

Detekce biogenních aminů v průběhu zrání přírodních sýrů

Andrea Čablová

Bakalářská práce
2010



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

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

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Andrea ČABLOVÁ**
Osobní číslo: **T07057**
Studijní program: **B 2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Chemie a technologie potravin**

Téma práce: **Detekce biogenních aminů v průběhu zrání
přírodních sýrů**

Zásady pro vypracování:

I. Teoretická část

1. V teoretické části charakterizujte biogenní aminy, jejich výskyt a význam a zároveň popište technologii výroby sýrů.

II. Praktická část

1. V praktické části proveďte stanovení biogenních aminů během procesu zrání přírodních sýrů holandského typu.
 2. Na základě teoretické části a výsledků praktické části formulujte závěry a doporučení.
-

Rozsah bakalářské práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

- [1] GÖRNER, F.; VALÍK, L'. Aplikovaná mikrobiologie požívatin. 1. Bratislava : Malé centrum, 2004. 528 s. ISBN 80-967064-9-7.
[2] VELÍŠEK, J. Chemie potravin 3. 2. upravené vydání. Tábor : Osis, 2002. 368 s. ISBN 80-86659-02-X.
[3] Halasz A. ; Barath A. ; Simon-Sarkadi L. ; Holzapfel W. Biogenic amines and their production by microorganisms in food. International Journal of Food Microbiology. 1994, 5, s. 42-49.
[4] SILLA SANTOS, M.H. Biogenic amines: Their importance in foods. International Journal of Food Microbiology. 1996, 29, s. 213-231.

Vedoucí bakalářské práce:

RNDr. Leona Buňková, Ph.D.

Ústav technologie tuků, tenzidů a kosmetiky

Datum zadání bakalářské práce:

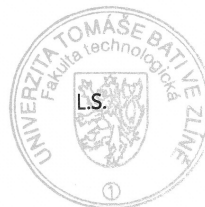
11. února 2010

Termín odevzdání bakalářské práce:

31. května 2010

Ve Zlíně dne 15. dubna 2010

doc. Ing. Petr Hlaváček, CSc.
děkan



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

ABSTRAKT

Cílem této bakalářské práce bylo popsat vývoj obsahu vybraných biogenních aminů (histaminu, kadaverinu, putrescinu a tyraminu), a to ve 4 vrstvách holandského typu sýra (Eidamská cihla) v závislosti na 3 režimech zrání/skladování v průběhu 174 dnů. Pro analýzu biogenních aminů byla použita iontově výměnná chromatografie. Nejvyšší obsahy kadaverinu, putrescinu a tyraminu byly zjištěny u sýrů uchovávaných po celou dobu sledování ve zracím sklepě při 10 °C. Nižší obsahy biogenních aminů byly detekovány u vzorků, které byly po 5 týdnech ve zracím sklepě přesunuty do chladírenského zařízení (5 °C) a nejnižší u sýrů, které byly po 3 týdnech ve zracím sklepě přesunuty do chladírenského zařízení. Histamin nebyl v průběhu 174 dnů ani u jednoho režimu detekován.

Klíčová slova: biogenní aminy, sýr, iontově výměnná chromatografie

ABSTRACT

Abstrakt ve světovém jazyce

The aim of this work was to describe the development of selected biogenic amines (histamine, cadaverine, putrescine and tyramine) in 4 layers of Dutch-type cheese (Edam cheese) depending on 3 ripening/storage regimes during a 174 day period. Biogenic amines were analysed by means of ion-exchange chromatography. The highest content of cadaverine, putrescine and tyramine was determined in cheeses stored in a ripening cellar at a temperature of 10 °C during the whole observation period. Lower content of biogenic amines were determined in samples which were moved into a cold storage device (5 °C) after 5 weeks of storage in a ripening cellar and the lowest concentrations of biogenic amines were detected in cheeses which were moved into a cold storage device after 3 weeks of storage in a ripening cellar. During the 174 day period, histamine was not detected in any of the regimes.

Keywords: biogenic amines, cheese, ion-exchange chromatography

Poděkování

Na tomto místě bych chtěla poděkovat vedoucí své bakalářské práce RNDr. Leoně Buňkové, Ph.D. za cenné rady, připomínky, metodické vedení praktické i teoretické práce a čas, který mi věnovala. Rovněž bych chtěla poděkovat doc. Ing. Františku Buňkovi, Ph.D. za pomoc při praktické části.

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 užit své dílo – diplomovou/bakalářskou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- beru na vědomí, že pokud bylo k vypracování diplomové/bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tedy pouze k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové/bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- beru na vědomí, že pokud je výstupem diplomové/bakalářské práce jakýkoliv softwarový produkt, považují se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Ve Zlíně

.....

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:

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

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

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

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:

(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 vzdělávacímu 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:

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

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

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

OBSAH

ÚVOD	9
I TEORETICKÁ ČÁST	10
1 BIOGENNÍ AMINY	11
1.1 CHARAKTERISTIKA BIOGENNÍCH AMINŮ	11
1.2 ROZDĚLENÍ BIOGENNÍCH AMINŮ	11
1.3 VZNIK BIOGENNÍCH AMINŮ A JEJICH REAKCE.....	12
1.3.1 Mikroorganismy produkující biogenní aminy.....	14
1.4 VÝZNAM BIOGENNÍCH AMINŮ.....	15
1.4.1 Působení biogenních aminů na organismy.....	15
2 VÝSKYT BIOGENNÍCH AMINŮ	17
2.1 ROSTLINNÉ MATERIÁLY.....	17
2.2 PIVO, VÍNO	18
2.3 ŽIVOČIŠNÉ MATERIÁLY.....	18
2.3.1 Ryby.....	18
2.3.2 Mléko	19
2.3.3 Sýry	20
3 SÝRY A JEJICH VÝROBA	21
3.1 POŽADAVKY NA MLÉKO.....	21
3.2 ROZDĚLENÍ SÝRŮ	22
3.3 SÝRY S NÍZKODOHŘÍVANOU SÝŘENINOU	24
3.4 TECHNOLOGIE VÝROBY	25
3.5 OČKOVACÍ KULTURY.....	26
3.5.1 Fermentace sacharidů a funkce jednotlivých mikroorganismů.....	26
3.5.2 Fermentace bílkovin.....	27
II PRAKTICKÁ ČÁST	28
4 CÍL PRÁCE	29
5 MATERIÁL A METODY	30
5.1 POUŽITÉ ZAŘÍZENÍ A POMŮCKY	30
5.2 ROZTOKY PRO IONTOVĚ VÝMĚNNOU CHROMATOGRAPHII	30
5.3 POPIS VZORKŮ SÝRŮ.....	31
5.4 IZOLACE BIOGENNÍCH AMINŮ	32
5.5 IONTOVĚ VÝMĚNNÁ CHROMATOGRFIE.....	32
6 VÝSLEDKY A DISKUZE	33
6.1 TVORBA BIOGENNÍCH AMINŮ V PRŮBĚHU ZRÁNÍ/SKLADOVÁNÍ.....	33
6.1.1 Produkce biogenních aminů v sýrech uložených ve sklepeř	33

6.1.2	Produkce biogenních aminů v sýrech přemístěných po 3 týdnech do lednice	35
6.1.3	Produkce biogenních aminů v sýrech přemístěných po 5 týdnech do lednice	37
7	DISKUZE	40
	ZÁVĚR A DOPORUČENÍ	43
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	44
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	49
	SEZNAM OBRÁZKŮ	50
	SEZNAM TABULEK	51
	SEZNAM PŘÍLOH	52

ÚVOD

Biogenní aminy jsou organické dusíkaté báze, vznikající náhradou jednoho, dvou nebo třech atomů vodíku amoniaku za aryllovou nebo alkylovou skupinu [1].

Pro člověka nepostradatelné, avšak ve vysokých koncentracích se mohou projevit jako látky psychoaktivní a vasoaktivní [2].

Patří mezi potencionální ukazatele bakteriálního kažení a z hlediska hygienického jsou studovány v potravinách. V lidském organismu zastávají mnoho funkcí. Regulují syntézu proteinů, nukleových kyselin, stabilizují membrány, regulují krevní tlak [3].

Na druhou stranu mohou představovat zdravotní rizika, pokud je překročena minimální toxická dávka. Určit, zda je daná koncentrace biogenních aminů již toxická je obtížné. Toxicita závisí na mnoha faktorech, zejména na efektivnosti detoxikace organismu, přítomnosti ostatních potenciálně toxických aminů. Žádná omezení ohledně koncentrace biogenních aminů dosud nebyla stanovena. Sýry, fermentované potraviny, jsou ideálním prostředím pro vznik biogenních aminů. Vznikají již během výrobního procesu, kdy jsou přítomny nejen volné aminokyseliny, ale také dekarboxylasa pozitivních mikroorganismy, které tyto aminy produkují. Množství biogenních aminů v sýrech závisí na typu sýra, době zrání, výrobním procesu [4, 5].

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 BIOGENNÍ AMINY

1.1 Charakteristika biogenních aminů

Biogenní aminy jsou stabilní, nízkomolekulární organické báze vznikající dekarboxylací aminokyselin, aminací nebo transaminací aldehydů a ketonů. S ohledem na jejich vznik a vlastnosti jsou řazeny mezi endogenní přírodní toxiny [6, 7]. Patří k přirozeným antinutričním faktorům, hygienicky významným ve výživě. Vysoké koncentrace se vyskytují u potravin v pokročilém stupni kažení. Stávají se tak jedním z ukazatelů kvality potravin. Sledování těchto látek je významné jednak z hlediska ovlivnění zdravotní nezávadnosti potravin a jednak z hlediska možnosti posouzení kvality potravin [8]. V malých množstvích jsou potřebné v organismu pro celou řadu základních funkcí (regulace nukleových kyselin, stabilizace membrán, syntéza bílkovin atd.). Jejich vysoké koncentrace však mohou působit toxicky [9]. Horní hranice $100 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ pro histamin je tolerována v rybách, rybích výrobcích [10].

1.2 Rozdělení biogenních aminů

Podle chemické struktury biogenní aminy dělíme:

1. aromatické (tyramin, fenylethylamin),
2. heterocyklické (histamin, tryptamin, serotonin),
3. alifatické (kadaverin, putrescin, spermidin, spermin, agmatin) [11, 6].

Putrescin (PUT), spermidin (SPD), spermin (SPN) patří do skupiny polyaminů. Mezi polyaminy se někdy řadí i kadaverin. V roce 1990 byly na základě své specifické role v buňkách eukaryotických organismů zařazeny do zvláštní skupiny. Putrescin, ačkoliv je po strukturní stránce diaminem, je řazen také mezi polyaminy, protože je prekurzorem spermidinu a sperminu (tvorba probíhá následně: putrescin \rightarrow spermidin \rightarrow spermin) [12].

Podle původu dělíme biogenní aminy na přírodní a biogenní. Je složité najít mezi těmito dvěma skupinami biogenních aminů jasnou hranici, protože některé z aminů mohou vznikat během metabolických procesů v živých organismech nebo činností mikroorganismů [14].

1.3 Vznik biogenních aminů a jejich reakce

Přirozené aminy vznikají metabolickým procesem živých organismů (spermin, spermidin). Aminy biogenní vznikají cestou mikrobiální dekarboxylace příslušných aminokyselin (histamin, tyramin, fenylethylamin, tryptamin) [14]. Vznik biogenních aminů je uveden v příloze I. [13]. Putrescin, kadaverin, agmatin mohou být syntetizovány fyziologicky nebo mohou být tvořeny bakteriální dekarboxylací v závislosti na druhu potraviny, ve které jsou tvořeny. V potravinách se vyskytují přirozeně v malém množství [14].

Tvorba BA závisí na:

- přítomnosti volných aminokyselin (na stupni proteolýzy),
- přítomnosti dekarboxylasa pozitivních mikroorganismů jako jsou např. bakterie čeledi *Enterobacteriaceae* nebo bakterie mléčného kvašení (*Lactobacillus*, *Pedococcus*, *Streptococcus*),
- podmínkách, které ovlivňují mikrobiální aktivitu. Tyto podmínky jsou uvedeny v tab. 1. [14, 15].

Tab. 1. Faktory ovlivňující dekarboxylasovou aktivitu mikroorganismů [11, 16]

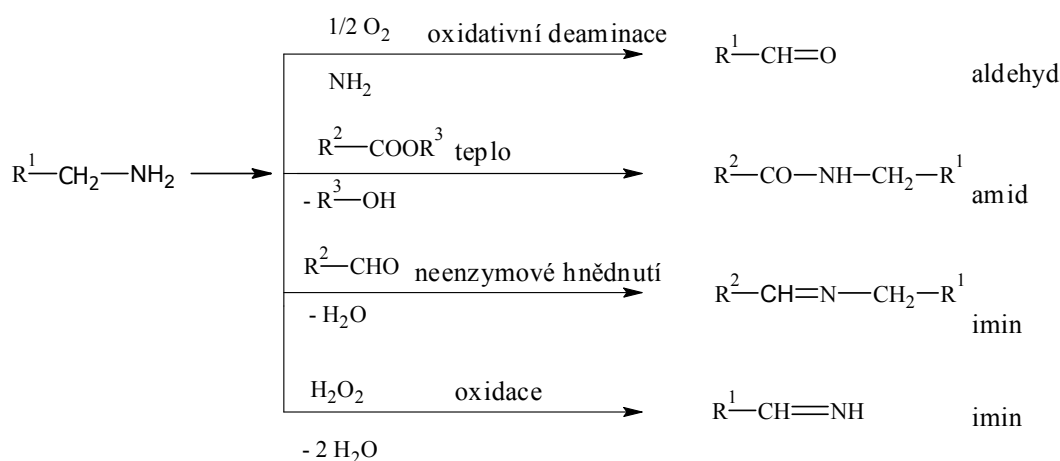
Faktory	Vliv na dekarboxylasovou aktivitu
pH	dekarboxylasová aktivita je silnější v kyselém prostředí (pH 4,0–5,5)
obsah glukosy	0,5–2,0 % optimum pro růst dekarboxylasa pozitivních mikroorganismů 3 % inhibují syntézu dekarboxylasu
teplota	20–30 °C je optimální teplota pro růst většiny mikroorganismů, nižší teplota zpomaluje až zastavuje růst mikroorganismů
přítomnost NaCl	aktivuje tyrosin dekarboxylasu, inhibuje histidin dekarboxylasu
přítomnost NaNO ₂	aktivuje tyrosin dekarboxylasu
přítomnost O ₂	potřebný pro růst některých mikroorganismů
množství přítomných aminů	histamin, agmatin a putrescin inhibují histidin dekarboxylasu (<i>Photobacterium N - 14</i>)

Odstranění již jednou vzniklých biogenních aminů z potravin je velmi obtížné. Snížení jejich koncentrace lze např. dosáhnout použitím diaminooxidasy, ale v praxi není tento způsob dekontaminace použitelný. K částečnému snížení obsahu aminů dochází také v tepelně zpracovaných výrobcích jejich reakcí s redukujícími cukry, resp. s rozkladnými produkty cukrů v Maillardových reakcích. Nejvhodnějším způsobem výroby potravin ob-

sahujících malé množství biogenních aminů je však dodržování takových technologických postupů a hygienických podmínek výroby, které brání jejich vzniku [17].

Biogenní aminy jsou reaktivní látky. Hlavní reakce jsou uvedeny na obrázku 1. Kromě enzymových reakcí, které vedou k derivátům biogenních aminů a k dalším sloučeninám, mohou oxidativní deaminací poskytovat aldehydy. Dlouhodobým skladováním potravin nebo za zvýšené teploty reagují s triacylglyceroly za vzniku amidů mastných kyselin. Vstupují stejně jako další aminosloučeniny do reakcí neenzymového hnědnutí, kde vznikají jako primární reakční produkty příslušné iminy. Ty se tvoří také oxidací aminů, např. peroxidem vodíku nebo hydroperoxydy lipidů [17].

Obr. 1. Hlavní reakce biogenních aminů [17]



1.3.1 Mikroorganismy produkující biogenní aminy

Biogenní aminy vznikají dekarboxylací aminokyselin pomocí enzymů produkovaných bakteriemi. Negativní produkce biogenních aminů je jedním z důležitých kritérií při rozhodování, zda daný kmen bakterií mléčného kvašení může být využit pro aplikace při výrobě sýrů. V sýru Gouda se mohou vyskytovat laktobacily se zvýšenou proteolytickou aktivitou, produkující BA až v počtu 10^7 KTJ·g⁻¹. Tato množství přesto nemusí způsobovat zdravotní rizika. Z testovaných bakterií mléčného kvašení (*Lactococcus*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*) izolovaných z potravin byla u mnoha kmenů prokázána tvorba aminů [18]. Schopnost různých bakterií produkovat aminy je velmi rozdílná. Přehled mikroorganismů podílejících se na produkci BA ve vybraných potravinách jsou uvedeny v tab. 2. [19].

