

DEKARBOXYLASOVÁ AKTIVITA *BACILLUS LICHENIFORMIS* A JEJÍ OVLIVNĚNÍ TEPLOTOU A DOBOU KULTIVACE

Libor Kalhotka¹, Michaela Němcová¹,
Marcela Vyletělová², Šárka Havlíková³

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

² Výzkumný ústav pro chov skotu, srov.o.o a Agrovýzkum
Rapotín s.r.o., Rapotín, Výzkumníků 267, 788 13
Vikýřovice

³ Milcom a.s. - VÚM, Soběslavská 841, 390 02 Tábor

Decarboxylase activity of *Bacillus licheniformis* and her influenced by temperature and duration of cultivation

Abstrakt

Působením bakteriálních dekarboxylas na volné aminokyseliny vznikají biogenní aminy. Biogenní aminy jsou nízkomolekulární dusíkaté báze významné v nízkých koncentracích pro fyziologické procesy ve všech živých organismech. V nadlimitních koncentracích však mohou mít na lidský organismus negativní vliv. Cílem práce bylo charakterizovat dekarboxylasovou aktivitu *Bacillus licheniformis* izolovaného ze vzorků mléka. Mikroorganismy byly inokulovány do zkumavek s diagnostickým médiem. Testovány byly tyto aminokyseliny: arginin, lysin, ornithin, phenylalanin, histidin, tyrosin a tryptofan při teplotách 6, 25, 30 a 37 °C. Inkubace mikroorganismů probíhala po dobu 10 dnů, přičemž každý den byly vizuálně zjišťovány výsledky jejich dekarboxylasové aktivity pomocí barevné reakce. Všechny testované mikroorganismy vykázaly pozitivní dekarboxylasovou aktivitu s tyrosinem, která byla regulována teplotou a ovlivněna dobou kultivace.

Klíčová slova: *Bacillus licheniformis*, dekarboxylasová aktivita

Abstract

The activity of decarboxylase with amino-acids leads to the formation of biogenic amines. Biogenic amines, i.e. nitrogenous low-molecular organic bases are important in low concentration for physiological processes in all live organisms. However, they may have toxicological effects on humans when consumed in food in high amounts. The purpose of our experiments was to determine decarboxylase activity (DA) of *Bacillus licheniformis* isolated from milk. Microorganisms were inoculated in test-tubes with diagnostic medium. Tested

amino-acids were arginine, lysine, ornithine, phenylalanine, histidine, tyrosine, tryptophane at the temperature of 6, 25, 30 a 37 °C. Incubation of microorganisms was carried out of 10 days and each day the results of the decarboxylase activity were visually detected using the color reaction. All of tested microorganisms showed significant activity of decarboxylase with tyrosine which was regulated by temperature and influenced by duration of cultivation.

Key words: *Bacillus licheniformis*, decarboxylase activity

Úvod

Působením dekarboxylas na volné aminokyseliny vznikají biogenní aminy. Biogenní aminy jsou přítomny ve všech živých organismech a jsou pro organismus nepostradatelné. V nadlimitních koncentracích však mohou mít na organismus negativní vliv. V potravinách a krmivech představují biogenní aminy jedny z nežádoucích zplodin konečného rozkladu bílkovin. Z hlediska potravin a výživy je rozhodující cestou vzniku biogenních aminů dekarboxylace přirozených aminokyselin působením enzymů některých bakterií. Mezi bakterie, které se mohou vyskytnout v mléce a mléčných výrobcích, mohou produkovat dekarboxylasy a podílet se tak na jejich vzniku, patří např. druhy rodu *Bacillus*, *Citrobacter*, *Clostridium*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Shigella*, *Salmonella*, *Lactobacillus*, *Streptococcus* a *Enterococcus*.¹

