

10. Pérez, G., Cardell, E., Zárate, V.: Protein fingerprinting as a complementary analysis to classical phenotyping for the identification of lactic acid bacteria from Tenerife cheese. *Lait* 80 (2000) 589-600.
11. Rittich B., Španová A., Horák D., Beneš M. J., Klesnilová L., Petrová K., Rybníkář A.: Isolation of microbial DNA by newly designed magnetic particles. *Colloid.Surf. B.- Interfaces*. 52 (2006) 143-148.
12. Rittich B., Španová A., Dráb V., Havlíková Š.: Korelace mezi fenotypovými a molekulárně genetickými metodami identifikace bakterií mléčného kvašení. *Mlékařské listy -Zpravodaj* 111 (2008) 34-37.
13. Roy D., Sirois S.: Molecular differentiation of *Bifidobacterium* species with amplified ribosomal DNA restriction analysis and alignment of short regions of the *ldh* gene. *FEMS Microbiol. Lett.* 191 (2000) 17-24.
14. Sambrook J., Russell D.W.: *Molecular Cloning*, 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2001.
15. Tilsala-Timisjarvi A., Alatossava T.: Development of oligonucleotide primers from the 16S-23S rRNA intergenic sequences for identifying different dairy and probiotic lactic acid bacteria by PCR. *Int. J. Food Microbiol.* 35 (1997) 49-56.
16. Walter J., Tannock G.W., Tilsala-Timisjarvi A., Rodtong S., Loach D.M., Munro K., Alatossava T.: Detection and identification of gastrointestinal *Lactobacillus* species by using denaturing gradient gel electrophoresis and species-specific PCR primers. *Appl. Environ. Microbiol.* 66 (2000) 297-303.
17. Ward L.J.H., Timmins M.J.: Differentiation of *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* and *Lactobacillus rhamnosus* by polymerase chain reaction. *Lett. Appl. Microbiol.* 29 (1999) 90-92.
18. Wilson I.G.: Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Appl. Environ. Microbiol.* 63 (1997) 3741-3751.

Přijato do tisku 31. 7. 2009

Lektorováno 13. 8. 2009

VÝSKYT MIKROORGANISMŮ S DEKARBOXYLÁZOVOU AKTIVITOU V SÝRECH

V. Černý¹, E. Kvasničková¹, Š. Havlíková², L. Kalhotka³

¹ MILCOM a.s., Výzkumný ústav mlékárenský, Soběslavská 841, 390 02 Tábor

² Výzkumný ústav mlékárenský s.r.o., Soběslavská 841, 390 02 Tábor

³ Ústav agrochemie, půdoznalství, mikrobiologie a výživy rostlin, Agronomická fakulta, MZLU v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno

Occurrence of microorganisms with decarboxylase activity in cheeses

Souhrn

Zdravotní nezávadnost a jakost potravin může být ovlivněna i biogenními aminy, produkty některých mikroorganismů přítomných v sýrech. Tato práce byla zaměřena na vytvoření souboru izolátů mikroorganismů ze sýrů schopných tvořit biogenní aminy. Na izolaci byla použita řada vzorků různých druhů sýrů domácí i zahraniční výroby. Pro orientační stanovení dekarboxylázové aktivity u jednotlivě získaných izolátů byla použita plotnová a zkumavková kulturační metoda za použití MDA bujónu a MDA agaru.

U obou uvedených živných medií se dekarboxylázová aktivita projevuje barevnou reakcí provázející změnu pH. Celkem bylo získáno více jak 70 izolátů s pozitivní reakcí. Soubor izolátů byl dále zúžen na 48 izolátů, u kterých budou provedena další stanovení a případně použita pro další práce.