Tab. 2. Mikroorganismy produkující biogenní aminy [17]

Potravina	Mikroorganismy	Produkované aminy
ryby	<i>Morganella morganii</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Hafnia alvei</i> <i>Proteus mirabilis</i> , <i>Proteus vulgaris</i> , <i>Clostridium perfringens</i> <i>Enterobacter aerogenes</i> , <i>Bacillus</i> sp., <i>Staphylococcus xylosum</i>	His, Tyr Kad, Put Agm, Spd, Spn
sýry	<i>Lactobacillus buchneri</i> , <i>L. bulgaricus</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. casei</i> <i>L. acidophilus</i> , <i>Enterococcus faecium</i> , <i>Streptococcus mitis</i> <i>Bacillus macerans</i> , <i>Propionibacterium</i> sp.	His, Kad Put, Tyr, Trp
maso a masné výrobky	<i>Pediococcus</i> sp., <i>Lactobacillus</i> sp., <i>Pseudomonas</i> sp., <i>Streptococcus</i> sp., <i>Micrococcus</i> sp., čeleď <i>Enterobacteriaceae</i>	His, Kad Put, Tyr Phe, Trp
fermentovaná zelenina	<i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides</i> <i>Pediococcus</i> sp.,	His, Kad Put, Tyr
fermentované produkty ze sóji	<i>Rhizopus oligosporus</i> , <i>Trichosporon beigllii</i> <i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	His, Kad Put, Tyr, Trp

His – histamin, Tyr – tyramin, Kad – kadaverin, Put – putrescin, Agm – agmatin, Spd – spermidin, Spn – spermin, His – histamin, Trp – tryptofan

1.4 Význam biogenních aminů

Biogenní aminy jsou součástí fyziologického metabolismu člověka, zvířat, rostlin a mikroorganismů. I když tyto látky jsou pro organismus nepostradatelné, ve větších koncentracích jsou toxické. Za normálních podmínek dojde v organismu k rychlé detoxikaci biogenních aminů z potravy konjugací nebo pomocí enzymu aminooxidasy. V případě alergií nebo narušení detoxifikačního procesu se aminy v těle hromadí [20].

Mezi nejdůležitější biogenní aminy patří histamin, putrescin, tyramin a kadaverin. Nežádoucí účinky biogenních aminů se nejčastěji projevují jako nemoci z potravin. Organismus se proti tomuto onemocnění brání svým detoxikačním systémem, na kterém se podílejí enzymy monoaminooxidasa a diaminooxidasa. Selhání těchto enzymů může být způsobené genetickými predispozicemi, gastrointestinálními chorobami, inhibitory (léky, alkohol, káva, čaj, kouření) nebo konzumem potravin s velkým obsahem biogenních aminů [21]. Biogenní aminy mohou způsobit citlivým lidem na jejich přítomnost řadu problémů jako jsou závratě, dýchací potíže, pocení, zčervenání kůže, snížení nebo zvýšení krevního tlaku. Jejich intenzita je závislá na kvalitativním i kvantitativním složení biogenních aminů [22].

1.4.1 Působení biogenních aminů na organismy

Biogenní aminy jsou zdrojem dusíku, prekurzorů hormonů, alkaloidů, nukleových kyselin a proteinů. Ovlivňují mnohé procesy v organismu, jako jsou:

- regulace tělesné teploty,
- příjem živin,
- zvýšení nebo snížení krevního tlaku [23].

Nejrozšířenější polyaminy jsou putrescin, spermidin a spermin. Při fyziologické hodnotě pH se polyaminy chovají jako kationty a mohou se vázat na makromolekuly jako jsou fosfolipidy, DNA, RNA, ribozomy nebo bílkoviny. V rostlinných buňkách se účastní širokého spektra fyziologických pochodů. Jsou nezbytné pro buněčné dělení, růst a diferenciaci, podílejí se na iniciaci kvetení, tvorbě adventivních výhonů či tvorbě proembryogenních struktur v tkáňových kulturách stejně jako na odpovědi proti stresu. Funkce polyaminů je dvojnásobná v programové buněčné smrti. Na jedné straně svým stimulačním účinkem na dělení buňky mají významnou ochrannou roli, na druhé straně mohou programovanou buněčnou

smrt samy indukovat. Polyaminy jsou předmětem studií v živočišných buňkách, vzhledem k hromadění v rakovinných buňkách [24].

Fenylethylamin a tyramin zvyšují krevní tlak, zatímco histamin krevní tlak snižuje [6, 20].

Kadaverin, spermidin, putrescin mohou zneškodňovat volné radikály. Antioxidační účinek tyraminu se zvyšuje s jeho koncentrací. Tento účinek je podmíněný přítomností amino a hydroxy skupin [11].

Spermin je schopen regenerovat tokoferol z tokoferolového radikálu prostřednictvím vodíkového donoru z aminoskupiny. Sperminový radikál potom váže peroxidové radikály do komplexů [11].

Dopamin, noradrenalin, tyramin zneškodňují superoxidové a hydroxylové radikály [11].

Biogenní aminy jsou potenciálními prekurzory pro tvorbu karcinogenních N-nitroso sloučenin. Reakce nitrosačních činidel s primárními aminy vede k tvorbě alkylačních produktů, které reagují s jinými složkami potravy (hlavně alkoholy) zbavené toxického účinku. Sekundární aminy (agmatin, spermin, spermidin) mohou tvořit stabilní nitrosaminy po reakci s dusitany, zatímco terciární aminy produkují řadu nestabilních N-nitroso sloučenin [11, 23].

Putrescin a kadaverin jsou posuzovány jako potenciální karcinogeny. Zahříváním putrescinu může vznikat pyrolidin a z kadaverinu piperidin. Působením tepla se z nich vytváří N-nitrosopyrolidin a N-monoso-piperidin [11].

Některé biogenní aminy přispívají k chuti a vůni potravin [23].

Histamin, tyramin, agmatin, putrescin, kadaverin, spermin a spermidin jsou důležité nejen z hlediska své toxicity, ale také proto, že mohou být indikátory čerstvosti potravin díky jejich termické stabilitě. Rybí zápach je odvozen z různých složek, z nichž trimethylamin je převládající. Putrescin a kadaverin poskytují hnilobnou chuť, zatímco histamin a fenylethylamin poskytují rybí a štiplavou chuť [25, 6].

2 VÝSKYT BIOGENNÍCH AMINŮ

Biogenní aminy se vyskytují prakticky ve všech potravinách jako běžné produkty metabolismu [17].

Podle způsobu tvorby biogenních aminů lze potraviny rozdělovat do dvou skupin.

1. Fermentované potraviny, čili potraviny, kde biogenní aminy jsou produkovány hlavně fermentací a dozráním. Zde patří fermentované masné výrobky, ryby a rybí výrobky, zralé sýry, fermentované alkoholické nápoje (víno, pivo) a fermentovaná zelenina. Musíme také přihlídnout na možnosti kontaminace nežádoucími mikroorganismy během procesu výroby, skladování [14, 9].
2. Nefermentované potraviny, kde aminy jsou výsledkem působením kontaminující mikroflóry. Vznikají hlavně v rybách a rybích výrobcích a v mase během skladování. V tomto případě, mohou být biogenní aminy indikátorem mikrobiologické kontaminace a jejich koncentrace může být ukazatelem jejich kvality. Vysoké koncentrace biogenních aminů se vyskytují u potravin v pokročilém stupni kažení. V ovoci, zelenině a houbách při nevhodném skladování produkuje biogenní aminy zejména endogenní dekarboxylasy [14, 17].

2.1 Rostlinné materiály

Biogenní aminy se mohou nacházet v ovoci, zelenině, ovocných džusech, kakaových bobech. U džusů vyrobených z pomerančů, malin, citrusů, grepů, mandarinek, ostružin, rybízu a hroznů byl prokázán obsah všech biogenních aminů, avšak putrescin nejvíce byl zastoupen. Tryptamin a noradrenalin byly nalezeny v pomerančových džusech. Rajčata obsahovala tyramin, tryptamin a histamin. Banány obsahovaly tyramin, noradrenalin, tryptamin, serotonin. Švestky obsahovaly tyramin a noradrenalin. Špenát obsahoval histamin. V zelenině, včetně čínského zelí, endivie, ledového salátu, čekanky, byly identifikovány obsahy biogenních aminů, nejvíce byl obsažen zástupce polyaminů – spermidin. Nízké množství biogenních aminů bylo stanoveno v mraženém špenátovém pyré, kečupu, koncentrovaném rajčatovém protlaku, zmrzlém zeleném hrášku. Fermentovaná zelenina obsahovala histamin, ten byl také nalezen v kyselém zelí [26, 6]. Jiná fermentovaná zelenina, kde byly aminy nalezeny jsou zelené olivy, okurky [13].

2.2 Pivo, víno

Fermentované alkoholické nápoje obsahují ve velkém množství agmatin, kadaverin, ethanolamin, histamin, putrescin a tyramin. Jak v pivu, tak i ve vínu, byly detekovány tyto aminy: tyramin, tryptamin, histamin, β -fenylethylamin, putrescin, kadaverin, spermin a další. Během malolaktické fermentace a zrání vína se vyvinuly aminy: putrescin, histamin, methylamin, tyramin [13].

V pivu byl přítomen tyramin a histamin. Biogenní aminy se tvoří ve sladovnickém ječmeni, a to i za sterilních podmínek. Mikroflóra obilí a přítomnost kontaminujících kvasinek, může být zodpovědná za zvýšenou hladinu aminů, zejména histaminu v pivu. Slad a chmel přispívají k obsahu aminů sladiny a piva. Hladiny sperminu a spermidinu se prudce snížily během rmutování, zatímco hladiny ostatních aminů se zvýšily mimo putrescinu [13].

2.3 Živočišné materiály

2.3.1 Ryby

V mase, rybách a sýrech bývají hlavními biogenními aminy histamin, kadaverin, putrescin a tyramin [17].

V čerstvém rybím mase je obsah biogenních aminů malý, např. v mase tuňáka bývá 0–10 mg·kg⁻¹ histaminu a 0–2 mg·kg⁻¹ tyraminu [17].

Tkáně ryb obsahují vysoké množství histidinu, který může být přeměněn na histamin přítomnými mikroorganismy. Bylo zjištěno, že tuňák a další druhy ryb z čeledi *Scombriadae*, *Clupeidae* obsahují vysoké množství histaminu zapříčiněnou nevhodnou manipulací a konzervací [16]. Při skladování ryb při teplotách kolem 0 °C a nižších vznikají biogenní aminy v téměř zanedbatelném množství. Optimální tvorba histaminu je značně rozdílná (5–38 °C) a závisí hlavně na druhu kontaminující mikroflóry [17]. Bylo prokázáno, že zkažené rybí maso obsahovalo putrescin, kadaverin, histamin, spermidin a spermin [11].

Pro hodnocení kvality rybího masa, jeho čerstvosti a stupně kažení, byl zaveden index kvality (někdy nazývaný jako index biogenních aminů - BAI). Výpočet indexu kvality je uveden v rovnici 1.

Vztah pro výpočet indexu kvality [11]

$$BAI = \frac{\text{histamin} + \text{putrescin} + \text{kadaverin}}{1 + \text{spermin} + \text{spermidin}} \quad (1)$$

Hodnota $BAI < 1$ kvalita je považovaná za výbornou, při hodnotě $BAI > 10$ je kvalita velmi špatná. Hodnoty histaminu, putrescinu, kadaverinu, sperminu a spermidinu jsou ve vzorci uváděny v jednotkách $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ [16], [11], [14].

Zápach a vůně obvykle ukazují na rozklad potravin. Nežádoucí organoleptické vlastnosti mohou být změněny, sníženy nebo eliminovány tepelným zpracováním. Přítomnost histaminu je tedy spolehlivým indikátorem kažení [16]. Minoritním biogenním aminem zpravidla bývá agmatin, který se v mase a mase ryb nachází běžně v množství $1\text{--}3 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ [17].

V České republice je vyhláškou tolerovaná horní hranice histaminu v rybách a rybích výrobcích $100 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ [10].

2.3.2 Mléko

Mléko a mléčné výrobky jsou dobrým příkladem prokázání nežádoucího zvýšení obsahu histaminu během nevhodného zpracování. Obsah histaminu v mléčných produktech je ukázán v tab. 3. Ačkoliv čerstvé mléko obvykle obsahuje velmi nízké hladiny histaminu, pasterované nebo UHT mléko obsahuje mírně vyšší hladinu výskytu tohoto biogenního aminu. Při fermentaci mléka lze pozorovat značný nárůst často se vyskytujícího histaminu. Jeho obsah může činit až $7 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ v kysané smetaně a patrně vyšší v jogurtu. V sýrech obsah histaminu prudce stoupá se stářím sýra až k $2\,500 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ [27].

Tab. 3. Obsah histaminu v mléce a mléčných výrobcích. Zvýšení obsahu histaminu během zpracování mléka na jednotlivé mléčné produkty [27]

Mléčný výrobek	Obsah histaminu [$\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$]
čerstvé mléko	< 0,3
pasterované mléko	0,3–0,7
UHT mléko	do 08
sladká nebo kysaná smetana	do 0,7
jogurt	do 13
sýr	do 2 500

2.3.3 Sýry

Po rybách je sýr nejčastější potravinou, která může být příčinou otrav způsobenou histaminem. Sýry obsahují dostatečné množství aminokyselin, které vznikly převážně proteolýzou kaseinu. Biogenní aminy vznikají hlavně enzymovou dekarboxylací aminokyselin mikroorganismy. Množství biogenních aminů v sýru je závislé na době zrání, mikroflóře, pH, aktivitě vody, koncentraci solí, teplotě skladování, přítomnost kofaktoru pyridoxalfosfátu. Schopnost různých bakterií produkovat aminy je velmi rozdílná [19]. Vysoké hladiny biogenních aminů jsou spíše detekovány v sýrech, které byly kontaminovány nežádoucími mikroorganismy. V těchto druzích potravin se nejčastěji nachází tyto aminy: histamin, tyramin, tryptamin, putrescin, kadaverin a fenylethylamin [14]. Jejich výskyt v jednotlivých druzích sýra je zaznamenán v tab. 4. Při dobré technologii a dodržování správných hygienických zásad obsahují i dlouhodobě zrající sýry jen poměrně malá množství biogenních aminů [17].

Tab. 4. Koncentrace [$\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$] biogenních aminů v závislosti na druhu sýrů [7]

Sýr	Histamin	Tyramin	Tryptamin	Fenylethylamin	Putrescin	Kadaverin
Emental	69–650	0–917		<0,1	<0,5	16
Plísňový sýr	3–910	40–110	nd–1100	10	44	42
Camembert	nd–480	<10–210	nd–60			
Eidam, Gouda	nd–450	<0,1–670	nd–200	<0,1	7–20	17–48
Čedar	nd–2120	nd–1530	nd–300	nd–300		
Parmazan	nd–293	85–280				

nd – biogenní aminy nedetekovány

3 SÝRY A JEJICH VÝROBA

Sýry představují tradiční produkty, které člověk poznal již před 8000 lety [28]. Sýr je mléčný výrobek vyrobený srážením mléčné bílkoviny z mléka působením syřidla nebo jiných koagulačních činidel, prokysáním a oddělením podílu syrovátky. Principem je tedy oddělení určitého podílu syrovátky ze sraženiny mléka stanovené tučnosti [29]. Jedním z důvodů, proč se mléko začalo zpracovávat na sýry, je jejich delší trvanlivost. Prodloužení trvanlivosti je založeno na fermentaci laktosy především na kyselinu mléčnou. Nízký redox potenciál a přidavek soli přispívá k snížení vodní aktivity a pH. Povrch sýra je navíc často chráněn kůrou, zrací fólií nebo nátěrem. Další výhodou zpracování mléka na sýry je to, že jsou v nich koncentrovány nutričně nejcennější složky mléka [28].

Z nutričního hlediska jsou sýry plnohodnotnými výrobky obsahující všechny esenciální aminokyseliny. Zdrojem využitelné energie jsou bílkoviny a mléčný tuk. Laktosa v mléce je obsažena v malém množství a ve většině případů je zcela převedena na kyselinu mléčnou a další produkty kvašení. Velký význam má obsah vápníku ve výrobcích, jehož množství se liší podle typu výrobku. Čím je menší vliv mléčného kysání při zpracování sýřeniny a větší vliv syřidlového (enzymatického srážení), tím vyšší je obsah vápníku ve výrobku. S obsahem vápníku souvisí i obsah fosforu v sýrech. U tučných sýrů je přítomen vitamin A a D, u všech druhů vitaminy skupiny B [29].