Dekarboxylace je děj, kdy se odbourává karboxylová skupina - COOH a vytváří se oxid uhličitý, účinný enzym se pak nazývá dekarboxylasa.² Tvorba biogenních aminů je složitý proces závislý na mnoha faktorech, jejichž identifikace je obtížná.³ Vznik a množství biogenních aminů v potravinách nebo potravinářských surovinách lze tedy ovlivnit omezením bakteriálního růstu nebo inhibicí aktivity příslušných enzymů působením řady faktorů. K nejvýznamnějším patří teplota, aktivita vody, pH, doba skladování, obsah solí, redox potenciál. Teplota prostředí významně ovlivňuje enzymatickou aktivitu mikroorganismů a tím samozřejmě i vznik biogenních aminů. Obecně platí, že produkce biogenních aminů je úměrná teplotě a době skladování. Teplota skladování může ovlivnit obsah biogenních aminů v potravinách.⁴

Bacillus licheniformis je fakultativně anaerobní, Gram-pozitivní, pohyblivá, sporující tyčinka 0,6-0,8 x 1,5-3,0 μm velká, vyskytující se jednotlivě v párech nebo řetězcích. Teplota růstu se pohybuje v rozmezí od 15 °C do 50-55 °C (u izolátů z geotermálního prostředí až 68 °C). Optimální pH růstu je mezi 5,7 až 6,8. Roste i při 7 % NaCl. Je obvykle arginindihydrolasa pozitivní, fenylalanin nedeaminuje, lysin ani ornithin nedekarboxyluje.⁵ *B. licheniformis* patří mezi bacily s menší proteolytickou aktivitou.⁶ Spolu s *B. cereus*, *B. subtilis* a dalšími druhy je *B. licheniformis* častým kontaminantem syrového i tepelně ošetřeného mléka a mléčných výrobků.^{7,8} *B. licheniformis* může být původcem enterotoxikosa a septických stavů.⁹ Průmyslově může být využit k produkci antibiotik.¹⁰

Stanovení dekarboxylasové aktivity mikroorganismů lze provádět různými způsoby. V průběhu času byla k tomuto účelu vytvořena řada postupů a médií. Jde o poměrně jednoduché metody využívající ke stanovení tvorby biogenních aminů média obsahující pH indikátor např. bromkresolpurpur.^{11,12,13} Při dekarboxylaci aminokyselin odštěpí příslušná dekarboxylasa z karboxylové skupiny aminokyseliny CO₂ za vzniku alkalického aminu a pozitivní výsledek se projeví změnou zbarvení indikátoru, což je způsobeno změnou pH.¹⁴ Rychlé screeningové metody mohou být omezené citlivostí v detekci produkce biogenních aminů, která vede k protikladným výsledkům. Nezanedbatelná je přítomnost falešně pozitivních a falešně negativních kmenů. Z těchto důvodů musí být produkce biogenních aminů potvrzena analytickými kvantitativními metodami. Navíc záporné nebo pozitivní odpovědi ve screeningových médiích nutně neznamenají podobné chování v potravinách.¹³ I přes zřejmé nevýhody je metoda testování dekarboxylasové aktivity pomocí barevných změn vhodná pro relativně rychlé a levné zjištění schopnosti mikroorganismů tvořit biogenní aminy.

Cílem práce bylo charakterizovat dekarboxylasovou aktivitu u *Bacillus licheniformis* izolovaných z mléka.

Materiál a metody

Princip: při dekarboxylaci aminokyseliny obsažené v diagnostickém médiu odštěpí příslušná dekarboxylasa z karboxylové skupiny aminokyseliny CO₂ za vzniku alkalického aminu. Pozitivní výsledek se pak projeví změnou zbarvení indikátoru způsobené změnou pH.

