

CHARACTERIZATION OF LACTOCOCCUS STRAINS AND THEIR USING IN DAIRY TECHNOLOGY

Zuzana Hladíková, Jana Smetanková, Gabriel Greif, Mária Greifová

ABSTRACT

Lactococcus lactis species is one of the most important groups of lactic acid bacteria that are used in the dairy industry. *Lactococci* are generally found on plants and the skins of animals. Special interest is placed on the study of *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* and *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*, as they are the strains used as starter cultures in industrial dairy fermentation. The major functions of this species in dairy fermentation are the production of lactic acid, formation of flavour and aroma compounds, development of ripened cheese texture and antimicrobial activity against spoilage bacteria and moulds.

Keywords: *Lactococcus lactis*, starter cultures, antimicrobial activity, technological properties

ÚVOD

Konzumácia potravín, ktoré vznikli činnosťou mikroorganizmov, sprevádza človeka už niekoľko tisícročí. Metódou pokusu a omylu sa ľudia snažili zabrániť nežiaducemu kazeniu potravín živočíšneho a rastlinného pôvodu. Na základe prirodzenej selekcie bol tak v priebehu storočí podporovaný rozvoj pozitívne pôsobiacich mikroorganizmov na úkor tých, ktoré spôsobovali kazenie.

V prípade mlieka človek neuviedomele využíval účinky mikroorganizmov, ktoré sa do neho dostali prirodzenou cestou z prostredia, spôsobovali samovoľné skysnutie mlieka alebo smotany, prípadne ďalšie pochody ako je rozklad bielkovín a tukov pri výrobe syra.

Od konca 19. storočia je problematika kyslomliečnych baktérií riešená intenzívne a nepretržite v celej šírke, pričom zahŕňa izoláciu nových kmeňov, poznanie ich vlastností, výber kmeňov a ich vhodné kombinácie, výrobu rôznych foriem kvasových kultúr a ich aplikáciu v klasicknej mliekarenskej technológii aj konzervácii najrôznejších potravinárskych výrobkov.

Jednou z najdôležitejších skupín mikroorganizmov s technologickým významom sú mikroorganizmy rodu *Lactococcus*. Baktérie patriace do tohto rodu sa nachádzajú v surovom kravskom mlieku, surovom ovčom mlieku, ale aj v iných potravinárskych komoditách a už dlho sa využívajú ako štartovacie kultúry v malovýrobe i vo veľkopriemyselnom spracovaní.

Konzervačný efekt rodu *Lactococcus* je spôsobený hlavne redukciou pH prostredia pomocou vyprodukovaných kyselín ako je kyselina mliečna, kyselina octová, kyselina jantárová, kyselina fenylmliečna, kyselina propiónová a i. a tiež tvorbou ďalších antimikrobiálnych látok vrátane bakteriocínov bielkovinovej povahy. Produkty ich metabolizmu majú uplatnenie nielen v biokonzervácii, ale prispievajú tiež k dosiahnutiu požadovaných organoleptických vlastností produktov tvorbou chuťových látok a enzýmov.

ROD LACTOCOCCUS

Pri štúdiu staršej mliekarenskej literatúry nachádzame v mliečnej skupine streptokokov pomenovania: *Streptococcus lactis*, *Streptococcus lactis* ssp. *diacetylactis*, *Streptococcus cremoris*, *Streptococcus lactis* ssp. *holandicus*, *Streptococcus lactis* var. *maltigenes*, *Streptococcus citrovorus*, *Streptococcus paracitrovorus* a pod..

Dôvody zhrnutia niektorých druhov mliečnej skupiny streptokokov (rod *Lactococcus*) do jedného druhu *Lactococcus lactis* boli nasledovné: *Lactococcus lactis* ssp. *diacetylactis* (arómový streptokok) má všetky hlavné vlastnosti totožné so species *Lactococcus lactis*, ale má navyše významnú vlastnosť fermentovať citran na arómotvornú látku diacetyl a na CO₂. Táto vlastnosť je podľa novších údajov regulovaná plazmidom, preto nie je trvalá. Napriek novej systematike sa taxon *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* biovar *diacetylactis* používa naďalej pre jeho výnimočné vlastnosti v mliekarenskej mikrobiológii (Görner a Valík, 2004).

Najväčšou mierou je v surovom mlieku, syroch a iných mliečnych produktoch zastúpený *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* a *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*, no izolovaný bol tiež aj *Lactococcus garviae* (Casalta et al., 2008; Corroler, Desmasures a Guegen, 1999).

Lactococcus lactis ssp. *lactis* sa veľmi dobre rozmnožuje v čerstvom, za hygienických podmienok nadojenom mlieku, až spôsobí skysnutie. Je neodmysliteľnou súčasťou používaných „čistých mliekarských kultúr“ na výrobu niektorých kyslých mliek, kyslých smotán a na výrobu všetkých druhov syrov ako jediná kultúra alebo spolu s inou špecifickou kultúrou mikroorganizmov. Bunky majú vajcovitý tvar priemeru 0,5 až 1,0 μm, sú väčšinou v pároch alebo v krátkych reťazkách. Rastie v rozmedzí teplôt 10 až 40 °C a jeho optimálna rastová teplota je asi pri 30 °C. Optimálna teplota pre rôzne kmene *Lactococcus lactis* je 27-33 °C, optimálna tvorba kyseliny mliečnej je pri 30 °C (Görner a Valík, 2004; Adamberg et al., 2003;

Lee, Collins 1976). Charakteristické je, že nefermentuje sacharózu alebo iba v nepatrnej miere. V mlieku tvorí 0,8 až 0,9 % kyseliny mliečnej. Menej ako 10 % metabolitov (počítané na celkové metabolity) sú prchavé kyseliny, najmä kyselina octová. Tvorbou kyseliny mliečnej pri 20 °C až 30 °C mlieko zráža do druhého dňa. Kyselinu citrónovú neštiepi, netvorí acetoín a diacetyl ani CO₂ (existujú však arómové biovary ako napríklad *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* biovar *diacetylactis*). *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* štiepi peptón za tvorby amoniaku, kazeín v neutrálnom prostredí štiepi iba nepatrne. V médiu neznáša 6,5 % NaCl, ale pri 4 % NaCl rastie dobre (Görner a Valík, 2004).