3.1 Požadavky na mléko

Mléko má mít zásadně příznivé fyzikální, chemické a mikrobiologické vlastnosti, a také musí mít specifické vlastnosti [30].

Mléko na výrobu sýrů by mělo mít příznivý obsah bílkovin (kaseinu) k obsahu tuku. Tato vlastnost má vliv na vyváženost sýrů. Čím je obsah kaseinu v mléku vyšší, tím je spotřeba mléka na výrobu 1 kg sýra menší, a tím vyšší musí být obsah tuku v mléku, aby se v sýru dosáhl předepsaný obsah tuku v sušině. Rozpustný vápník (Ca^{2+}) je nevyhnutelný při vytváření sraženiny z kaseinů. Snížení jeho obsahu o 10 % významně zhoršuje syřitelnost mléka a výtěžnost sýrů [30].

V syrovém mléku často bývají ve větším množství plynotvorné bakterie (čeledi *Enterobacteriaceae*, *Klebsiella*, *Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli* a další). Při výrobě polotvrdých sýrů způsobují časně nadouvání fermentací laktosy v mladém sýru. Čeď *Entero-*

bacteriaceae je běžnou rekontaminační mikroflórou. S velkou pravděpodobností menší nebo větší množství těchto bakterií obsahuje i pasterizované mléko určené na výrobu polotvrdých sýrů holandského typu. Při výrobě sýrů tohoto typu je velké riziko, že se při dohřívání a dosoušení sýřeniny při teplotách 36–40 °C a potom v teplé sýřenině při její formování a lisování tyto bakterie na tolik pomnoží, že způsobí v sýru časné nadouvání. Laktosa v sýru je pro tyto bakterie velmi dobrým živným prostředím a technologické podmínky jsou blízké optimální teplotě růstu 37 °C. Na eliminaci tohoto rizika při výrobě sýrů s nízkodohřívanou sýřeninou se přidává do mléka maximálně 20 g dusičnanu draselného na 100 l [30].

3.2 Rozdělení sýrů

Sýry je možné rozdělit podle řady hledisek: [29]

- Podle použité suroviny:
 1. přírodní sýry, tj. klasické sýry, vyráběné přímo z mléka,
 2. tavené sýry, které jsou vyráběny dalším zpracováním přírodních sýrů,
 3. imitace sýrů, které jsou připravovány rekonstitucí jednotlivých složek mléka.
- Podle druhu použitého mléka:
 1. kravské,
 2. ovčí,
 3. kozí, apod.
- Podle obsahu sušiny:
 1. extra tvrdé (53 %),
 2. tvrdé (53–45,1 %),
 3. polotvrdé (45–38,1 %),
 4. poloměkké (38–32%),
 5. měkké (32 %).

- Podle obsahu tuku v sušině:
 1. vysokotučné (nad 60 % t.v.s.),
 2. plnotučné (45–60 t.v.s.),
 3. polotučné (25–45 t.v.s.),
 4. nízkotučné (10–25 t.v.s.),
 5. odtučněné (pod 10 t.v.s.).
- Podle obsahu vody v tukuprosté sušině:
 1. měkké (nejméně 67 %),
 2. polotvrdé (54–69 %),
 3. tvrdé (49–56 %),
 4. extra tvrdé (méně než 51 %).
- Podle způsobu srážení mléka:
 1. kyselé sýry – při výrobě se uplatňuje pouze kyselé srážení. Do této skupiny patří průmyslový tvaroh a z něj vyráběné Olomoucké tvarůžky,
 2. sladké sýry – při srážení mléka se uplatňuje jen působení syřidla. Srážení je relativně rychlé a prokysávání působením mikroorganismů probíhá proto převážně až při dalším zpracování sýřeniny (patří sem polotvrdé sýry),
 3. sýry se smíšeným srážením mléka s vlivem kyseliny mléčné a syřidlem. Do této skupiny patří především měkké sýry a tvarohy. Tato skupina sýrů je běžně zahrnována mezi sladké sýry.
- Podle způsobu zrání:
 1. nezrající sýry (čerstvý, termizovaný),
 2. sýry zrající na povrchu, s mazem na povrchu, v celé hmotě,
 3. sýry zrající (plísňové) s tvorbou charakteristické plísně na povrchu, s tvorbou charakteristické plísně uvnitř hmoty.

3.3 Sýry s nízkodohřívanou sýřeninou

Do skupiny sýrů s nízkodohřívanou sýřeninou patří:

- sýry eidamského typu,
- sýry s tvorbou ok,
- sýry čedarového typu,
- sýry z pařeného těsta [28].

Holandský typ sýrů je nejvýznamnějším druhem patřících do skupiny polotvrdých sýrů [31]. Do této skupiny sýrů patří právě holandské sýry Gouda, holandská cihla, eidamská koule a jejich variace. Sýry mají oka velikosti hrášku. Pro jejich jednoduchou technologii jsou vyráběny po celém světě [30, 31]. Tyto sýry jsou vyráběny z mléka kravského, v menší míře z ovčího a kozího mléka. Jiné polotvrdé sýry jsou vyráběny podobnou technologií [31].

Typické pro tuto skupinu sýrů je dohřívání a dosoušení sýřeniny při teplotě 34–42 °C. Sýry jsou vyráběny ve tvaru bochníku, cihly, koule, salámu nebo bloku o hmotnosti 0,2 kg až 20 kg. Obsah sušiny se obvykle pohybuje v rozmezí 43–60 %, obsah tuku v sušině 20–60 % a obsah soli 1,5–3,5 % [29, 31]. Tuk nepřímo ovlivňuje poměr vody a proteinů, reguluje pevnost a pružnost sýra. Zadržováním vlhkosti si udržuje vlastnosti sýřeniny [32]. Konzistence sýrů je tedy měkčí, pružná, celistvá a soudržná [29]. Textura je ovlivněna rozkladem α_{S1} -kaseinu během zrání. Pokud je tuk odstraněn, jako je tomu u nízkotučných sýrů, kasein má hlavní vliv na stavbu sýrů. Nízký obsah kaseinu způsobuje poměrně tvrdou texturu sýra. Kűćűkűner a Haque analyzovali texturu nízkotučného a plnotučného sýra Čedar. Došli k závěru, že Čedar s nízkým obsahem tuku má jiné fyzikální vlastnosti než je tomu u běžného Čedaru [32].

Zrání probíhá po dobu 4–8 týdnů při teplotách 6–12 °C a při relativní vlhkosti vzduchu kolem 80 % [29]. Doba zrání závisí na aktivitě přítomných bakterií, teplotě zracího prostoru a požadovaném stupni aroma těchto sýrů. Na začátku zrání probíhá současně i solení sýrů. Poté mladé sýry zrají asi týden při teplotě 12 °C a další 2 až 3 týdny při vyšší teplotě 18 °C. Dozrávají již při nižší teplotě [30]. Konzistence a chuť těchto sýrů se liší v závislosti na délce zrání a skladování [31]. Po celou dobu zrání sýrů probíhá štěpení bíl-

kovin a jejich štěpných produktů [30]. Sýry mohou být také ochuceny např. kmínem a jiným kořením [31].

Pokud sýry zrají více jak rok, jsou baleny do ochranných obalů [31]. Tyto sýry není nutné ošetřovat ani obracet. Kontroluje se pouze průběh jejich zrání [29]. Schéma výroby sýrů s nízkodohřívanou sýřeninou je uvedeno v příloze II. [29].

3.4 Technologie výroby

Mléko je termizováno a standardizováno, aby se upravil obsah tuku v mléce. Dále je mléko pasterováno a přečerpáno do sýrových van. Během tohoto tepelného ošetření je mléko podrobena baktofugaci. Účel baktofugace je redukce počtu bakteriálních spór máselného kvašení. Teplota musí být dostatečná, aby došlo ke zničení patogenních mikroorganismů a mikroorganismů způsobujících kažení, avšak ne ke zničení enzymu xantinoxidasy. Denaturace enzymu by měla být omezena [31].

Při výrobě sýrů holandského typu je mléko sráženo při teplotě 30 °C syřidlovými enzymy, nejčastěji chymosinem, který se získává ze žaludků telat. Pro kontrolu syřicího procesu se přidává mezofilní bakteriální kultura a chlorid vápenatý. Jako aditiva jsou často přidávány dusičnany, annato (barvivo E 160 b), karoteny. Výsledná sraženina se skládá z husté sítě para-kaseinových micel, které se rozšiřují po celém objemu mléka. Obecně platí, že tento gel není tak pevný, jako je tomu u měkkých sýrů. Následuje oddělení syrovátky od sýřeniny, přidání horké vody. Paření sýřeniny snižuje obsah laktosy a zvýší spojení sýřeniny při dalším míchání. Konečné pH sýra závisí na množství přidané vody. Teplota paření slouží především k ovlivnění obsahu sušiny sýra. Dále následuje lisování sýřeniny. V tomto kroku dojde k odloučení většinového podílu syrovátky od sýřeniny. Sýřenina je lisována do perforovaných forem. Jsou tak odstraněny zbytky syrovátky a je utvořen budoucí tvar sýra. Během zrání dochází k tvorbě kůrky. Nátěrová vrstva z polyvinylacetátu do jisté míry snižuje odpařování vody. Optimální teplota zrání je mírná, asi 13 °C. Nižší teplota a vlhkost je volena, pokud sýr zraje ve folii nebo vosku. Požadovaná konzistence tedy závisí na množství vlhkosti, tuku a přítomnosti fosforečnanu vápenatého. Proteolýza mění elasticou konzistenci na měkkou [31].

3.5 Očkovací kultury

Pro výrobu tohoto typu sýrů se uplatňují zejména kultury mezofilních bakterií mléčného kysání *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*, *L. lactis* ssp. *cremoris* a *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *cremoris*. Poslední dva druhy fermentují i citrát za vzniku kyseliny octové, diacetylu a CO₂. V některých sýrárnách přidávají do mléka i mezofilní kulturu *Lactobacillus casei*. Ta urychluje zrání sýrů svou výraznou proteolytickou aktivitou. Rozmnožování a primární metabolismus bakterií mléčného kvašení je velmi rychlý a je ukončen za 5 až 6 hodin po přidání zákysové kultury do sýrařského mléka. Za tuto dobu se uskuteční 4 až 5 dělení buněk. Zfermentuje se asi 50 % v mléku přítomné laktosy. Tím je ovlivněna chuť, barva, konzistence, trvanlivost, obsah vody a tvorba kůrky sýrů. Fermentace laktosy probíhá i po dobu solení zformované suroviny. Aromatvorné bakterie zfermentují za 24 hodin asi 80 % citrátu. Fermentace citrátu je jedním z faktorů tvorby ok. Na řezu mívá holandská cihla optimálně 5 až 6 ok. Další faktory, které ovlivňují tvorbu ok je obsah vzduchu v mléku a drobné bubliny a nečistoty, které fungují jako kondenzační jádra v přesyceném roztoku plynů [30].

3.5.1 Fermentace sacharidů a funkce jednotlivých mikroorganismů

Fermentace sacharidů bakteriemi mléčného kvašení je znázorněna v tab. 5.

Tab. 5. Fermentace sacharidů mléka bakteriemi mezofilní zákysové kultury při výrobě sýrů s nízkodohřívanou sýřeninou [30]

<i>Lactococcus lactis</i> <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> biovar <i>diacetylactis</i>	laktosa → kyselina mléčná
<i>Lactococcus lactis</i> ssp. biovar <i>diacetylactis</i> <i>Leuconostoc</i> ssp.	citrát → CO ₂ + kyselina octová + diacetyl citrát → CO ₂ + kyselina octová + diacetyl laktosa → kyselina mléčná + ethanol + CO ₂

Homofermentativní bakterie *Lactococcus lactis* a *L. lactis* ssp. *cremoris* tvoří z laktosy prakticky jen kyselinu mléčnou. *L. lactis* ssp. *lactis* biovar *diacetylactis* navíc fermentuje citrát na kyselinu octovou a diacetyl. Heterofermentativní *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *cremoris* tvoří aroma a produkuje z laktosy vedle kyseliny mléčné i malé množství ethanolu a CO₂. Z citrátu tvoří také CO₂, kyselinu octovou a diacetyl [30].

Lactococcus. lactis biovar *diacetylactis* někdy tvoří z aminokyseliny threoninu acetaldehyd. V zákysech mezofilních bakterií mléčného kvašení není acetaldehyd žádoucí, protože způsobuje nepřirozenou jogurtovou chuť. *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *cremoris* rozkládá vzniklý acetaldehyd, čímž eliminuje chybu zákysu [30].

3.5.2 Fermentace bílkovin

Fermentace bílkovin má významný vliv na tvorbu chuti, konzistence, na snížení vodní aktivity vody (a_w), tak i na barvu starších sýrů. Bílkoviny jsou štěpeny proteolytickými enzymy syřidla a enzymy bakterií mléčného kvašení. Primární proteolýza probíhá působením syřidlového enzymu chymozinu. Sekundární proteolýzu způsobují proteasy buněčné stěny laktokoků. Malé peptidy jsou dále štěpeny na aminokyseliny peptidasami a spolu s aminokyselinami se podílejí ve významné míře na chuti sýrů [30].

Na trvanlivost sýrů působí pozitivně snížená hodnota pH, obsah kyseliny mléčné a tvorba bakteriocinů [30].

II. PRAKTICKÁ ČÁST

4 CÍL PRÁCE

Cílem této bakalářské práce bylo popsat vývoj biogenních aminů v závislosti na době zrání a skladování sýrů holandského typu, a to ve čtyřech vrstvách malých bloků.

V teoretické části bylo nutno zpracovat literární rešerši na téma:

- biogenní aminy,
- výskyt biogenních aminů,
- možnosti stanovení biogenních aminů (histaminu, tyraminu, putrescinu, kadaverinu) v potravinách,
- technologie výroby sýrů holandského typu.

Cílem praktické části bylo:

- detekovat biogenní aminy ve čtyřech vrstvách přírodních sýrů holandského typu,
- sledovat obsah biogenních aminů v závislosti na třech režimech zrání/skladování.
- na základě teoretické části a výsledků praktické části formulovat závěry a doporučení.

5 MATERIÁL A METODY

5.1 Použité zařízení a pomůcky

- Automatický analyzátor aminokyselin AAA400 (Ingos, Praha, Česká republika)
- Automatické mikropipety Biohit
- Centrifuga Hermle
- Eppendorfkové mikrozkuřavky
- Filtry s porozitou 0,45 μm
- Chladnička Elektrolux
- Laboratorní předvážky Kern
- Třepačka Biosan
- Vortex Heidolph Reax
- Zařizování pro deionizaci vody Aqua Osmotic
- Laboratorní sklo a plasty

5.2 Roztoky pro iontově výměnnou chromatografii

1. Pufř A (citronan sodný)

dihydrát citronanu sodného (Lach-Ner)	21,00 g
bromid draselný (Lach-Ner)	41,65 g
monohydrát kyseliny citronové	1,50 g
chlorid sodný (Lach-Ner)	5,00 g
izopropanol (Lach-Ner)	250,00 ml

Jednotlivé komponenty byly smíchány a doplněny do 1 litru vodou.

2. Pufř B (citronan litný)

azid sodný (Lach-Ner).....	0,10 g
citronan litný (Lach-Ner).....	2,08 g
chlorid litný (Lach-Ner)	6,68 g
monohydrát kyseliny citronové (Lach-Ner)	9,56 g
thiodiglykol (Lach-Ner)	2,50 ml

Jednotlivé komponenty byly smíchány a doplněny do 1 litru vodou.

5.3 Popis vzorků sýrů

Od producenta vyrábějícího mléčné výrobky z pasterovaného mléka v České republice, byly ze standardní výroby získány tři šarže eidamského sýra (50 % w/w sušiny a 30 % w/w tuku v sušině). Tyto šarže byly vyrobeny za stejných technologických podmínek, tentýž den. Z každé šarže bylo odebráno 74 cihel. Eidamské cihly (1,2–1,4 kg, cca 9 × 9 × 14 cm) byly poté uzavřeny do kryovakového obalu a uloženy do zracího sklepa při teplotě 10 ± 2 °C.