Summary

Health safety and food quality can be affected by biogenic amines, the products of some microorganisms in cheeses. This work was oriented on creating of isolates collection of microorganisms from cheeses able to produce biogenic amines. The range of various kinds cheeses samples of national or foreign production were used for isolation. Determination of decarboxylase activity by separated isolates plated method and tube cultivated method using MDA bujon and MDA agar were used for orientation. Decarboxylated activity of both mentioned cultivated media demonstrates in color reaction accompanying pH changes. More than 70 isolates with positive reaction were obtained in total. The collection of isolates was further reduced on 48 isolates, for next determinations and study.

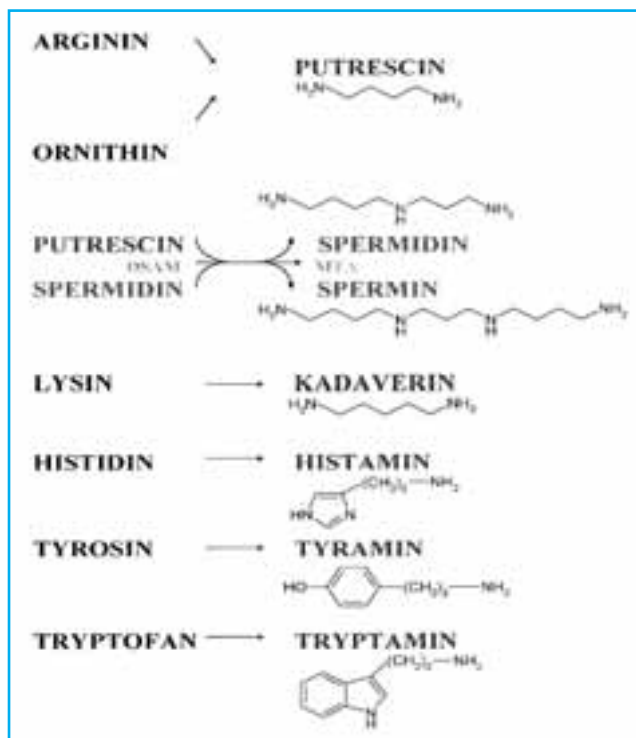
Klíčová slova: biogenní aminy, dekarboxylace, sýry, dekarboxylázopozitivní mikroorganismy, kulturační metody

Úvod

Záměrem naší práce bylo prozkoumat výskyt bakteriálních kontaminantů sýrů různých typů ohledně tvorby biogenních aminů, původu těchto kontaminantů a jejich schopnosti přežít výrobní proces a ohrožovat kvalitu zralých sýrů. V minulém roce jsme se zaměřili na to, abychom mikrobiologickými rozbory mlékárenských výrobků, především sýrů, získali soubor izolátů mikroorganismů schopných tvořit biogenní aminy, které bude možno následně využít při řešení dalších plánovaných dílčích cílů tohoto projektu.

Biogenní aminy představují skupinu aminů, které mají významné fyziologické a farmakologické účinky. Vznikají v buňkách enzymovou dekarboxylací aminokyselin (řada enzymů ze skupiny EC 4.1.1.). Tyto enzymy jsou rozdílné pro různé druhy mikroorganismů. Mezi mléčné bakterie, které mohou produkovat dekarboxylázy a podílet se tak na jejich vzniku, patří v mléce např. druhy rodu *Enterococcus*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Photobacterium*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Shigella* a některé bakterie mléčného kvašení *Lactobacillus*, *Pediococcus* a *Streptococcus* nebo i probiotické a startovací kultury (SLÁDKOVÁ a kol., 2007). Biogenní aminy, z nich nejznámější histamin, tyramin, putrescin a kadaverin, byly studovány zejména pro svou toxicitu. V současné době se však biogenní aminy dostávají do popředí zájmu i co se týče hygieny potravin, jelikož relativně vysoké hodnoty obsahu některých biogenních aminů mohou sloužit i jako

indikátor zhoršení procesu či nedodržení předepsaného technologického postupu výroby (VIDAL-CAROU a kol.,1990). Základní schéma tvorby vybraných biogenních aminů (KŘÍŽEK,1998) je uvedeno na obrázku č.1.



