Food Microbiology* 128, 226–233.
- Emborg, J., Dalgaard, P., 2008b. Growth, inactivation and histamine formation of *Morganella psychrotolerans* and *Morganella morganii* – development and evaluation of predictive models. *International Journal of Food Microbiology* 128, 234–243.
- Fadda, S., Vignolo, G., Oliver, G., 2001. Tyramine degradation and tyramine/histamine production by lactic acid bacteria and *Kocuria* strains. *Biotechnology Letters* 23, 2015–2019.
- Fernández, M., Linares, D.M., Rodríguez, A., Alvarez, M.A., 2007. Factors affecting tyramine production in *Enterococcus durans* IPLA 655. *Applied Microbiology and Biotechnology* 73, 1400–1406.
- Fox, P.F., Guinee, T.P., Cogan, T.M., McSweeney, P.L.H., 2000. *Fundamentals of Cheese Science*. Aspen Publication, Gaithersburg, pp. 638.
- Gardini, F., Martuscelli, M., Caruso, M.C., Galgano, F., Cnudele, M.A., Favati, F., Guerzoni, M.E., Suzzi, G., 2001. Effects of pH, temperature and NaCl concentration on the growth kinetics, proteolytic activity and biogenic amine production of *Enterococcus faecalis*. *International Journal of Food Microbiology* 64, 105–117.
- Gardini, F., Zaccarelli, A., Belletti, N., Faustini, F., Cavazza, A., Martuscelli, M., Mastrocola, D., Suzzi, G., 2005. Factors influencing biogenic amine production by a strain of *Enterococcus oeni* in a model system. *Food Control* 16, 609–616.
- Greif, G., Greifová, M., Karovičová, J., 1997. Tvorba kadaverínu a amoniaku činnosťou niektorých baktérií za modelových podmienok. *Czech Journal of Food Sciences* 16, 53–56 (in Slovak).
- Greif, G., Greifová, M., Dvoran, J., Karovičová, J., Buchtová, V., 1998. Štúdium rastu a produkcie biogénnych aminov nektorými mikroorganizmami za modelových podmienok. *Czech Journal of Food Sciences* 17, 15–21 (in Slovak).
- Greif, G., Greifová, M., Karovičová, J., 2006. Effects of NaCl concentration and initial pH value on biogenic amine formation dynamics by *Enterobacter* spp. bacteria in model conditions. *Journal of Food and Nutrition Research* 45, 21–29.
- Halász, A., Baráth, Á., Simon-Sarkadi, L., Holzapfel, W., 1994. Biogenic amines and their production by microorganisms in food. *Trends in Food Science and Technology* 5, 42–49.
- Landete, J.M., Ferrer, S., Pardo, I., 2007. Biogenic amine production by lactic acid bacteria, acetic bacteria and yeast isolated from wine. *Food Control* 18, 1569–1574.
- Marcobal, A., de las Rivas, B., Muñoz, R., 2006. First genetic characterization of a bacterial β -phenylethylamine biosynthetic enzyme in *Enterococcus faecium* RM58. *FEMS Microbiology Letters* 258, 144–149.
- Molenaar, D., Bosscher, J.S., ten Brink, B., Driessen, A.J.M., Konings, W.N., 1993. Generation of a proton motive force by histidine decarboxylation and electrogenic histidine/histamine antiport in *Lactobacillus buchneri*. *Journal of Bacteriology* 175, 2864–2870.
- Pereira, C.I., Matos, D., San Romão, M.V., Crespo, M.T.B., 2009. Dual role for the tyrosine decarboxylation pathway in *Enterococcus faecium* E17: response to an acid challenge and generation of a proton motive force. *Applied and Environmental Microbiology* 75, 345–352.
- Roig-Sagués, A.X., Hernández-Herrero, M.M., López-Sabater, E.I., Rodríguez-Jerez, J.J., Mora-Ventura, M.T., 1997. Evaluation of three decarboxylating agar media to detect histamine and tyramine-producing bacteria in ripened sausages. *Letters in Applied Microbiology* 25, 309–312.
- Santos, W.C., Souza, M.R., Cerqueira, M.M.O.P., Glória, M.B.A., 2003. Bioactive amine formation in milk by *Lactococcus* in the presence or not of rennet and NaCl at 20 and 32 °C. *Food Chemistry* 81, 595–606.
- Zwietering, M.H., Jongenburger, I., Rombouts, F.M., van't Riet, K., 1990. Modeling of the bacterial growth curve. *Applied and Environmental Microbiology* 56, 1875–1881.