Po 34 dnech (od počátku výroby) bylo z každé šarže 14 cihel přemístěno ze zracího sklepa do lednice (5 ± 1 °C), kde proběhlo další skladování (dále označeno jako 5T). Část vzorků byla také ze sklepa a dána do lednice (5 ± 1 °C) odebrána po 3 týdnech (23. den; dále označeno 3T). Celou dobu pokusu (celkem 174 dnů) zůstala ve zracím sklepě zbývající část cihel z každé šarže (označeno jako C). Vzorky ze sklepa i lednice byly odebrány 10., 13., 16., 20., 23., 27., 34., 38., 43., 49., 56., 63., 70., 84., 98., 112., 126., 148., 161. a 174. den od počátku výroby (v 1. den byly sýry vyrobeny, vylisovány a uloženy do solné lázně, 2. den byly sýry vyjmuty ze solné lázně, zabaleny a uloženy do zracího sklepa). V každém dnu, kdy probíhaly analýzy, byly odebrány z každé šarže vždy dvě paralelní cihly z každého režimu zrání/skladování.

Z každé cihly byl asepticky vykrojen středový pás (cca 9 × 9 × 2 cm). Tento středový pás byl asepticky rozdělen na 4 vrstvy: 7 mm od okraje (vrstva I), dalších 14 mm (vrstva II), dalších 14 mm (vrstva III) a zbylý střed (vrstva IV). Takto připravené vzorky byly následně analyzovány na přítomnost biogenních aminů.

5.4 Izolace biogenních aminů

Z jednotlivých vrstev sýra bylo naváženo 0,7–0,8 g rozstrouhaného vzorku a zalito 4 ml sodno citrátovým pufrům (pH 2,2). Tato směs byla homogenizována 15 minut, míchána při okolní teplotě 1 hodinu a následně centrifugována ($4\,000 \times g$ po dobu 30 min). Supernant byl zfiltrován a pevný podíl byl podruhé extrahován výše uvedeným způsobem. Kombinované extrakty byly sodno citrátovým pufrům doplněny do 10 ml odměrné baňky. Směs byla zfiltrována přes filtr o porozitě $0,45 \mu\text{l}$ a dávkována do analyzátoru aminokyselin. Každý vzorek byl analyzován dvakrát.

5.5 Iontově výměnná chromatografie

Směs o objemu $100 \mu\text{l}$ byla automaticky nastříknuta do analyzátoru aminokyselin AAA400. Součástí analyzátoru byla kolona ($55 \times 3,7 \text{ mm}$) naplněná iontoměničem Ostion LG ANG (Ingos, Praha, Česká republika). Detekce probíhala po postkolonové ninhydrinové derivatizaci spektrofotometrickým detektorem (570 nm).

Biogenní aminy byly eluovány podle následujícího programu: pufr A po dobu 0–60 min, pufr B po dobu 60–86 min. Poté byla kolona obnovena $0,2 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ NaOH po dobu 150 minut a stabilizována po dobu 19 minut pufrům A. Teplota kolony byla nastavena na $65 \text{ }^\circ\text{C}$. 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 teplotách $65 \text{ }^\circ\text{C}$ (0–41 min a 111–120 min) a $45 \text{ }^\circ\text{C}$ (41–111 min). Každý vzorek byl analyzován 2×. Biogenní aminy (histamin, tyramin, putrescin, kadaverin) pro přípravu standardu byly získány ze Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, USA. [33].

6 VÝSLEDKY A DISKUZE

V průběhu 174. denního skladování/zrání sýrů holandského typu byla pozorována tvorba biogenních aminů ve všech čtyřech analyzovaných vrstvách.

Od počátku zrání/skladování bylo množství biogenních aminů ve vrstvách II a III obdobné, proto byly 48. den tyto dvě vrstvy spojeny a dále analyzovány jako jedna vrstva (označena jako vrstva II). Takto nově vzniklá II. vrstva měla v pozdějším průběhu obdobný obsah biogenních aminů jako IV. vrstva. Proto byly 97. den tyto vrstvy spojeny a analyzovány společně pod označením vrstva IV.

6.1 Tvorba biogenních aminů v průběhu zrání/skladování

6.1.1 Produkce biogenních aminů v sýrech uložených ve sklepě

U sýrů, které byly skladovány celou dobu pokusu ve sklepě při 10 ± 2 °C bylo pozorováno nejvyšší množství tyraminu (Obr. 2.), putrescinu (Obr. 3.), kadaverinu (Obr. 4.). Histamin nebyl v průběhu celého experimentu detekován v žádném z analyzovaných vzorků.

Nárůst biogenních aminů v tomto režimu byl patrný s prodlužující se dobou zrání. V nejvyšším množství byl detekován putrescin, v nejmenším kadaverin.

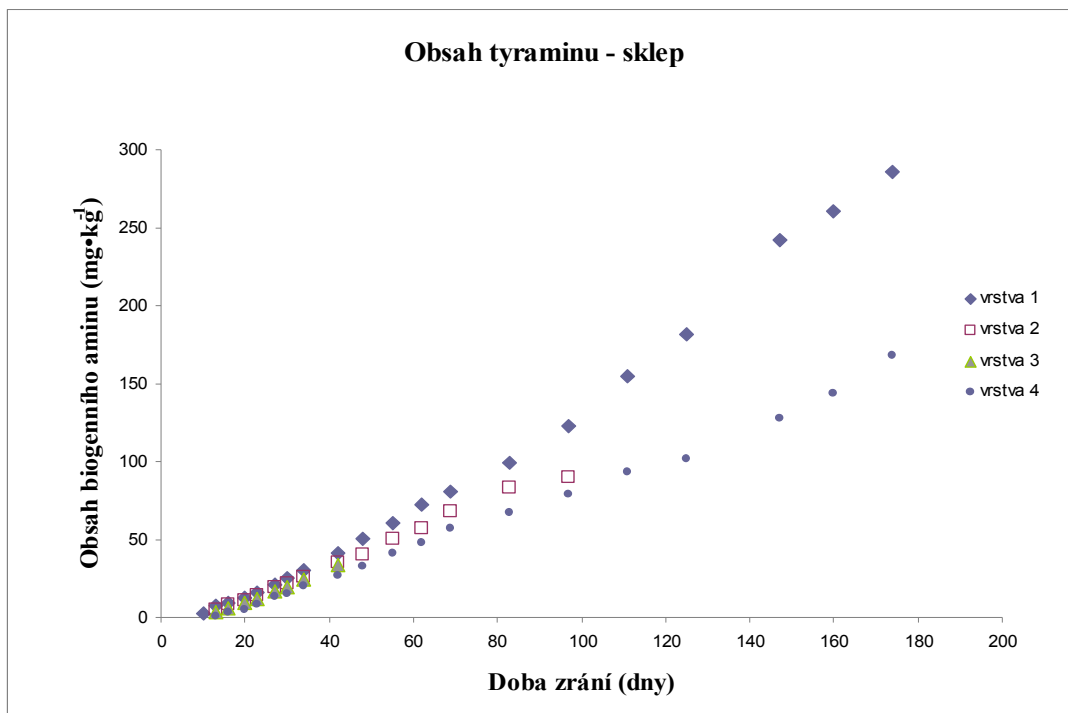
V I. vrstvě bylo 48. den (6. týden), dosaženo obsahu tyraminu $50 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$. Totéž množství putrescinu bylo detekováno o 6 dní dříve. Kadaverin tohoto množství nedosáhl. Jeho maximální koncentrace v I. vrstvě činila $28 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$. Obsah tyraminu v množství vyšším než $100 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ byl zjištěn po 12. týdnu skladování, obsah putrescinu toto množství přesáhl 14. týden skladování. V tomto režimu zrání byl pozorován vyšší obsah kadaverinu než tomu bylo v dalších režimech zrání/skladování, kdy byly sýry ze zracího sklepa přemístěny po 3, respektive 5 týdnech, do lednice.

Tyramin i putrescin byly ve vrstvě II. zastoupeny v menším množství, obsah těchto aminů tvořil zhruba třetinu vzhledem k obsahu v I. vrstvě (Obr. 2 a Obr. 3).

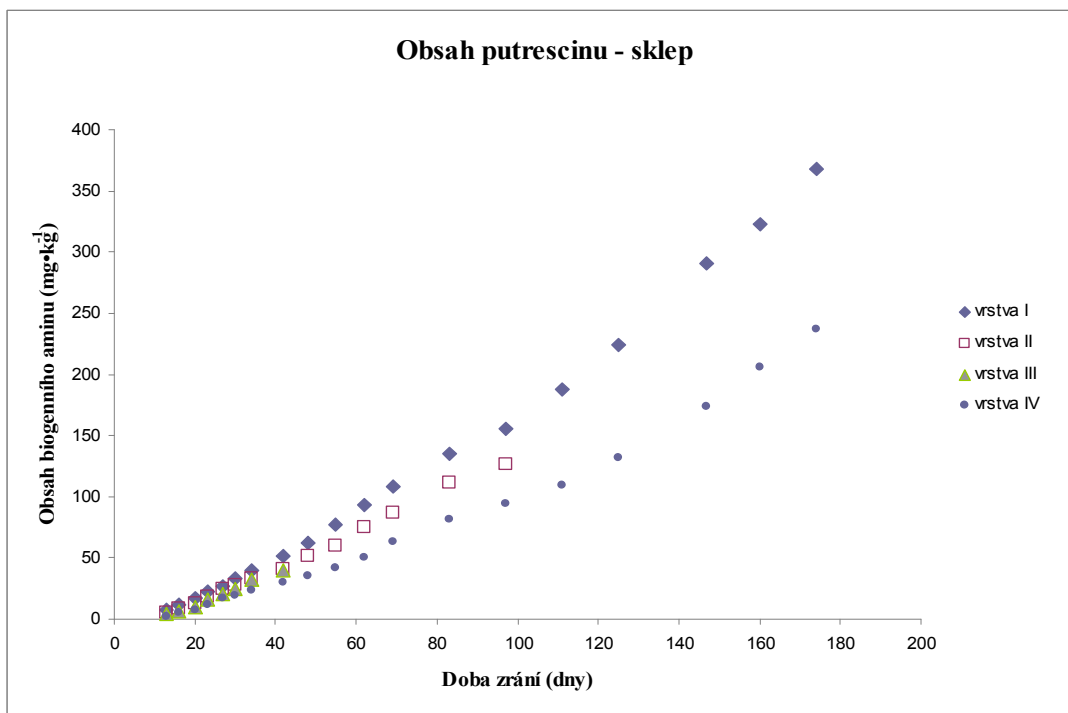
Vnitřní IV. vrstva dosahovala 174. den maxima obsahu biogenních aminů. Tyramin byl zjištěn v koncentraci $168 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, putrescin v množství $237 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ a kadaverin v koncentraci $22,54 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$.

Pokud po 174 dnech srovnáme vnitřní a vnější vrstvu, zjistíme, že vrstva I obsahovala více tyraminu, a to o $117 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, putrescinu o $130 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ a kadaverinu o $5 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$

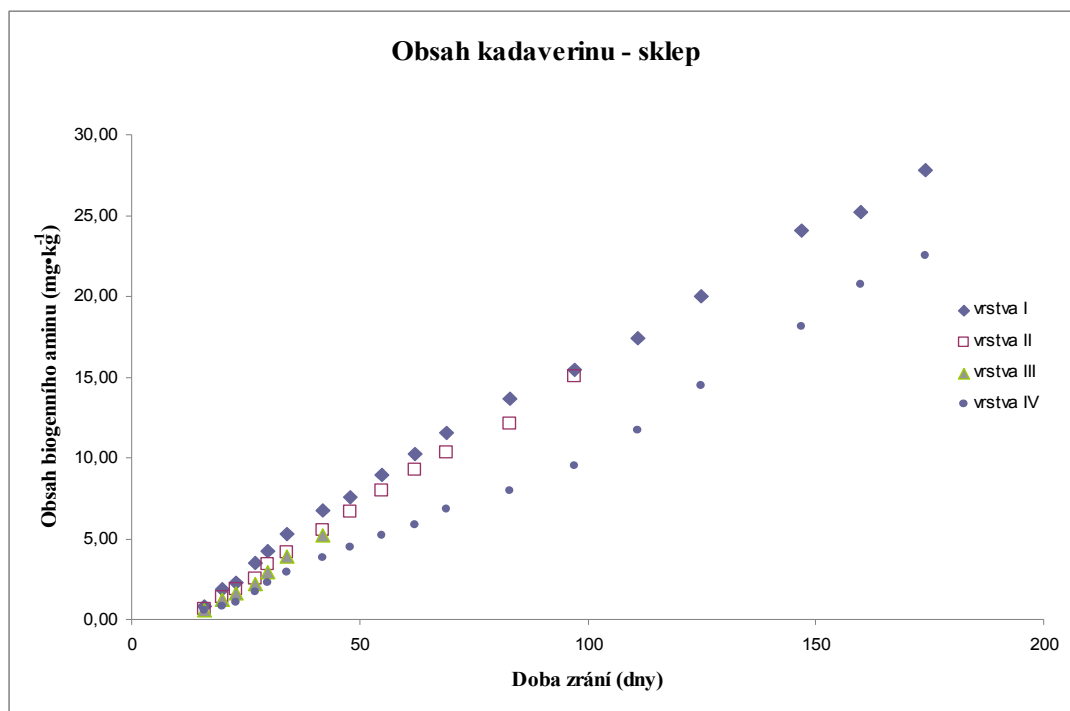
Obr. 2. Vývoj obsahu tyraminu u sýrů uložených ve sklepě



Obr. 3. Vývoj obsahu putrescinu u sýrů uložených ve sklepě



Obr. 4. Vývoj obsahu kadaverinu u sýrů uložených ve sklepe



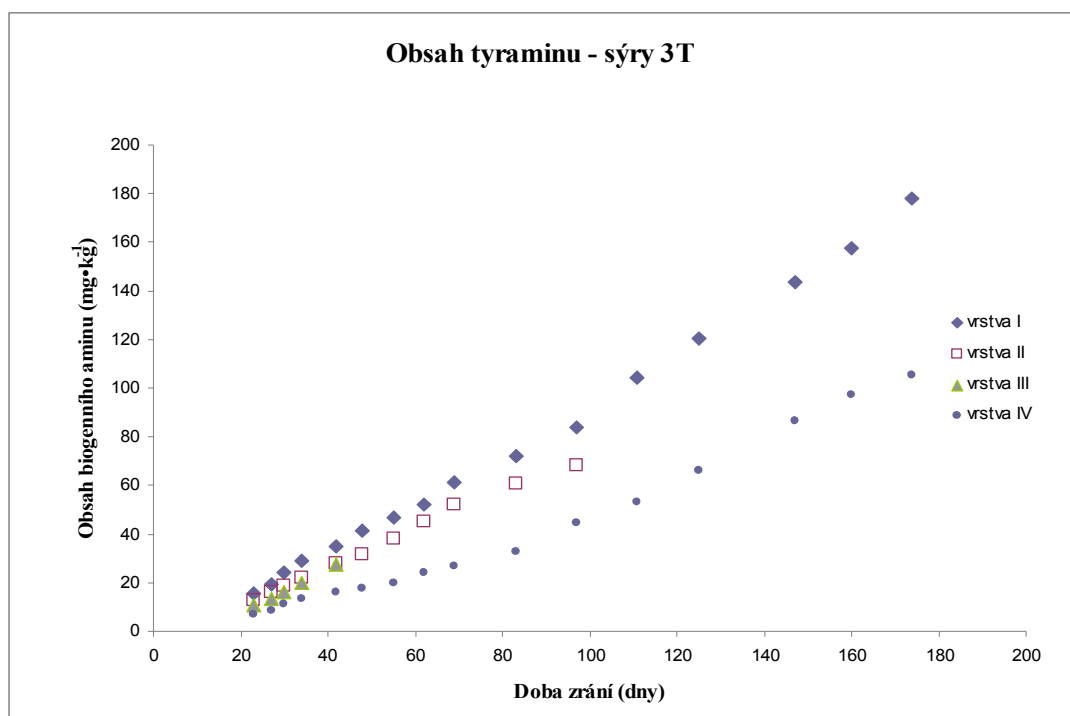
6.1.2 Produkce biogenních aminů v sýrech přemístěných po 3 týdnech do lednice

V průběhu 174. denního experimentu byl ve všech vrstvách eidamského sýra přemístěného po 23 dnech ze zracího sklepa do lednice zaznamenán postupný nárůst biogenních aminů tyraminu (Obr.5), putrescinu (Obr.6), kadaverinu (Obr.7). Histamin nebyl detekován.