Obr. 1 Základní schéma tvorby vybraných biogenních aminů

Výskyt biogenních aminů v syrovém mléce je velmi sporadický (NOVELLA-RODRIGUEZ a kol., 2002; BARDÓCZ, 1993). Následné zvýšení jejich obsahu je spojeno především se zrácím procesem při výrobě sýrů, v nichž se z mléčných výrobků nacházejí nejčastěji. Udává se až 1g/kg. V sýrech z kravského, kozího i ovčího mléka se vyskytují hlavně histamin, tyramin, putrescin, kadaverin, spermin, spermidin a tryptamin (KOMPRDA a kol., 2007; BURDYCHOVÁ a KOMPRDA, 2007; KOMPRDA a kol., 2005; NOVELLA-RODRIGUEZ a kol., 2002). Pro histamin je toxická dávka 70 až 100 mg/kg, pro tyramin 20 až 80 mg/kg. Celkový obsah tyraminu, putrescinu, kadaverinu a histaminu by neměl překročit v dané potravíně 900 mg/kg (KOMPRDA, 2005). V současné době však není legislativně stanoven limit pro obsah biogenních aminů v sýrech, kromě tyraminu, kde je pro sýry stanoven limit zákonem o potravinách 200 mg/kg sýra. Tvorba biogenních aminů v sýrech závisí na obsahu aminokyselin a peptidů v mléce, na přítomnosti bakterií schopných dekarboxylace, na pH, koncentraci soli (např. nad 3,5%), aktivitě vody, použité technologii (např. zařazení pasterace), době zrání a skladování, množství mikroorganismů a přítomnosti kofaktorů jako např. pyridoxalfosfát. Podmínkou vzniku toxického množství biogenních aminů v sýrech je proteolýza, která je při zrání sýrů považována za jeden z nejdůležitějších pochodů ovlivňujících kvalitu sýra. Na

proteolýze mléčných bílkovin se podílejí nativní proteázy z mléka, proteázy kyslíkových kultur, syřidlové enzymy a proteázy kontaminující mikroflóry.

Materiál a metody

- vzorky domácích i zahraničních sýrů těchto druhů - ementál, eidam, gouda, moravský blok, sýry s bílou plísní na povrchu, sýry zrající pod mazem
- živné půdy: MRS 5,7(MERCK 1.10660)
- MRS 5,2 (MERCK 1.10660)- úprava pH 1,0 M HCl
- KEA (Oxoid č. CM591)
- STA (Milcom a.s.)
- GTK-M (Milcom a.s.)
- FHN (Milcom a.s.) + přídavek 0,5 ml vancomycinu (10mg/ml) a 0,5 ml kyseliny nalidixové (8mg/ml 1% NaOH)
- MDA (Milcom a.s.) - trypton 0,5%, kvasničný extrakt 0,5%, masový extrakt (Lab lemco) 0,5%, NaCl 0,25%, glukosa 0,05%, tween 80 0,1%, MgSO₄ 0,02%, MnSO₄ 0,005%, FeSO₄ 0,004%, citrát amonný 0,2%, thiamin 0,001%, K₂PO₄ 0,2%, CaCO₃ 0,01%, pyridoxal-5-phosphate 0,005%, suma AK jako prekurzorů BA 1%, bromcresol purple 0,006%, agar 2%

- MDA bujón (Milcom a.s.)

Metodický postup izolace, identifikace a výběru mikroorganismů schopných produkovat biogenní aminy použitý na pracovišti VÚM v Táboře lze definovat jako soubor osmi na sebe navazujících kroků:

1. výběr surovin, ze kterých budou dekarboxylázopozitivní kmeny izolovány
2. předkultivace a získání jednotlivých izolátů vybraných skupin mikroorganismů rostoucích na půdách MRS(5,7), GTK-M, STA, KEA, MRS(5,2) a FHN s jejich následným přečištěním
3. kultivace a hodnocení jednotlivých izolátů s použitím MDA bujónu či MDA agaru
4. výběr izolátů pro další práce
5. stanovení dekarboxylázových aktivit
6. stanovení produkce biogenních aminů v modelových podmínkách
7. identifikace izolátů do rodu a druhu
8. sestavení souboru izolátů určených k další práci v rámci řešení dalších dílčích cílů projektu