Postup: pro izolaci *B. licheniformis* byl použit MYP Agar doplněný Egg Yolk emulzí a Polymyxin B sulfatem (HiMedia). Kultivace probíhala při 30 °C. Izolované kolonie byly vyočkovány na PCA with skimmed milk (Biokar Diagnostics) a inkubovány při 30 °C 24 hodin. Sterilní zkumavky 80 x 10 mm byly plněny 1 ml diagnostické půdy¹⁴, zality 0,5 ml parafinového oleje a sterilizovány 15 min. při 121 °C. Do takto připravených zkumavek byla očkovací kličkou inokulována 24 hodinová mikrobiální kultura. Testováno bylo 20 izolátů *B. licheniformis* získaných z mléka z Výzkumného ústavu pro chov skotu, s.r.o., Rapotín (viz Tab. 1). Inkubace zkumavek probíhala při 6, 25, 30 a 37 °C po dobu 10 dnů, v jejichž průběhu byly hodnoceny barevné změny v důsledku tvorby alkalického aminu. Pro testování bylo použito 7 aminokyselin: lysin (LYS), arginin (ARG), ornithin (ORN), fenylalanin (PHE), histidin (HIS), tyrosin (TYR) a tryptofan (TRP).

Výsledky a diskuse

V průběhu 10 dnů bylo při teplotách 6, 25, 30 a 37 °C testováno 20 izolátů *Bacillus licheniformis* získaných z mléka (viz Tab.1). Po 10 dnech inkubace byly zjištěny následující výsledky (Tab. 2, 3, 4). Kultivací při 6 °C nebyla ani u jednoho z testovaných izolátů zjištěna dekarboxy-

Tab. 1 Testované izoláty

| izolát č. | č. Rapotín | izolace | měsíc | původ | druh bakterie |
|-----------|------------|---------|--------|------------------------|-------------------------|
| 1BI | 296 | mléko | květen | Trnov kravín | <i>B. licheniformis</i> |
| 2BI | 299 | mléko | květen | Rychlý Pavel | <i>B. licheniformis</i> |
| 3BI | 300 | mléko | květen | Újezd dojrna I | <i>B. licheniformis</i> |
| 4BI | 306 | mléko | květen | cisterna Bohemilk | <i>B. licheniformis</i> |
| 5BI | 311 | mléko | květen | Bureš Jan Pisty | <i>B. licheniformis</i> |
| 6BI | 313 | mléko | květen | Medvědice | <i>B. licheniformis</i> |
| 7BI | 314 | mléko | květen | firma Klapý | <i>B. licheniformis</i> |
| 8BI | 315 | mléko | květen | Brejcha Václav | <i>B. licheniformis</i> |
| 9BI | 316 | mléko | květen | linka 2 | <i>B. licheniformis</i> |
| 10BI | 318 | mléko | květen | linka 4 | <i>B. licheniformis</i> |
| 11BI | 320 | mléko | květen | Přemysl Brodský | <i>B. licheniformis</i> |
| 12BI | 326 | mléko | květen | Šedivec II | <i>B. licheniformis</i> |
| 13BI | 327 | mléko | květen | kravín Dolní Sloupnice | <i>B. licheniformis</i> |
| 14BI | 334 | mléko | květen | Opatovec | <i>B. licheniformis</i> |
| 15BI | 335 | mléko | květen | cisterna 9 | <i>B. licheniformis</i> |
| 16BI | 346 | mléko | květen | cisterna 2 | <i>B. licheniformis</i> |
| 17BI | 353 | mléko | květen | Hostice II | <i>B. licheniformis</i> |
| 18BI | 354 | mléko | květen | Hostice IV | <i>B. licheniformis</i> |
| 19BI | 355 | mléko | květen | Ing. Divišová Blažena | <i>B. licheniformis</i> |
| 20BI | 374 | mléko | květen | Fa. Chlumek | <i>B. licheniformis</i> |

lasová aktivita. S ohledem na možnou produkci biogenních aminů lze tedy tuto teplotu považovat za vyhovující pro uchovávání mléka a mléčných výrobků. Dekarboxylasová aktivita byla prokázána při kultivaci ve 25 °C u 13 izolátů (tyrosin), ve 30 °C u 18 izolátů pro tyrosin, 4 pro ornitin, 2 pro fenylalanin, a 1 pro arginin a ve 37 °C u 20 izolátů pro tyrosin, 6 pro tryptofan, 5 pro ornitin, 4 pro fenylalanin a 1 izolátu pro lysin, přičemž první pozitivní reakce byly zaznamenány již po 48 h kultivace. Z výsledků je zřejmé, že dekarboxylasová aktivita rostla přímo úměrně