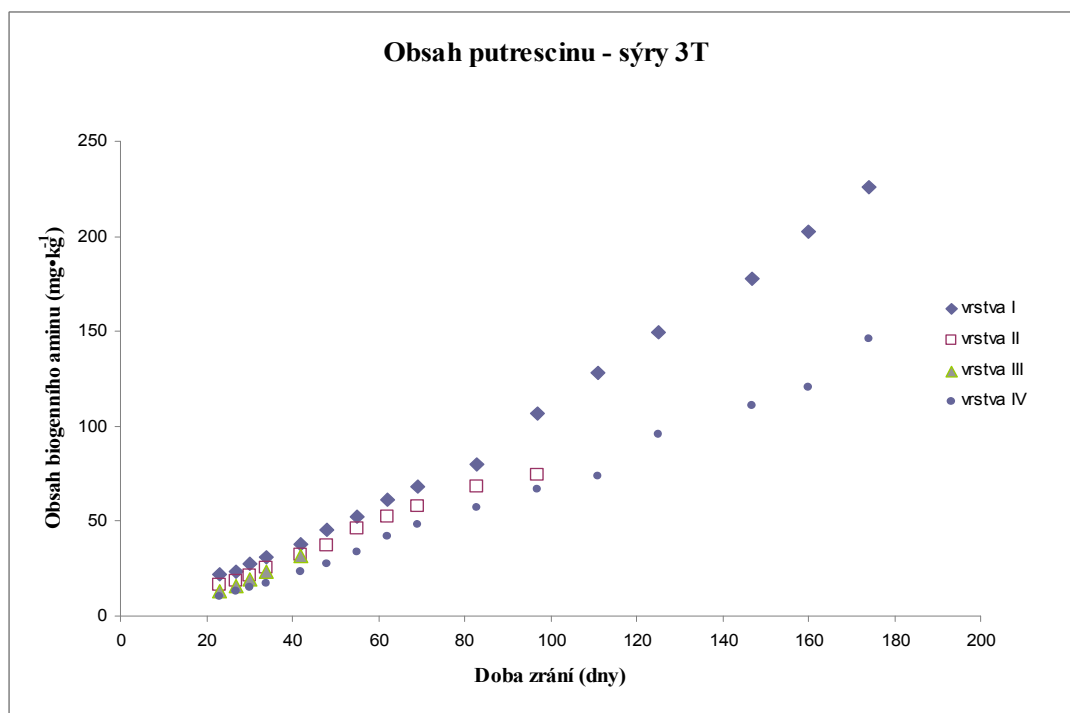
Největší množství biogenních aminů bylo detekováno ve vnějších vrstvách (vrstva I) analyzovaných sýrů přemístěných po 3 týdnech do chladírenských teplot. Biogenní amin tyramin dosáhl v této vrstvě 8. týden skladování v lednici obsahu $50 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, u putrescinu byla tato koncentrace zjištěna 7. týden. Kadaverin této hranice nedosáhl v žádné z testovaných vrstev sýrů tohoto režimu zrání/skladování. Jeho maximální množství bylo dosaženo 174. den v I. vrstvě, a to $20 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$. Ve 111. den dosáhl obsah tyraminu ve svrchní vrstvě $104 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$. Putrescin byl v tomtéž množství detekován zhruba o 2 týdny dříve.

Spojené vrstvy II. a III dosahovaly třetinového množství tyraminu i putrescinu ve srovnání s vrstvou I. Ve spojené IV. vrstvě bylo detekováno zhruba poloviční množství tyraminu 174. den a v téže vrstvě bylo zjištěno zhruba osminová koncentrace putrescinu a kadaverinu ve srovnání s vrstvou I.

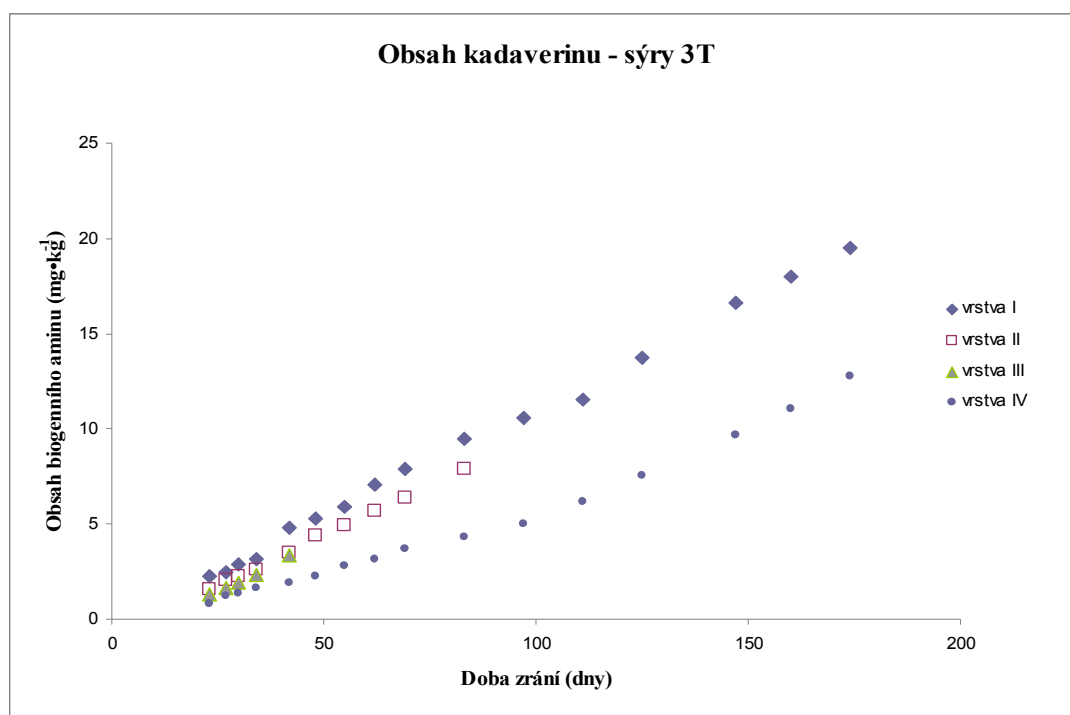
Obr. 5. Vývoj obsahu tyraminu u sýrů přemístěných ze zracího sklepa po 3 týdnech do lednice



Obr. 6. Vývoj obsahu putrescinu u sýrů přemístěných ze zracího sklepa po 3 týdnech do lednice



Obr. 7. Vývoj obsahu kadaverinu u sýrů přemístěných ze zracího sklepa po 3 týdnech do lednice



6.1.3 Produkce biogenních aminů v sýrech přemístěných po 5 týdnech do lednice

Po pěti týdnech byla další část sýrů stejné šarže přesunuta ze zracího sklepa ($10 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$) do prostředí chladírenských teplot ($5 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$). Opět byl pozorován nárůst biogenních aminů tyraminu (Obr. 8), putrescinu (Obr. 9), kadaverinu (Obr. 10), zejména ve vnější vrstvě I.

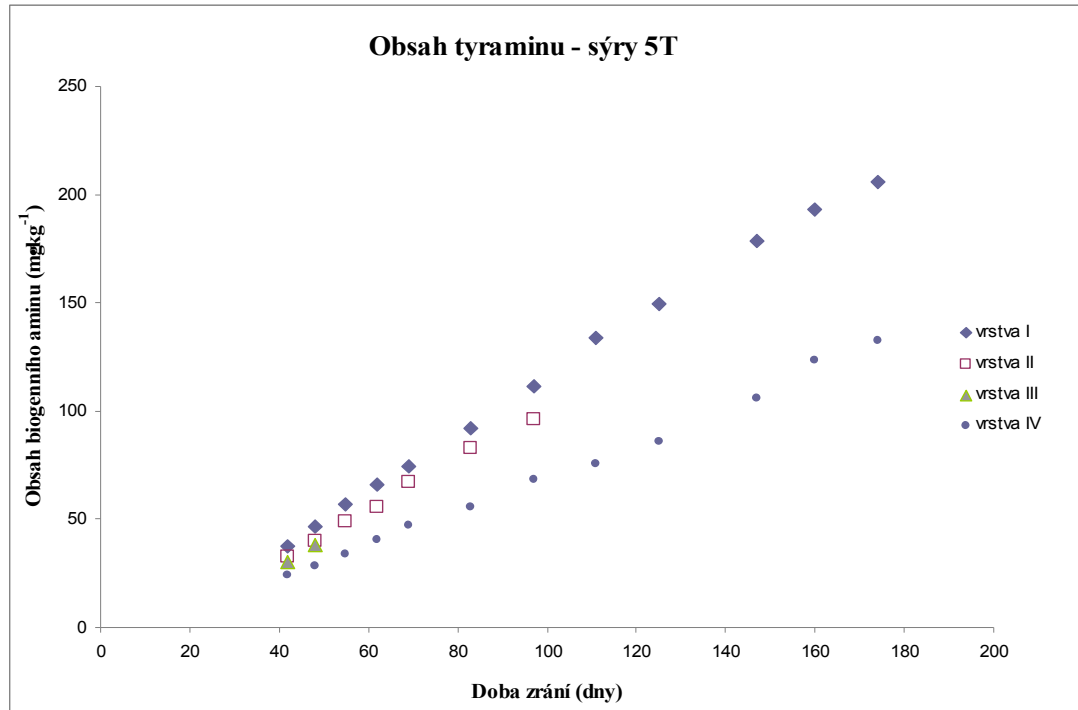
Hranici $50 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ přesáhl tyramin ve vnější vrstvě 55. den (7. týden) a putrescin 48 den (6. týden). Ani v tomto režimu zrání/skladování kadaverin nedosáhl obsahu $50 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, a to ani v jedné z testovaných vrstev. Maximální obsah kadaverinu byl pozorován 174. den, a to cca $24 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ve svrchní vrstvě. Ve IV. vrstvě tentýž den bylo dosaženo obsahu kadaverinu $17 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$.

Ve svrchní vrstvě dosáhl tyramin 13. týden skladování (97. den) koncentrace $96 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ a putrescin až $112 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$.

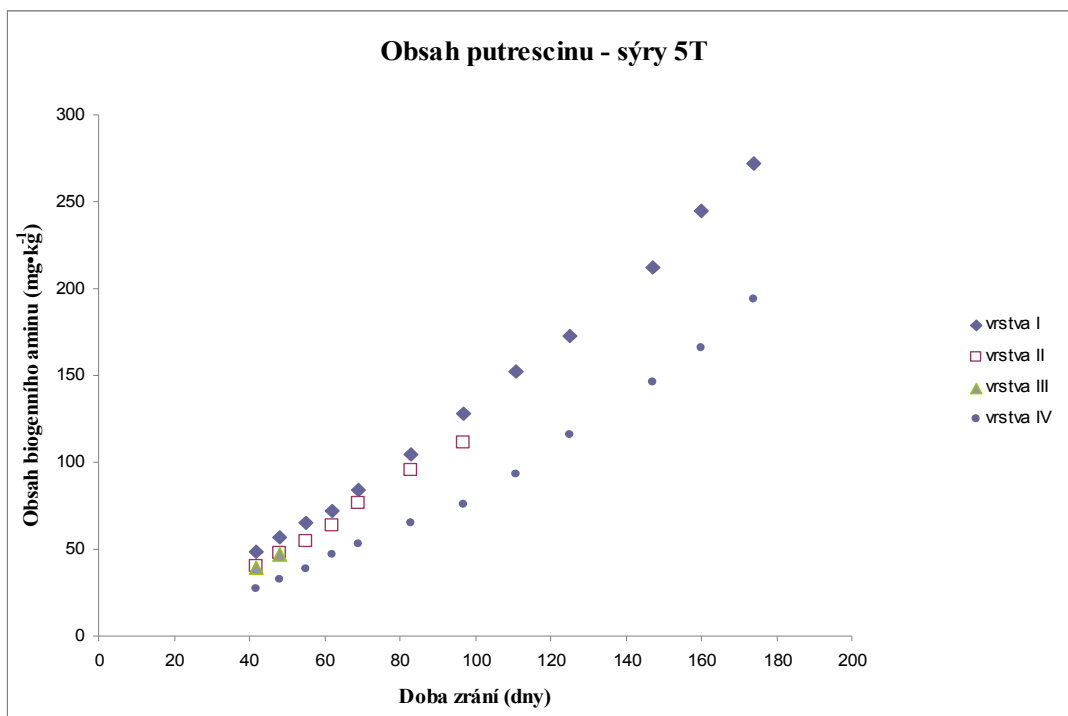
V komplexní IV. vrstvě bylo v tomto režimu zrání/skladování detekováno menší množství biogenních aminů než v I. vrstvě. Obsah $100 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ přesahoval tyramin 21. týden a putrescin tuto hodnotu přesáhl již během 17. týdne.

Srovnáme-li obsah tyraminu a putrescinu v I. a II. vrstvě, tak II. vrstva obsahovala těchto biogenních aminů zhruba o čtvrtinu méně.

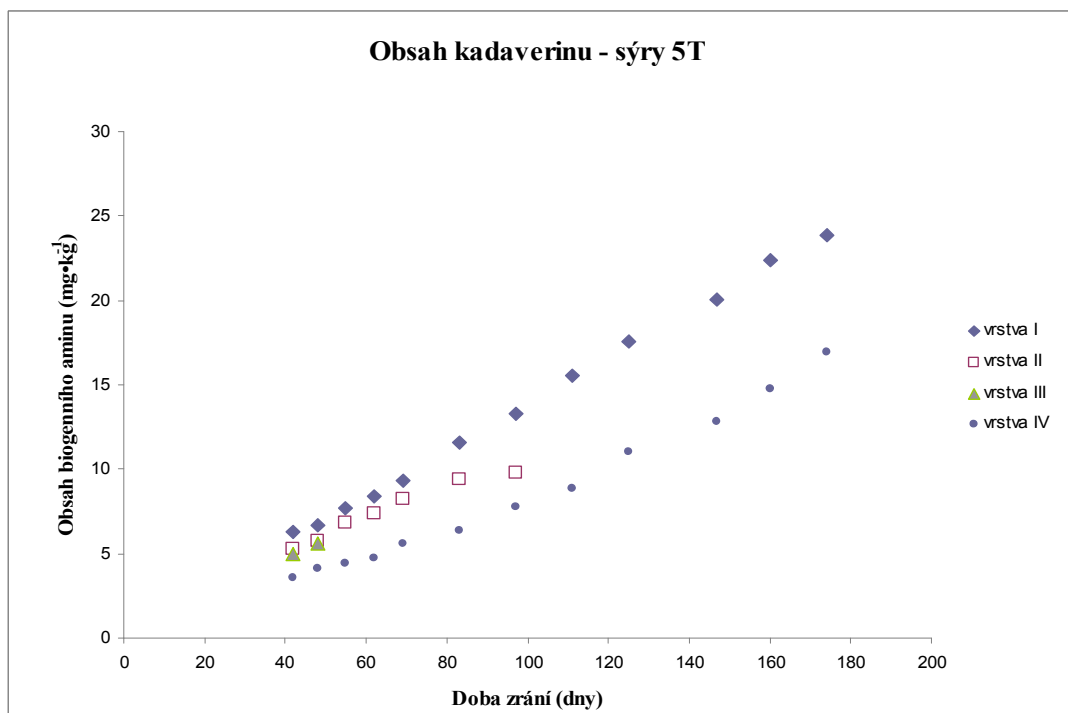
Obr. 8. Vývoj obsahu tyraminu u sýrů přemístěných ze zracího sklepa po 5 týdnech do lednice



Obr. 9. Vývoj obsahu tyraminu u sýrů přemístěných ze zracího sklepa po 5 týdnech do lednice



Obr. 10. Vývoj obsahu kadaverinu u sýrů přemístěných ze zracího sklepa po 5 týdnech do lednice



7 DISKUZE

Obsah biogenních aminů byl u všech testovaných vzorků sýrů vždy vyšší v I. vrstvě než ve vrstvě II., III., IV., a to bez ohledu na režim zrání/skladování.

Putrescin dosahoval dříve vyšších hodnot než tyramin. Kadaverin vzhledem k obsahům tyraminu a putrescinu dosahoval zanedbatelného množství. Biogenní amin histamin nebyl během celého experimentu detekován v žádném z analyzovaných vzorků sýrů uchovávaných během tří různých režimů zrání/skladování.

Stanovení biogenních aminů v potravinách jako jsou histamin, kadaverin, putrescin, spermidin, tyramin je důležité nejen z hlediska jejich toxicity ve vyšších koncentracích, ale také proto, že mohou být užitečným ukazatelem pro stanovení znehodnocení nebo čerstvosti potravin [34].

Množství biogenních aminů bylo odstupňováno v závislosti na režimu zrání/skladování. Nejvyšší hodnoty biogenních aminů byly dosaženy v sýrech, které byly po celou dobu uchovávány při nejvyšší sledované teplotě, tj. ve zracím sklepe (10 ± 2 °C). Při této teplotě se mohou rychleji rozmnožovat bakterie produkující biogenní aminy. Druhý nejvyšší obsah biogenních aminů byl zaznamenán u sýrů, které byly 5. týden přesunuty ze zracího sklepa do lednice 10 ± 2 °C. Naopak nejméně aminů bylo detekováno v sýrech, které byly přemístěny již 3. týden ze sklepa do lednice.