Pro izolace dekarboxylázopozitivních mikroorganismů byla použita řada různých druhů sýrů od tuzemských i zahraničních výrobců. Ze sýrů byly vzorky k mikrobiologickým rozborům odebírány ze středové, krajové a dle možnosti i z povrchové mazové vrstvy sýra. K mikrobiologickým kultivacím byly použity živné půdy MRS(5,7) a MRS(5,2) (MERCK), KEA (OXOID) a GTK-M, STA a FHN (Milcom a.s.). Z nakultivovaných misek s jednotlivými živnými půdami byly odebírány typické kolonie

a dalším přeočkováním a přečištěním byly získány jednotlivé izoláty z hmoty testovaných sýrů i z povrchových vrstev těchto sýrů. U jednotlivých izolátů byla pro orientační stanovení dekarboxylázové aktivity a tvorbu aminů použita jedna z v literatuře popisovaných živných půd (MDA agar) podle Bover-Cid et al. Plotnová kultivační metoda je zde založena na barevné reakci provázející změnu pH a případně i tvorbě čiré zóny kolem kolonie v živné půdě zakalené v důsledku přebytku směsi aminokyselin. Zkumavkovou metodou za použití MDA bujónu se dekarboxylázová aktivita projevuje stejně barevnou reakcí a případně úbytkem či úplným vymizením sedimentu způsobeného dekarboxylací nadbytku aminokyselin obsažených v bujónu.

Soubor izolátů s pozitivní dekarboxylázovou aktivitou byl následně zúžen a vytvořen soubor izolátů, které by byly identifikovány do rodu a druhu, u kterých by mohla být byla určena přítomnost genů odpovědných za produkci některých významných dekarboxyláz a také stanovena schopnost skutečné tvorby biogenních aminů za optimálních kultivačních podmínek.

Výsledky a diskuze

Celkem bylo získáno více jak 100 jednotlivých izolátů z těchto druhů tuzemských i zahraničních sýrů: Luzerner Rahmkäse, ementál Kaltbach, Gruyer Kaltbach, Gouda Winzer, Swiss Alp panorama, Weiss Alp belevue, Fuego, Blaťácké zlato, Romadur, Jarošovský pivní sýr, moravský blok, eidamská cihla, Hermelín, Archivní sýr, olomoucké tvarůžky, sýr Danisgold zrající pod mazem a Danisch Weichkäse Blauschimmel.

Následně byla u celé skupiny získaných izolátů orientačně stanovena dekarboxylázová aktivita a tvorba aminů za použití MDA bujónu a MDA agaru. Tato plotnová metoda ukázala dobrou korelaci s chemickým rozбором a kvůli její jednoduchosti je v literatuře uváděna jako vhodná a citlivá metoda pro zkoušení produkce biogenních aminů kmeny LAB i dalšími mikroorganismy. Celkem bylo v předcházejícím roce získáno více jak 70 izolátů ze sýrů, které vykazaly pozitivní reakci vytvořením barevné zóny kolem kolonií. Izoláty byly uloženy k dalšímu testování.

Posledním krokem provedeným v této etapě řešení byl další výběr a vytvoření souboru 48 izolátů, který byl odeslán na identifikaci do ČSM Brno, na MZLU k identifikaci genů odpovědných za produkci dekarboxyláz a na SVÚ Jihlava ke stanovení obsahu jednotlivých biogenních aminů.

Výsledky těchto rozborů byly získány v průběhu prvního čtvrtletí 2009 a v současné době jsou podrobně vyhodnocovány. Na základě vyhodnocení získaných výsledků bude vytvořen pracovní soubor izolátů, který bude možno dále rozšířit či zúžit a následně využít pro řešení dalších dílčích cílů projektu.