Tab. 2 Intenzita reakcí 10. den při 25 °C

| izolát č. | LYS | ARG | ORN | PHE | HIS | TYR | TRP |
|-----------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 1BI | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| 2BI | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| 3BI | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| 4BI | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| 5BI | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 |
| 6BI | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| 7BI | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2,5 | 0 |
| 8BI | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1,5 | 0 |
| 9BI | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 |
| 10BI | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 |
| 11BI | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| 12BI | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1,5 | 0 |
| 13BI | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0,5 | 0 |
| 14BI | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 15BI | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 16BI | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 17BI | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 18BI | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 19BI | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 20BI | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

Vysvětlivky: LYS - lysin, ARG - arginin, ORN - ornithin, PHE - fenylalanin, HIS - histidin, TYR - tyrosin, TRP - tryptofan, 0 - 3 intenzita reakce

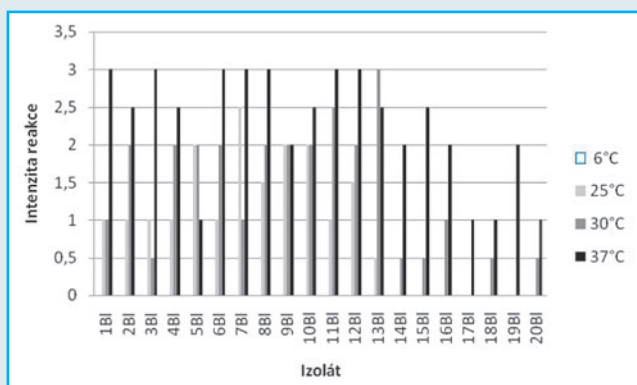
Tab. 3 Intenzita reakcí 10. den při 30 °C

| izolát č. | LYS | ARG | ORN | PHE | HIS | TYR | TRP |
|-----------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 1BI | 0 | 0 | 0,5 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| 2BI | 0 | 0 | 0 | 0,5 | 0 | 2 | 0 |
| 3BI | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0,5 | 0 |
| 4BI | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 |
| 5BI | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 |
| 6BI | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 |
| 7BI | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| 8BI | 0 | 1 | 0,5 | 0 | 0 | 2 | 0 |
| 9BI | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 |
| 10BI | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 2 | 0 |
| 11BI | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2,5 | 0 |
| 12BI | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 |
| 13BI | 0 | 0 | 0,5 | 0,5 | 0 | 3 | 0 |
| 14BI | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0,5 | 0 |
| 15BI | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0,5 | 0 |
| 16BI | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| 17BI | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 18BI | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0,5 | 0 |
| 19BI | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 20BI | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0,5 | 0 |

Vysvětlivky: LYS - lysin, ARG - arginin, ORN - ornithin, PHE - fenylalanin, HIS - histidin, TYR - tyrosin, TRP - tryptofan, 0 - 3 intenzita reakce

s růstem teploty kultivace. Kupříkladu *Bacillus macerans* izolovaný z italského sýra byl schopen produkovat histamin při 43, 37, 30, 22 a 4 °C, ale nejvyšší produkce bylo dosaženo při maximálním růstu bakterií za 30 °C.¹⁵ V modelovém případě při skladování trvanlivého polotučného mléka ve 4 °C nebyla u *B. licheniformis* zaznamenána proteolýza, při skladování ve 24 °C byl po třech týdnech zjištěn pokles obsahu bílkovin a zvýšení množství volného tyrosinu.¹⁶ Zvětšující se počet izolátů *B. licheniformis* vykazující dekarboxylasovou aktivitu tedy odpovídá teplotním nárokům. Ze sedmi testovaných aminokyselin bylo nejvíce pozitivních reakcí zjištěno u tyrosinu. 10. den kultivace byla dekarboxylasová aktivita pro tuto aminokyselinu zjištěna u 13 izolátů kultivovaných při 25 °C, 18 izolátů při 30 °C a 20 izolátů při 37 °C, při této teplotě byly reakce až na výjimky nejintenzivnější (Obr. 1). První pozitivní reakce u některých izolátů byly zjištěny již po 48 h kultivace. Intenzita reakcí se s dobou kultivace zvyšovala jak je patrné například u izolátu 11BI (Obr. 2).