Nižší koncentrace aminů byly pozorovány ve vnitřních vrstvách analyzovaných přírodních sýrů eidamského typu. Naopak nejvyšší koncentrace biogenních aminů byly detekovány ve svrchních vrstvách. K podobným závěrům dospěli také Komprda a kol. [34]. Rozdíly v obsahu biogenních aminů v jednotlivých vrstvách a režimech zrání/skladování analyzovaných přírodních sýrů jsou dány zřejmě schopností růstu mikroflóry s dekarboxylasovou aktivitou. Mikroorganismy jsou schopny tvořit aminy zejména při zrání sýrů při teplotě 10 ± 2 °C, při chladírenské teplotě (5 ± 2 °C) byl rozvoj mikroflóry pomalejší, což se projevilo na produkci biogenních aminů.

Komprda a kol. [35] rovněž upozorňují na nebezpečné zvýšení koncentrace biogenních aminů, pokud jsou sýry skladovány více jak 150 dnů.

Krause a kol. [36] zkoumali, jakou má baktofugace mléka účinnost na snížení biogenních aminů v sýrech ementálského typu. Baktofugace mléka s 90% účinností vedla téměř

k úplnému snížení koncentrací putrescinu a kadaverinu. Naopak nijak podstatně neovlivnila tvorbu histaminu, tyraminu a 3-methylbutylaminu.

Kvalita konečného výrobku sýra závisí na kvalitě výchozí suroviny. Silla-Santos [13] ve své práci uvádí základní principy redukce biogenních aminů v potravinách.

1. Výběr kvalitních surovin bez vysoké koncentrace biogenních aminů a mikrobiologické kontaminace.
2. Dodržovat správnou hygienickou praxi. Provádět systematické kontroly každého kroku výroby. Zejména čistota zařízení a prostředí mají vliv na nárůst mikroorganismů produkujících biogenní aminy.
3. Výběr vhodných startovacích kultur pro fermentované potraviny.
4. Přihlédnout nejen k výši koncentrace biogenních aminů v potravíně, ale také k přítomnosti potenciátorů (alkohol, přítomnost jiných aminů), které mohou zvyšovat toxickou aktivitu biogenních aminů.
5. Kontrola podmínek skladování. Původní koncentrace biogenních aminů se mění v průběhu skladování.
6. Koncentrace biogenních aminů se mění v závislosti na skladování. Vhodné skladovací podmínky, mohou snižovat.

Bodmer a kol. [27] definovali, za jakých podmínek výroby může dojít k potlačení nárůstu biogenních aminů. Podobně jako Silla-Santos [13] kladou důraz na použití vysoce kvalitních surovin beze stop biogenních aminů, zejména histaminu. Za naprosto nezbytné shledávají správné a pečlivé zpracování (sběr, doprava, skladování) surovin, výběr vhodných dekarboxylasa negativních startovacích kultur pro fermentované potraviny. Samotný proces fermentace by měl být přísně kontrolován a samotný proces výroby by měl být začleněn do specifického systému jakosti jako je DIN EN ISO 9000.

Dadáková a kol. [37] i Mayer a kol. [38] označují ultra-kapalinovou chromatografii (UPLC) jako rychlou a spolehlivou metodu pro detekci biogenních aminů v sýrech. Mayer a kol. [38] shledávají metodu UPLC ve srovnání s vysokotlakou kapalinovou chromatografickou metodou (HPLC) rychlejší, citlivější, účinnější. HPLC metoda je méně vhodná pro stanovení biogenních aminů v některých sýrech jako je Ementál a Gouda.

Komprda a kol. [35] upozorňuje spotřebitele rizikových skupin (pacienti užívající léky s inhibicí MAO enzymu) před konzumací sýrů holandského typu, které zrály více jak 5 měsíců. Spotřebitelé by u tohoto typu sýra měli odstranit nejméně 3 cm vnější části, kde koncentrace biogenních aminů je nejvyšší.

Je tedy nasnadě, zda do spotřebitelské sítě uvádět sýry nezralé, s nižší koncentrací biogenních aminů, avšak s výrazně sníženou organoleptickou hodnotou nebo expedovat sýry, u kterých proběhlo u producenta zrání ve vyšší míře při vyšší teplotě, a tím podstoupit riziko, že koncentrace některých biogenních aminů stoupne na tolik, že by mohla překročit daný limit a přímo ohrozit zdravotní stav spotřebitele.

Produkce biogenních aminů byla zjištěna i u technologicky významných bakterií mléčného kvašení [39]. Z tohoto důvodu lze doporučit, aby kultury mikroorganismů, které se používají při výrobě fermentovaných potravin, byly testovány na produkci biogenních aminů. Na základě těchto testů by měla proběhnout selekce a vyřazení kmenů s vysokou produkcí biogenních aminů, čímž by bylo možné zvýšit bezpečnost fermentovaných výrobků.

ZÁVĚR A DOPORUČENÍ

V průběhu 174 dnů byl sledován obsah biogenních aminů ve 4 vrstvách sýrů holandského typu. Byly zjištěny následující výsledky:

- byly detekovány biogenní aminy kadaverin, putrescin, tyramin,
- histamin nebyl detekován v průběhu celého experimentu v žádném z testovaných vzorků,
- nejvyšší koncentrace biogenních aminů byla detekována v režimu, kdy sýry byly uloženy po celou dobu pokusu ve zracím sklepě (10 ± 2 °C),
- nejnižší koncentrace byla detekována v režimu, kdy sýry byly vytaženy po 3. týdnu ze sklepa do lednice (5 ± 2 °C),
- nejvyšší obsah biogenních aminů byl ve svrchní vrstvě,
- nejnižší obsah biogenních aminů byl zaznamenán ve vnitřní vrstvě.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] SHALABY, A. R. Significance of biogenic amines to food safety and human health. *Food Research International*. 1996, 19 (7), p. 675–690.
- [2] SMĚLÁ, D., et al. Chromatografické stanovení biogenních aminů v trvanlivých salámech během fermentace a skladování. *Chemické listy*. 2004, 98 (7), s. 432–437. ISSN 0009–2770.
- [3] VESELÁ, M.; DRDÁK, M.; STANDARA, S. Relation between free amino acids and the biogenic amines contents in green tomatoes inoculated with *Lactobacillus plantarum*. *Czech Journal of Food Sciences*. 2003, 21 (2), p. 51–58. ISSN 1212–800.
- [4] NOVELLA-RODRÍGUEZ, S.; VECIANA-NOGUÉS, M. T.; VIDAL-CAROU, C. Biogenic Amines and Polyamines in Milks and Cheeses by Ion-Pair High Performance Liquid Chromatography. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2000, 48 (11), p. 5117–5123.
- [5] ALIAKBARU, J., et al. Effects of processing factors on biogenic amines production in iranian white brine cheese. *Research Journal of Biological Sciences*. 2009, 4 (1), p. 23–28. ISSN 1815–8846.
- [6] SILLA SANTOS, M.H.: Biogenic amines: their importance in foods. *International Journal of Food Microbiology*, 1996, 29 (2–3), p. 213–231.
- [7] O, N. M., et al. Toxins in cheese. In FOX, P. F., et al. (ed.). *Cheese: chemistry, physics, and microbiology*. United Kingdom: Elsevier Academic Press, 2007. ISBN 0–12–263652–X.
- [8] KORDIOVSKÁ, P. The dynamics of biogenic amine formation in muscle tissue of carp (*Cyprinus carpio*). *Czech Journal of Animal Science*. 2006, 51 (6), p. 262–270.
- [9] KUBÁŇ, V.; KUBÁŇ, P. *Analýza potravin*. Vyd. 1. Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, 2007. 203 s. ISBN 978–80–7375–036–7.
- [10] Česká republika. Vyhláška, kterou se stanoví druhy kontaminujících a toxikologicky významných látek a jejich přípustné množství v potravinách. In *Sbírka*

- předpisů, Česká republika. 2004, 2004, 100/2004 Sb., č. 305 (ve znění pozdějších předpisů), s. 6398–6406.*
- [11] KOHAJDOVÁ, Z.; KAROVIČOVÁ, J.; GREIF, G. Biogénne amíny v potravinách. *Potravinárstvo. 2008, 2, (1), s. 30–49.*
- [12] DRÁČKOVÁ, M., et al. Stanovení obsahu polyaminů v tvarůžcích pomocí blízké infračervené reflektanční spektrometrie. *Acta fytotechnica et zootechnica. 2009, 12, (Mimoriadne – Special), s. 121–126.*
- [13] SILLA SANTOS, M. H. Toxic nitrogen compounds produced during processing: biogenic amines, ethyl carbamides, nitrosamines. In ADAMS, M. R.; NOUT, M.J. R. (ed.). *Fermentation and food safety*. United States of America: Springer - Verlag, 2001. EAN: 978–0–306–48296–0.
- [14] IZQUIERDO-PILIDO, M., et al. Polyamine and biogenic amine evolution during food processing. In BARDÓCZ, S.; WHITE, A. (ed.). *Polyamines in health and nutrition*. United States of America: Springer, 1999. ISBN 0–412–82220–2.
- [15] STANDAROVÁ, E.; VORLOVÁ, L.; BORKOVCOVÁ, I. Zastoupení vybraných biogenních aminů v sýrech s bílou plísní na povrchu. *Acta fytotechnica et zootechnica. 2009, 12 (Mimoriadne – Special), s. 610–617.*
- [16] KAROVIČOVÁ, J.; KOHAJDOVÁ, Z. Biogenic amines in food. *Chemical papers. 2003, 1 (59), s. 70–79.*
- [17] VELÍŠEK, J.: *Chemie potravin 3. 2. vydání upravené*. OSSIS, Tábor, 2002, 368 str., ISBN 80–86659–02–X.
- [18] TŮMA, Š.; PLOCKOVÁ, M. Protektivní kultury pro výrobu polotvrdých sýrů. In ŠTĚTINA, J.; ČURDA, L. *Celostátní přehlídky sýrů 2007 : Výsledky přehlídek a sborník přednášek semináře „Mléko a sýry“*. Praha 6: Vysoká škola chemicko technologická v Praze, 2007. s. 31–36.
- [19] DRÁČKOVÁ, M., et al. Využití blízké infračervené reflektanční spektroskopie pro stanovení obsahu histaminu ve tvarůžcích. In *Rizikové faktory potravinového reťazca*. Nitra : Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre. Fakulta biotechnológie a potravinárstva, 2007. ISBN 978–80–8069–948–2.

- [20] HALÁZS, A., BARÁTH Á., SIMON-SARKADI, L., HOLZAPFEL, W.: Biogenic amines and their production by microorganisms in food. *Trends in Food Science & Technology*, 1994, 5 (2), p. 42–49.
- [21] DIČÁKOVÁ, Z.; DUDRIKOVÁ, E. Biogénne amíny ako chemické nebezpečenstvo. In *Rizikové faktory potravinového reťazca*. Nitra: Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre. Fakulta biotechnológie a potravinárstva, 2006. ISBN 80–8069–760–4.
- [22] STANDARDOVÁ, E.; VORLOVÁ, L.; BORKOVCOVÁ, I. Zastoupení vybraných biogenních aminů v sýrech s bílou plísní na povrchu. In . *Acta fylotechnica et zootechnica*. Nitra: Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, 2009. ISSN 1336–9245.
- [23] KAROVIČOVÁ, J.; KOHAJDOVÁ, Z. Biogenic amines in food. *Chemical papers*. 2005, 59 (1), p. 70–79. ISSN 0366–6352.
- [24] GEMPERLOVÁ, L. *Studium metabolismu polyaminů v beněčném dělení a jejich úloha ve fyziologických pochodech rostlin*. Praha, 2009. s. 1–16. Dizertační práce. Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, Katedra fyziologie rostlin.
- [25] CHAMUL, R. S. Shelf life of meat. In NOLLET, L. M. L., et al. (ed.). *Handbook of meat poultry and seafood quality*. United States of America: Blackwell Publishing, 2007. ISBN 978–0–8138–2446–8.
- [26] FLICK, G. J.; GRANATA, L. A. Biogenic amines in foods. In DĄBROWSKI, W. M.; SIKORSKI, Z. E. (ed.). *Toxins in food*. United States of America: CRC Press, 2007. ISBN 0–8491–1904–8.
- [27] BODMER, S.; IMARK, C.; KNEUBÜHL, M. Biogenic amines in foods: histamine and food processing. *Inflammation Research*. 1999, 48 (6), p. 296–300. ISSN 1023–3830.
- [28] KADLEC, P., et al. *Technologie potravin II*. Vyd. 1. Praha 6: Vysoká škola chemicko–technologická v Praze, Vydavatelství VŠCHT v Praze , 2002 (2007 dotisk). 236 s. ISBN 80–7080–510–2.

- [29] HRABĚ, J.; BŘEZINA, P.; VALÁŠEK, P. *Technologie výroby potravin živočišného původu*. Vyd. 1. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2006. 180 s. ISBN 80-7318-405-2.
- [30] GÖRNER, F., VALÍK, L.: *Aplikovaná mikrobiológia požívatin* 1. vydání. Malé Centrum, Bratislava, 2004, 528 s. ISBN 80-967064-9-7.
- [31] MAIJALA, R.; EEROLA, S. Biogenic amines. In ROGINSKI, H.; FUQUAY, J. W.; FOX, P. F. *Encyclopedia of dairy sciences*. United Kingdom: Academic Press, 2003. ISBN 0-12-227236-6.
- [32] KÜÇÜKÖNER, E.; HAQUE, Z. U. Physico-chemical and rheological properties of full fat and low fat edam cheeses. *European Food Research and Technology*. 2003, 217 (4), p. 281-286. ISSN 1438-2377.
- [33] HLOBILOVÁ, M. *Srovnání metod pro detekci biogenních aminů u bakterií mléčného kvašení*. Zlín, 2008. 9-82 s. Diplomová práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně.
- [34] ÖNAL, A. A review: Current analytical methods for the determination of biogenic amines in foods. *Food Chemistry*. 2007, 103 (4), p. 1475-1486.
- [35] KOMPRDA, T., et al. Tyramine production in Dutch-type semi-hard cheese from two different producers. *Food Microbiology*. 2008, 25, (2), p. 219-227.
- [36] KARAUSE, I.; BOCKHARDT, A.; KLOSTERMEYER, H. Characterization of cheese ripening by free amino acids and biogenic amines and influence of bacterio-fugation and heat-treatment of milk. *Lait*. 1997, 77 (1), p. 101-108.
- [37] DADÁKOVÁ, E.; KŘÍŽEK, M.; PELIKÁNOVÁ, T. Determination of biogenic amines in foods using ultra-performance liquid chromatography (UPLC). *Food Chemistry*. 2009, 116 (1) p. 365-370.
- [38] MAYER, H. K.; FIECHTER, G.; FISCHER, E. A new ultra-pressure liquid chromatography method for the determination of biogenic amines in cheese. *Journal of Chromatography A*. 2010, 1217 (19), p. 3251-3257.
- [39] BUŇKOVÁ L., BUŇKA F., HLOBILOVÁ M., VAŇÁTKOVÁ Z., NOVÁKOVÁ D., DRÁB V., Tyramine production of technological important strains of *Lactoba-*

cillus, Lactococcus and Streptococcus, European Food Research and Technology.
2009, 229, p. 533–538.