Poděkování

Tato práce byla vytvořena za podpory grantu MŠMT 2B08069 a VZ MSM 2672286101.

Literatura:

- BARDOČZ, S. (1993). The role of dietary polyamines. *Eur. J. Clin. Nutr.*, 47: 683-690. ISSN 0954-3007.
- BOVER-CID, S.; HOLZAPFEL, W.H. (1999). Improved screening procedure for biogenic amine production by lactic acid bacteria. *Int. J. of Food Microbiology* 53: 33-41
- BURDYCHOVÁ, R.; KOMPRDA, T. (2007). Biogenic amine-forming microbial communities in cheese. *FEMS Microbiology Letters*. 276 (2): 149-155. ISSN 0378-1097.
- KOMPRDA, T. (2005). Biogenní aminy a polyamidy ve fermentovaných potravinách živočišného původu. *Veterinářství*, 10: 646-650.
- KOMPRDA, T.; NOVICKÁ, K.; KALHOTKA, L.; SMĚLÁ, D. (2005). Biogenic amine content in sterilised and pasteurised long-term stored processed cheese. *Czech Journal of Food Sciences - Potravinářské vědy*. 23 (5): 209-216. ISSN 1212-1800. KOMPRDA, T.; SMĚLÁ, D.; NOVICKÁ, K.; KALHOTKA, L.; ŠUSTOVÁ, K.; PECHOVÁ, P. (2007). Content and distribution of biogenic amines in Dutch-type hard cheese. *Food Chemistry*, 102: 129-137. ISSN 0308-8146.
- KŘÍŽEK, M.; KALAČ, P. (1998). Biogenní aminy v potravinách a jejich role ve výživě. *Czech J. of Food Sci.* 16, č.4: 151-159.
- NOVELLA-RODRIGUEZ, S.; VECIANA-NOGUÉS, M. T.; ROIG-SAGUÉS, TRUJILLO-MESA, A. J.; VIDAL-CAROU, M. C. (2002). Influence of Starter and Nonstarter on the Formation of Biogenic Amine in goat Cheese During Ripening. *Journal of Dairy Science*. Vol. 85 (10): 2471-2478. ISSN 1525-3198.
- SLÁDKOVÁ, P.; KOMPRDA, T.; BURDYCHOVÁ, R. (2007). Skrining startovacích a probiotických kultur určených pro výrobu fermentovaných masných výrobků na schopnost tvorby biogenních aminů. In *MendeNet'07 Agro*. MZLU v Brně: MZLU v Brně, 2007: 96. ISBN 978-80-7375-119-7.
- VIDAL-CAROU, M.; IZQUIERDO-PULINO, M.; MARTIN-MORRO, M. and MARINÉ-FONT, A. (1990). Histamine and tyramine in meat products: relationship with meat spoilage. *Food Chem.* 37: 239-249.
- Zákon č.110/1997 Sb., o potravinách a tabákových výrobcích v platném znění

Přijato do tisku 10. 7. 2009

Lektorováno 29. 7. 2009

KONTROLA A MONITOROVÁNÍ ÚROVNĚ A ÚČINNOSTI SANITACE V MLÉKÁRENSKÝCH PROVOZECH

Kunová G.¹, Pechačová M.¹, Peroutková J.¹, Roubal P.¹, Jaglič Z.², Pazlarová J.³

¹ - MILCOM a.s., Praha

² - Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v. v. i., Brno

³ - Vysoká škola chemicko-technologická, Praha

Control and monitoring the level and effectiveness of sanitation in dairy industries

Abstrakt

V rámci kontroly úrovně a účinnosti sanitace výrobních celků byly vybrány některé rizikové technologie, kde byly testovány různé metody detekce mikroorganismů na povrchích a odzkoušeny některé z tzv. nepřímých rychlých kontrolních metod dostupných na našem trhu, a to: přístroj **HY-LITE®** na měření adenosin trifosfátu (ATP); test