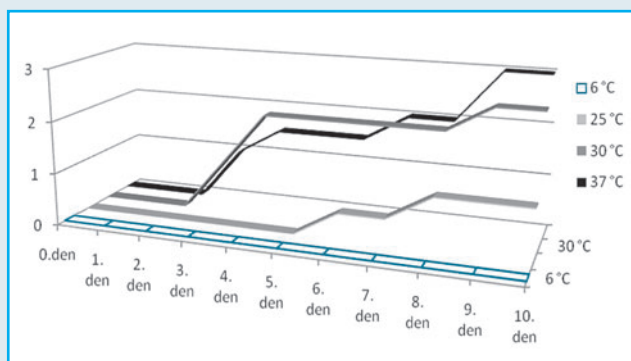
Obr. 1 Intenzita reakcí dekarboxylace tyrosinu 10. den při teplotách 6, 25, 30 a 37 °C



Tab. 4 Intenzita reakcí 10. den při 37 °C

| izolát č. | LYS | ARG | ORN | PHE | HIS | TYR | TRP |
|-----------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 1BI | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | 0 |
| 2BI | 0 | 0 | 0,5 | 0 | 0 | 2,5 | 0 |
| 3BI | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | 0 |
| 4BI | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2,5 | 0 |
| 5BI | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| 6BI | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | 0 |
| 7BI | 0 | 0 | 3 | 1 | 0 | 3 | 0 |
| 8BI | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 3 | 0 |
| 9BI | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 |
| 10BI | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2,5 | 0 |
| 11BI | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | 0 |
| 12BI | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | 0 |
| 13BI | 1 | 0 | 1 | 0,5 | 0 | 2,5 | 0,5 |
| 14BI | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 |
| 15BI | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2,5 | 1 |
| 16BI | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 3 |
| 17BI | 0 | 0 | 0,5 | 1 | 0 | 1 | 2 |
| 18BI | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| 19BI | 0 | 0 | 0 | 1,5 | 0 | 2 | 2 |
| 20BI | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 2 |

Obr. 2 Průběh dekarboxylace tyrosinu u izolátu 11BI



Decarboxylasová aktivita byla dále zjištěna u tryptofanu, ale pouze u 6 izolátů kultivovaných při 37 °C. Schopnost dekarboxylovat aminokyseliny byla zjištěna rovněž u několika málo izolátů pro fenylalanin (6) a ornithin (9) - kultivace při 30 a 37 °C, jedna slabá pozitivní reakce pro arginin byla zjištěna u izolátu 8BI (při 30 °C) a u izolátu 13BI pro lysin (při 37 °C). Protože *B. licheniformis* lysin ani ornithin nedekarboxyluje⁵, může se v případech, kdy byla u těchto aminokyselin zaznamenána pozitivní reakce jednat o reakce falešně pozitivní, které se mohou někdy vyskytnout.¹³ Ve většině námi zjištěných případů šlo o slabé reakce. U histidinu nebyla dekarboxylasová aktivita zjištěna u žádného izolátu. Podobné výsledky byly rovněž zjištěny u 7 testovaných izolátů *Bacillus licheniformis*.¹⁷ Teplota prostředí tedy významně ovlivňuje enzymatickou aktivitu mikroorganismů a tím samozřejmě i vznik biogenních aminů. Obecně platí, že produkce biogenních aminů je úměrná teplotě a době skladování.