Seznam použitých symbolů a zkratk

Agm	Agmatin
His	Histamin
HPLC	Vysoce účinná kapalinová chromatografie
Kad	Kadaverin
MAO	Monoamin oxidasa
Phe	Fenylethylamin
Put	Putrescin
Spd	Spermidin
Spn	Spermin
Trp	Tryptofan
Tyr	Tyramin
UPLC	Ultra-kapalinová chromatografie

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1. Hlavní reakce biogenních aminů	13
Obr. 2. Vývoj obsahu tyraminu u sýrů uložených ve sklepě.....	34
Obr. 3. Vývoj obsahu putrescinu u sýrů uložených ve sklepě	34
Obr. 4. Vývoj obsahu kadaverinu u sýrů uložených ve sklepě	35
Obr. 5. Vývoj obsahu tyraminu u sýrů přemístěných ze zracího sklepa po 3 týdnech do lednice	36
Obr. 6. Vývoj obsahu putrescinu u sýrů přemístěných ze zracího sklepa po 3 týdnech do lednice	36
Obr. 7. Vývoj obsahu kadaverinu u sýrů přemístěných ze zracího sklepa po 3 týdnech do lednice	37
Obr. 8. Vývoj obsahu tyraminu u sýrů přemístěných ze zracího sklepa po 5 týdnech do lednice	38
Obr. 9. Vývoj obsahu tyraminu u sýrů přemístěných ze zracího sklepa po 5 týdnech do lednice	39
Obr. 10. Vývoj obsahu kadaverinu u sýrů přemístěných ze zracího sklepa po 5 týdnech do lednice	39

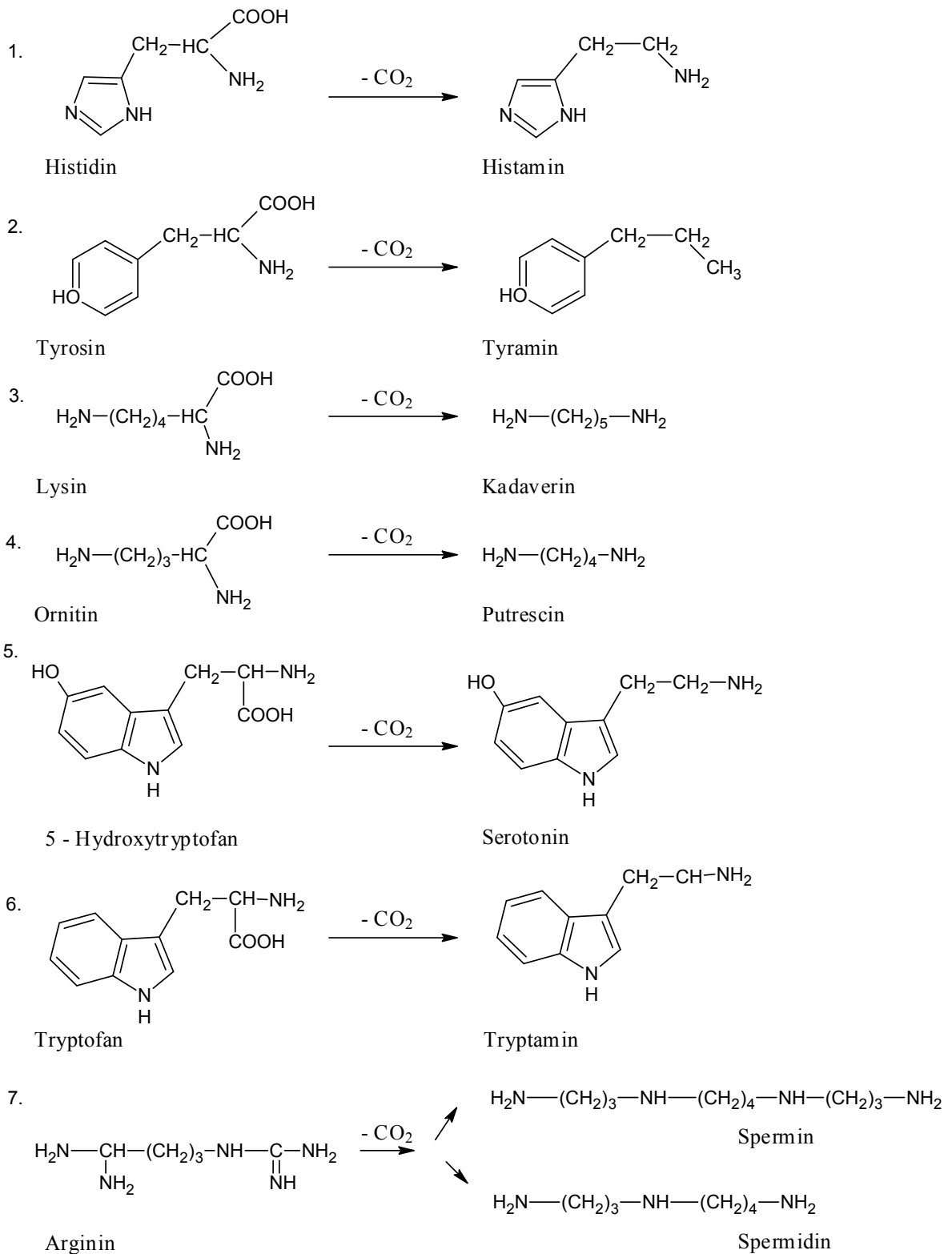
SEZNAM TABULEK

Tab. 1. Faktory ovlivňující dekarboxylasovou aktivitu mikroorganismů	12
Tab. 2. Mikroorganismy produkující biogenní aminy	14
Tab. 3. Obsah histaminu v mléce a mléčných výrobcích. Zvýšení obsahu histaminu během zpracování mléka na jednotlivé mléčné produkty	19
Tab. 4. Koncentrace [$\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$] biogenních aminů v závislosti na druhu sýrů	20
Tab. 5. Fermentace sacharidů mléka bakteriemi mezofilní zákysové kultury při výrobě sýrů s nízko dohřívanou sýřeninou	26

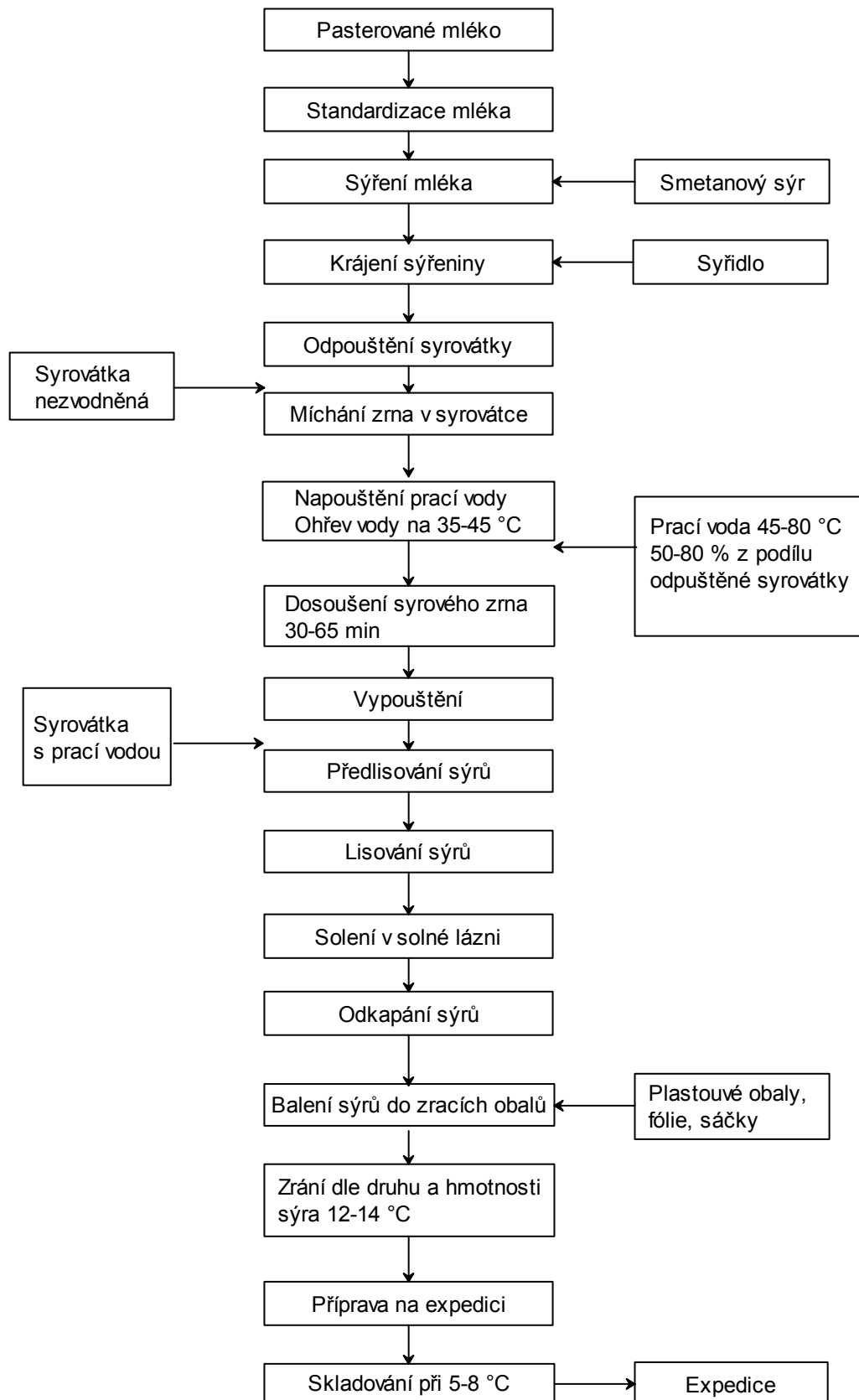
SEZNAM PŘÍLOH

- P. I Vznik biogenních aminů
- P. II Výroba sýrů s nízkodohřívanou sýřeninou
- P. III Článek publikovaný ve vědeckém časopise

PŘÍLOHA P I: VZNIK BIOGENNÍCH AMINŮ



PŘÍLOHA P II: VÝROBA SÝRŮ S NÍZKODOHŘÍVANOU SÝŘENINOU





Contents lists available at ScienceDirect

Food Microbiology

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



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

Leona Buňková^{a,*}, František Buňka^b, Gabriela Mantlová^b, Andrea Čablová^b, Ivo Sedláček^c, Pavel Švec^c, Vendula Pachlová^d, Stanislav Kráčmar^d

^aDepartment of Fats, Tensides and Cosmetics Technology, Faculty of Technology, Tomas Bata University in Zlín, nam. T.G. Masaryka 275, 763 19 Zlín, Czech Republic

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

^cCzech Collection of Microorganisms, Department of Experimental Biology, Faculty of Science, Masaryk University, Tvrđého 14, Brno, Czech Republic

^dDepartment of Biochemistry and Food Analysis, Faculty of Technology, Tomas Bata University in Zlín, nam. T.G. Masaryka 275, Zlín, Czech Republic

ARTICLE INFO

Article history:

Received 2 February 2010

Received in revised form

24 April 2010

Accepted 26 April 2010

Available online xxx

Keywords:

Biogenic amines

Dutch-type cheese

Ion-exchange chromatography

Phenotype characterization

Repetitive sequence-based PCR

fingerprinting

ABSTRACT

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

© 2010 Published by Elsevier Ltd.

1. Introduction

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

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

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

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

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

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

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

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

2. Materials and methods

2.1. Cheese sampling

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

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

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

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

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

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

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

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

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

2.3. Identification

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

2.3.1. Phenotyping

The catalase test was done by dispersing bacterial cells in 3% H₂O₂. The tests for growth at 15 and 45 °C were performed in MRS broth (Merck, Darmstadt, Germany). Gas production from glucose and NH₃ production from arginine were performed according to Svec et al. (2005, 2009). Further biochemical characterization was done by API 50 CH kit (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) according to the manufacturer's instructions. Evaluation of the biochemical test results and species identification were achieved by using the Internet identification tool Apiweb (bioMérieux; <https://apiweb.biomerieux.com/>) and identification software BactSelect v 8.0 (LMD, Delft, The Netherlands).

2.3.2. Repetitive sequence-based PCR fingerprinting

The rep-PCR fingerprinting using the (GTG)₅ primer (5'-GTG GTG GTG GTG-3') was performed according to Svec et al. (2005, 2009). Briefly, bacterial DNA was isolated by alkaline extraction procedure. In total, 1 µL of cell lysate and 24 µL of a PCR mixture containing 1 µmol/L of (GTG)₅ primer, 200 µmol/L of each dNTP, 2 U of Taq DNA polymerase (New England Biolabs, County Road, USA) and 2.5 µL of 10× ThermoPol Reaction Buffer supplied with the Taq DNA polymerase (100 mmol/L KCl, 100 mmol/L (NH₄)₂SO₄, 200 mmol/L Tris-HCl, 20 mmol/L MgSO₄, 0.1% Triton X-100; pH 8.8) were included into PCR reactions performed in Tpersonal ThermoCycler (Biometra, Goettingen, Germany). The initial denaturation at 94 °C for 7 min was followed by 30 cycles of denaturation at 94 °C for 1 min, primer annealing at 40 °C for 1 min, and extension at 65 °C for 8 min. The last cycle was followed by the final elongation at 65 °C for 16 min. The PCR products obtained were separated in 1.5% agarose gels (200 × 250 mm) for 16 h at 60 V (≈ 1.7 V/cm) in 0.5× TBE buffer (Fluka, Buchs, Switzerland). The resulting fingerprints were digitised and processed using BioNumerics version 4.601 software (Applied-Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium). The rep-PCR profiles were compared to the in-house (GTG)₅-PCR database of the Czech Collection of Microorganisms comprising multiple type and representative LAB strains. The dendrogram was calculated with Pearson's correlation coefficients by means of unweighted pair group method using arithmetic averages (UPGMA) clustering method.

2.4. Biogenic amines analysis

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

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

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

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

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

3. Results

3.1. Biogenic amines content in the individual layers

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

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

The development of tyramine, putrescine and cadaverine in the 4 layers of Edam-cheese block tested during the 3 ripening/storage regimes is illustrated in Figs. 1–3 (parts A–C). In all ripening/storage regimes tested, the highest content of tyramine, putrescine and cadaverine was found in the edge. On the other hand, the lowest content was detected in the cheese core. This significant difference ($P < 0.01$) in the content of tyramine, putrescine and cadaverine between the edge and core is evident mainly from the 30th day on, regardless of the ripening/storage regime. From the beginning of ripening/storage, the content of tyramine, putrescine and cadaverine in the layers II and III was very similar ($P \geq 0.05$) and therefore, from the 56th day on, these two layers were joined and analysed as one layer. The values of tyramine, putrescine and cadaverine content in the layers II and III were always between the values of these biogenic amines in the edge and core. In most cases, the difference between the layers II and III and the edge and core was significant ($P < 0.01$).

Also, as it follows from Figs. 1–3, there is dependence of tyramine, putrescine and cadaverine content in the Edam-cheeses tested on the ripening/storage regime. The cheeses kept for the whole ripening period in the ripening cellar at a temperature of 10 °C (Figs. 1–3, parts C) had, in all layers tested, the highest content of tyramine, putrescine and cadaverine in comparison with the other two ripening/storage regimes. Comparison of the content of the above-mentioned biogenic amines in the cheese edge within the 3 ripening/storage regimes tested is illustrated in Figs. 1–3, parts D. The lowest values of tyramine, putrescine and cadaverine content were found in all layers of the products kept for the first 23

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

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

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

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

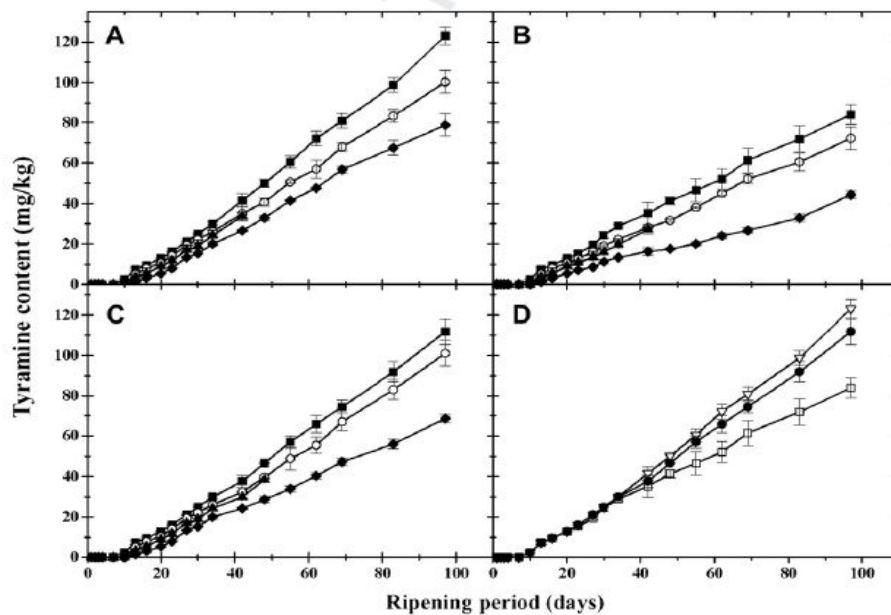


Fig. 1. The dependence of tyramine content (mg/kg) in Edam-cheese on the ripening period (days): A – storage in cellar at 10 ± 2 °C for the whole period; B – after 3 weeks of storage in cellar removed to the fridge and stored at 5 ± 1 °C; C – after 5 weeks of storage in cellar removed to the fridge and stored at 5 ± 1 °C; ■ – the first layer, ○ – the second layer; ▲ – the third layer; ◆ – the fourth layer. In D – part, summary of the tyramine content in the first layer in three storage modes: ▼ – the whole period in cellar at 10 ± 2 °C; □ – after 3 weeks of storage in cellar removed to the fridge and stored at 5 ± 1 °C; ● – after 5 weeks of storage in cellar removed to the fridge and stored at 5 ± 1 °C. The tyramine content was expressed as mean; bars represent S.D. ($n = 24$).

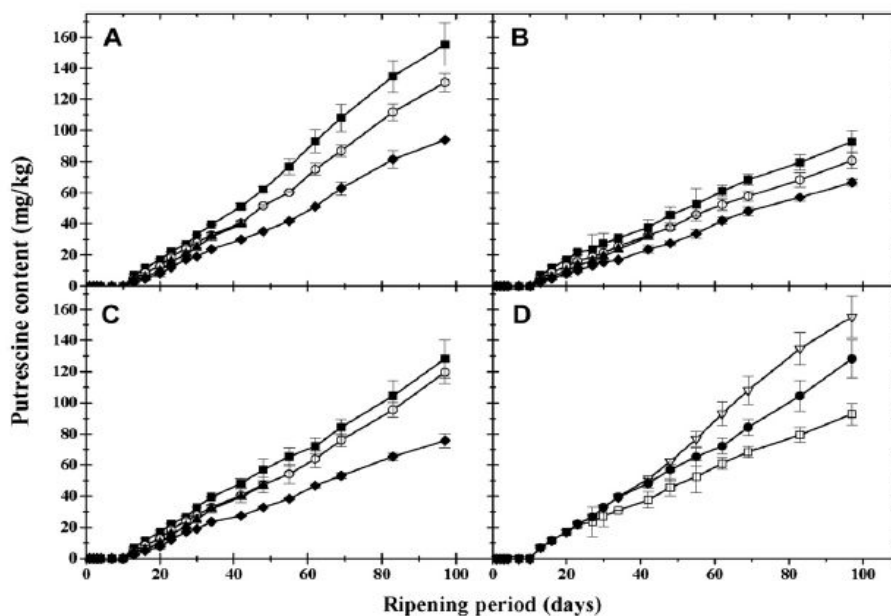


Fig. 2. The dependence of putrescine content (mg/kg) in Edam-cheese on the ripening period (days): A – storage in cellar at 10 ± 2 °C for the whole period; B – after 3 weeks of storage in cellar removed to the fridge and stored at 5 ± 1 °C; C – after 5 weeks of storage in cellar removed to the fridge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

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

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

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

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

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

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

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

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

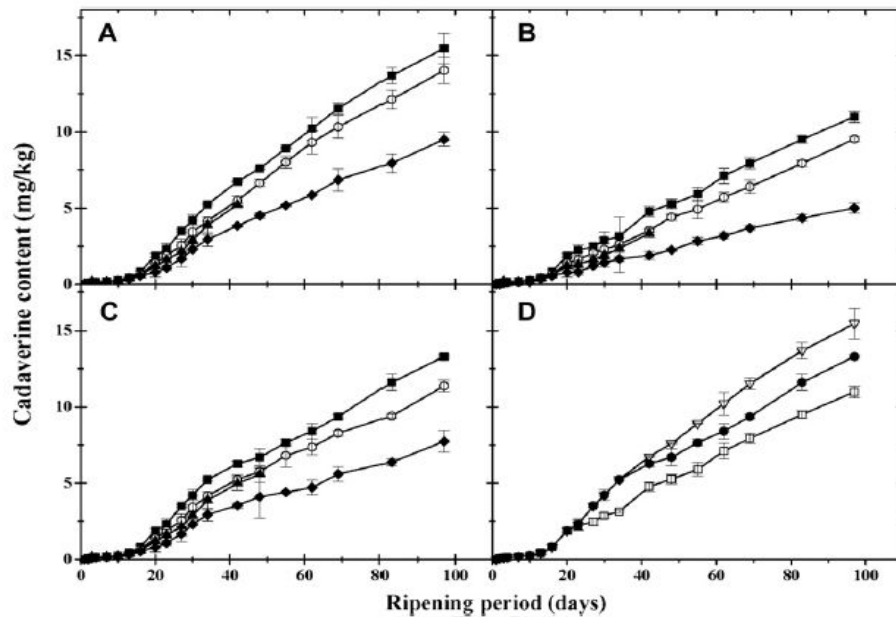


Fig. 3. The dependence of cadaverine content (mg/kg) in Edam-cheese on the ripening period (days): A – storage in cellar at 10 ± 2 °C for the whole period; B – after 3 weeks of storage in cellar removed to the fridge and stored at 5 ± 1 °C; C – after 5 weeks of storage in cellar removed to the fridge and stored at 5 ± 1 °C; ■ – the first layer, ○ – the second layer; ▲ – the third layer; ◆ – the fourth layer. In D – part, summary of the cadaverine content in the first layer in three storage modes: ▽ – the whole period in cellar at 10 ± 2 °C; □ – after 3 weeks of storage in cellar removed to the fridge and stored at 5 ± 1 °C; ● – after 5 weeks of storage in cellar removed to the fridge and stored at 5 ± 1 °C. The cadaverine content was expressed as mean; bars represent S.D. ($n = 24$).

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

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

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

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

Day of the ripening period	Regime of ripening	Layer	Lactic acid bacteria (log CFU/g)
49	C	I	7.93 \pm 0.47
		II	7.61 \pm 0.38
		IV	7.48 \pm 0.32
		I	6.78 \pm 0.42
	3W	II	6.57 \pm 0.39
		IV	6.21 \pm 0.28
		I	7.65 \pm 0.24
		II	7.42 \pm 0.36
	5W	IV	7.31 \pm 0.22
		I	6.91 \pm 0.39
		II	6.65 \pm 0.27
		IV	6.05 \pm 0.49
98	3W	I	5.98 \pm 0.48
		II	5.56 \pm 0.59
		IV	5.28 \pm 0.21
		I	6.22 \pm 0.42
	5W	II	5.84 \pm 0.33
		IV	5.57 \pm 0.31

4. Discussion

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

Table 2

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

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

^a *Lactobacillus* – *Lb.*, *Lactococcus* – *Lc.*^b The concentration ranges: the biogenic amine was not detected (ND); <10 mg/L(+); 10–100 mg/L(++); >100 mg/L(+++); n = 12; all strains were negative for histamine production.

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

In the individual layers, *Lb. curvatus*, *Lb. plantarum* and *Lb. casei/paracasei* strains were identified as the producers of biogenic amines (Table 2). The main reason for different biogenic amines content in the individual layers must be searched for in different conditions of the environment influencing the growth and metabolism of microorganisms. These conditions include mainly different water activity, O₂ content and proteolytic activity (Komprda et al., 2008; Novella-Rodríguez et al., 2003). The suggested explanation can also be supported by different LAB counts in the individual layers of the cheeses tested (Table 1), where the core showed lower bacteria counts than the layers closer to the edge.

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

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

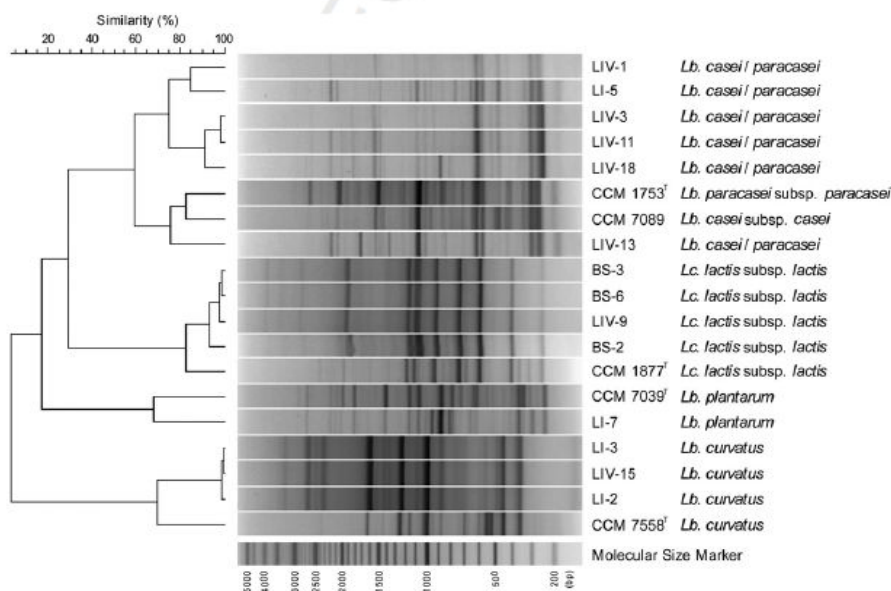


Fig. 4. Dendrogram based on (GTG)₅-PCR fingerprinting results of LAB isolated from Edam-cheese. Reference strains corresponding to the identified species are included (*Lactobacillus* – *Lb.*, *Lactococcus* – *Lc.*).

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Acknowledgement

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

References

- Actis, L.A., Smoot, J.C., Barancin, C.E., Findlay, R.H., 1999. Comparison of differential plating media and two chromatography techniques for the detection of histamine production in bacteria. *J. Microbiol. Methods* 39, 79–90.
- Al-Otaibi, M.M., Wilbey, R.A., 2004. Effect of temperature and salt on the maturation of white-salted cheese. *Int. J. Food Microbiol.* 57, 57–63.
- Arena, M.E., Manca de Nadra, M.C., 2001. Biogenic amine production by *Lactobacillus*. *J. Appl. Microbiol.* 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. *Curr. Microbiol.* 55, 205–210.
- Aymerich, T., Martín, B., Garriga, M., Vidal-Carou, M.C., Bover-Cid, S., Hugas, M., 2006. Safety properties and molecular strain typing of lactic acid bacteria from slightly fermented sausages. *J. Appl. Microbiol.* 100, 40–49.
- Bernardeau, M., Vernoux, J.P., Henri-Dubernet, S., Guéguen, M., 2008. Safety assessment of dairy microorganisms: the *Lactobacillus* genus. *Int. J. Food Microbiol.* 126, 278–285.
- Bover-Cid, S., Holzapfel, W.H., 1999. Improved screening procedure for biogenic amine production by lactic acid bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* 53, 33–41.
- Bover-Cid, S., Izquierdo-Pulido, M., Vidal-Carou, M.C., 2001. Effectiveness of a *Lactobacillus sakei* starter culture in the reduction of biogenic amine accumulation as a function of the raw material quality. *J. Food Prot.* 64, 367–373.
- Bover-Cid, S., Miguélez-Arriazo, 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 Microbiol.* 25, 269–277.
- Buňková, L., Buňka, F., Hlobilová, M., Vanátková, Z., Nováková, D., Dráb, V., 2009. Tyramine production of technological important strains of *Lactobacillus*, *Lactococcus* and *Streptococcus*. *Eur. Food Res. Technol.* 229, 533–538.
- Buňková, L., Buňka, F., Klčovská, P., Mrkvička, V., Doležalová, M., Kráčmar, S., 2010. Formation of biogenic amines by gram-negative bacteria isolated from poultry skin. *Food Chem.* 121, 203–206.
- Burdychová, R., Komprda, T., 2007. Biogenic amine-forming microbial communities in cheese. *FEMS Microbiol. Lett.* 276, 149–155.
- Christensen, J.E., Dudley, E.G., Pederson, J.A., Steele, J.L., 1999. Peptidases and amino acid catabolism in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 76, 217–246.
- Delgado, S., Delgado, T., Mayo, B., 2002. Technological performance of several *Lactococcus* and *Enterococcus* strains of dairy origin in milk. *J. Food Prot.* 65, 1590–1596.
- de Llano, G.D., Cuesta, P., Rodríguez, A., 1998. Biogenic amine production by wild lactococcal and leuconostoc strains. *Lett. Appl. Microbiol.* 26, 270–274.

- de las Rivas, B., Marcobal, Á., Carrascosa, A.V., Muñoz, R., 2006. PCR detection of foodborne bacteria producing the biogenic amines histamine, tyramine, putrescine and cadaverine. *J. Food Prot.* 69, 2509–2514.
- Forde, A., Fitzgerald, G.F., 2000. Biotechnological approaches to the understanding and improvement of mature cheese flavour. *Curr. Opin. Biotechnol.* 11, 484–489.
- Fox, P.F., Guinee, T.P., Cogan, T.M., McSweeney, P.L.H., 2000. *Fundamentals of Cheese Science*. Aspen Publication, 638 pp.
- Galgano, F., Suzzi, G., Favati, F., Caruso, M., Martuscelli, M., Gardini, F., Salzano, G., 2001. Biogenic amines during ripening in "Semicotto Caprino" cheese: role of enterococci. *Int. J. Food Sci. Technol.* 36, 153–160.
- 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*. *Int. J. Food Microbiol.* 64, 105–117.
- Halász, A., Baráth, Á., Simon-Sarkadi, L., Holzapfel, W., 1994. Biogenic amines and their production by microorganisms in food. *Trends Food Sci. Technol.* 5, 42–49.
- ISO Standard No. 5534, 2004. Cheese and Processed Cheese – Determination of the Total Solids Content (Reference Method). International Organization for Standardization, Geneva.
- Komprda, T., Smělá, D., Novická, K., Kalhotka, L., Šustová, K., Pechová, P., 2007. Content and distribution of biogenic amines in Dutch-type hard cheese. *Food Chem.* 102, 129–137.
- Komprda, T., Burdychová, R., Dohnal, V., Cwiková, O., Sládková, P., Dvořáčková, H., 2008. Tyramine production in Dutch-type semi-hard cheese from different producers. *Food Microbiol.* 25, 219–227.
- 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, Á., de las Rivas, B., Moreno-Arribas, V., Muñoz, R., 2005. Multiplex PCR method for the simultaneous detection of histamine-, tyramine-, and putrescine-producing lactic acid bacteria in foods. *J. Food Prot.* 68, 874–878.
- McSweeney, P.L.H., Hayaloglu, A.A., O'Mahony, J.A., Bansal, N., 2006. Perspectives on cheese ripening. *Austr. J. Dairy Technol.* 61, 69–77.
- Novella-Rodríguez, S., Veciana-Nogués, M.T., Izquierdo-Pulido, M., Vidal-Carou, M.C., 2003. Distribution of biogenic amines and polyamines in cheese. *J. Food Sci.* 68, 750–755.
- Öner, Z., Sagdic, O., Simsek, B., 2004. Lactic acid bacteria profiles and tyramine and tryptamine contents of Turkish tulum cheese. *Eur. Food Res. Technol.* 219, 455–459.
- Pereira, C.I., Barreto Crespo, M.T., San Romao, M.V., 2001. Evidence for proteolytic activity and biogenic amines production in *Lactobacillus curvatus* and *L. homohiochii*. *Int. J. Food Microbiol.* 68, 211–216.
- Pinho, O., Ferreira, I.M.P.L.V.O., Mendes, E., Oliveira, B.M., Ferreira, M., 2001. Effect of temperature on evolution of free amino acid and biogenic amine contents during storage of Azeitao cheese. *Food Chem.* 75, 287–291.
- Pircher, A., Bauer, F., Paulsen, P., 2007. Formation of cadaverine, histamine, putrescine and tyramine by bacteria isolated from meat, fermented sausages and cheeses. *Eur. Food Res. Technol.* 226, 225–231.
- Roig-Sagués, A.X., Molina, A.P., Hernández-Horrero, M.M., 2002. Histamine and tyramine-forming microorganisms in Spanish traditional cheese. *Eur. Food Res. Technol.* 215, 96–100.
- Santos, W.C., Souza, M.R., Cerqueira, M.M.O.P., Glória, M.B.A., 2003. Bioactive amines formation in milk by *Lactococcus* in the presence of not of rennet and NaCl at 20 and 32 °C. *Food Chem.* 81, 595–606.
- Shalaby, A.R., 1996. Significance of biogenic amines to food safety and human health. *Food Res. Int.* 29, 675–690.
- Silla Santos, M.H., 1996. Biogenic amines: their importance in foods. *Int. J. Food Microbiol.* 29, 213–231.
- Smit, G., Smit, B.A., Engels, W.J.M., 2005. Flavour formation by lactic acid bacteria and biochemical flavour profiling of cheese products. *FEMS Microbiol. Rev.* 29, 591–610.
- Švec, P., Sedláček, I., Žáčková, L., Nováková, D., Kudeřtová, M., 2009. *Lactobacillus* spp. associated with early childhood caries. *Folia Microbiol.* 54, 53–58.
- Švec, P., Vancanneyt, M., Seman, M., Snauwaert, C., Lefebvre, K., Sedláček, I., Swings, J., 2005. Evaluation of (GTG)5-PCR for identification of *Enterococcus* spp. *FEMS Microbiol. Lett.* 247, 59–63.
- Valsamaki, K., Michaelidou, A., Polychronidou, A., 2000. Biogenic amine production in feta cheese. *Food Chem.* 71, 259–266.
- Wouters, J.T.M., Ayad, E.H.E., Hugenholz, J., Smit, G., 2002. Microbes from raw milk for fermented dairy products. *Int. Dairy J.* 12, 91–109.