Z výsledků testování vyplývá, že pokud by mléko nebo mléčné výrobky byly kontaminovány testovanými izoláty *B. licheniformis*, mohly by se tyto bakterie podílet na tvor-

bě biogenních aminů a to především na tvorbě tyraminu. Koncentrace biogenních aminů včetně tyraminu nebývají v čerstvém mléce a nefermentovaných mléčných výrobcích vysoké (méně jak 1 mg/kg).¹⁸ U sýrů může být naopak množství biogenních aminů, především tyraminu a histaminu, vysoké.^{19, 20}

Závěr

Z výsledků testování lze vyvodit následující závěry. U testovaných izolátů *Bacillus licheniformis* byla prokázána dekarboxylasová aktivita a to především pro tyrosin. Na dekarboxylasovou aktivitu má významný vliv teplota a doba kultivace. Se vzrůstající teplotou a délkou kultivace se dekarboxylasová aktivita a tedy i možná produkce biogenních aminů zvyšuje. Rychlé screeningové metody mohou být omezené citlivostí v detekci produkce biogenních aminů, která vede k protikladným výsledkům. Nezanedbatelná je přítomnost falešně pozitivních a falešně negativních výsledků. Z těchto důvodů by měla být produkce biogenních aminů potvrzena analytickými kvantitativními metodami. Otázkou zůstává, zda se tato laboratorně stanovená aktivita projeví i v podmínkách výroby potravin, kde jsou mikroorganismy ovlivňovány mnoha faktory.

Poděkování

Príspevek vznikl s podporou projektu MŠMT 2B08069 Národní program výzkumu - NPV II, program 2B - Výzkum vztahů mezi vlastnostmi kontaminující mikroflóry a tvorbou biogenních aminů jako rizikových toxikantů v systému hodnocení zdravotní nezávadnosti sýrů na spotřebitelském trhu a výzkumného záměru MSM 2678846201 Uplatnění Evropského modelu multifunkčního zemědělství v LFA oblastech ČR.

Literatura

1. VYLETĚLOVÁ, M., MANGA, I., HANUŠ, O. (2010): Výskyt mikroorganismů s možnou dekarboxylázovou aktivitou u vzorků mléka a sýrů. In ŠUSTOVÁ, K. -- KUCHTÍK, J. -- KALHOTKA, L. -- JŮZL, M. -- FALTA, D. *Farmářská výroba sýrů a kysaných mléčných výrobků*. 1. vyd. Zemědělská 1, 613 00 Brno: Mendelova univerzita v Brně, 2010, s. 35--36. ISBN 978-80-7375-402-0.
2. KALAČ, P., KRÍŽEK, M. (2002): Biogenní aminy a polyaminy v potravinách. *Výživa a potraviny*, č. 1, s. 12-13.
3. BOVER-CID, S., HUGAS, M., IZQUIERDO-PULIDO, M., VIDAL-CAROU, M.C. (2000): Reduction of biogenic amine formation using a negative amino acid-decarboxylase starter culture for fermentation of Fuet sausages. *Journal of Food Protection*, 63, s. 237-243.
4. SILLA SANTOS, M.H. (1996): Biogenic amines: their importance in foods. *Int. J. of Food Sci.* 29, s. 213-231
5. LOGAN, N.A., DE VOS, P.(2009): Genus I Bacillus. In De Vos et al. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Vol. Three The Firmicutes*. Springer 2009, ISBN 978-03-387-95041-9.
6. NĚMEČKOVÁ, I., ROUBAL, P., PECHAČOVÁ, M., UHROVÁ, B., SOLIČHOVÁ, K., PLOCKOVÁ, M. (2010): *Bacillus cereus* a další bacily v mléce - význam pro mlékárenské technologie. Kroměřížské mlékařské dny 2010, Sborník přednášek, Kromilk, a.s., s. 91-95.

7. FRANK, J.P. (2001): Milk and Dairy Products. In Doyle, M.P. et al. *Food Microbiology: fundamentals and frontiers*, ASM Press Washington, DS 2001, ISBN 1-55581-208-2.
8. GRIFFITHS M.W. (2009): Food safety issues and the mikrobiologie of milk and dairy products. In Heredia, N., Wasley, I., García, S. *Microbiologically Safe Foods*, WileyHoboken, New Jersey 2009, ISBN 978-0-470-05333-1.
9. RŮŽIČKA, F. (2003): Grampozitivní sporulující aerobní tyčinky. In Votava, M. a kol. *Lékařská mikrobiologie speciální*. NEPTUN Brno (2003), ISBN: 80-902896-6-5.
10. BEDNÁŘ, M., FRAŇKOVÁ, V., SCHINDLER, J., SOUČEK, A., VÁVRA, J. (1996): *Lékařská mikrobiologie*. Marvil, Praha.
11. MOELLER, V. (1954): Distribution of amino acid decarboxylase in *Enterobacteriaceae*. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* 35, s. 259-277.
12. MAIJALA, R. (1993): Formation of histamine and tyramine by some lactic acid bacteria in MRS-broth and modified decarboxylation agar. *Let. Appl. Microbiol.* 17, s. 40-43.
13. BOVER-CID, S., HOLZAPFEL, W.H. (1999): Improved screening procedure for biogenic amine production by lactic acid bacteria. *Int. J. of Food Microbiology* 53, s. 33-41.
14. BROOKS, K., SODEMAN, T. (1974): A rapid method for determining decarboxylase and dihydrolase activity. *J. Clin. Pathol.* 27, s. 148-152.
15. RODRIGUEZ-JEREZ, J.J., GIACCONE, V., COLAVITA, G., PARISI, E. (1994): *Bacillus macerans* - a new potent histamine producing microorganisms isolated from Italian cheese. *Food Microbiology* 11, s. 409-415.
16. JANŠTOVÁ, B., LUKÁŠOVÁ, J., DRAČKOVÁ, M., VORLOVÁ, L. (2004): Influence of *Bacillus* spp. *Enzymes* on ultra high temperature-treated milk proteins. *Acta Veterinaria*, Brno, vol. 73, s. 393 - 400.
17. DOSEDĚL, L., KALHOTKA, L., VYLETĚLOVÁ, M., NĚMCOVÁ, M. (2009): Vliv teploty a času na dekarboxylázovou aktivitu *Bacillus licheniformis*. [online]. In II. Konference studentské vědecké a odborné činnosti. s. 9. URL: <http://konference2009.ptacisvet.cz/4download/sbornik2009.pdf>.
18. GREIFOVÁ, M., GREIF, G., NOVOROLNÍKOVÁ, B., KUBOVÁ, A. (2003): Biogénne aminy v mléčných výrobcích a ich tvorba enterokokami. *Mliekarstvo*, 4/34, s. 31-33.
19. KALAČ, P., KRÍŽEK, M. (2005): Biogenní aminy a polyaminy v potravinách a jejich vliv na lidské zdraví. *Potravinářská revue*, 2/2005, s. 40-42.
20. 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* 102/1, s. 129-137.

Adresa

Ing. Libor Kalhotka, Ph.D., Ústav agrochemie, půdoznalství, mikrobiologie a výživy rostlin, Mendelova univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno, Česká republika, xkalhotk@node.mendelu.cz

Ing. Michaela Němcová, Ústav agrochemie, půdoznalství, mikrobiologie a výživy rostlin, Mendelova univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno, Česká republika, minema@seznam.cz

RNDr. Marcela Vyletěllová, Ph.D. Výzkumný ústav pro chov skotu, srov.o.o a Agrovýzkum Rapotín s.r.o., Rapotín, Výzkumníků 267, 788 13 Vikýřovice, Česká republika, marcela.vyletelova@vuchs.cz>

Ing. Šárka Havlíková, Milcom a.s. - VÚM, Soběslavská 841, 390 02 Tábor, Česká republika, s.havlikova@vum-tabor.cz

Přijato do tisku 20. 12. 2010
Lektorováno 27. 1. 2011