Odolnosť kyslomliečnych baktérií voči zvýšenej koncentrácii NaCl je veľmi dôležitá z hľadiska výroby mnohých syrov. U rozličných kmeňov je však rôzna. Khedid et al. (2009) testovali kyslomliečne baktérie izolované z mlieka ťavy dvojhrbej z Morocca. *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* bol najviac zastúpeným vyizolovaným kmeňom. V ich štúdiu sa uvádza, že *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* a *Lactococcus lactis* biovar *diacetylactis* dobre tolerovali 4 % – 6,5 % - ný obsah NaCl. *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* toleroval menej ako 2 % - ný obsah NaCl.

Lactococcus lactis ssp. *cremoris* má niektoré charakteristické vlastnosti, ktorými sa líši od *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*: má nižšiu optimálnu teplotu (udáva sa 28 °C), tvorí merateľné množstvo CO₂, laktózu fermentuje pomalšie, morfológicky sa vyznačuje spravidla väčšími bunkami – 0,6 až 1,0 µm, ktoré ostávajú pri sebe v smere ich delenia, preto vznikajú dlhé retiazky zložené často z 20 i viac buniek. Tvorba dlhých retiazok je ale charakteristická len pre čerstvé kultúry pestované v mlieku. U starších kultúr sa retiazky rozpadávajú na páry. Niektoré kmene tvoria sliz. V mlieku tvorí asi 0,7 % kyseliny mliečnej. Ako homofermentatívna baktéria mliečneho kysnutia tvorí málo vedľajších metabolitov, pričom tvorba CO₂ je premenlivá. Vytvára aj málo acetoínu a diacetylu. Rastie ešte v médiu s obsahom 2 % NaCl, ale nie pri 4 % NaCl. Je preto typickým smotanovým alebo mliečnym streptokokom, nie však univerzálnym syrárskym mikroorganizmom (v syroch sú zväčša vyššie koncentrácie NaCl). Aj podľa novších taxonomických štúdií sa ukazuje, že *Lactococcus cremoris* je príbuzný druhu *Lactococcus lactis*, a preto sa novšie uvádza ako *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* (Görner a Valík, 2004).

Viacero autorov skúmalo vplyv teploty a pH na rast *Lactococcus lactis*. Maximálna špecifická miera rastu *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* bola pozorovaná pri pH hodnote prostredia v rozmedzí od 6,3 do 6,9 (Bibal et al., 1988).

Lactococcus lactis ssp. *lactis* a *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* dosahujú vysoké hodnoty (>10⁸ KTJ/g) tak ako v prvý deň výroby, tak vysoký počet KTJ sa udržiava aj počas zrecej periódy mnohých syrov zo surového mlieka (Corroler, Desmasures a Guegen, 1999).

Poľskí autori Matuszewski, Pijanowski a Supieska navrhli v roku 1936, aby kmene *Streptococcus lactis*, ktoré majú schopnosť fermentovať citran (za prítomnosti fermentovateľného sacharidu) za tvorby acetoínu, CO₂ a arómovej látky diacetylu, dostali vlastné pomenovanie.

V Bergeyovej systematike (r. 1984) bol tento návrh akceptovaný (Görner a Valík, 2004).

Lactococcus lactis ssp. *lactis* biovar *diacetylactis* (bývalý *Streptococcus lactis* ssp. *diacetylactis*) má podobné charakteristiky ako *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*, s výnimkou tvorby väčšieho množstva prchavých látok regulovanej plazmidom. Od *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* sa líši dvomi znakmi: za prítomnosti fruktózy vytvára hlavne CO₂ a kyselinu octovú a štiepi kyselinu citrónovú, pričom v značnej miere tvorí acetoín. Tvorba diacetylu za tmy neprebíha alebo iba nepatrne. V takejto kultúre je možné preto ľahko dokazovať prítomnosť acetoínu. Diacetyl sa potom z acetoínu tvorí oxidáciou vzdušným kyslíkom. *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* biovar *diacetylactis* býva v mezofilných čistých mliekarských kultúrach, v ktorých sa požaduje tvorba arómy (diacetyl) a tvorba CO₂ nie je chybou (Görner a Valík, 2004).

Cachon a Diviés (1994) skúmali rast *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* biovar *diacetylactis* pri rozličných hodnotách pH. Zistili, že pre rast a produkciu kyseliny mliečnej *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* biovar *diacetylactis* bola optimálna hodnota pH 6,5.

Lactococcus raffinolactis v mliekarskej mikrobiológii nie je bežný. Má sérologickú skupinu N. Z fermentačného hľadiska sa od *Lactococcus lactis* líši najmä fermentáciou sacharózy, jeho pôvodným stanovišťom sú prirodzene skysnuté mlieka (Görner a Valík, 2004).

Status *Lactococcus lactis* „všeobecne považovaný za bezpečný“ (GRAS) ho robí atraktívnym pre produkciu proteínov pre potravinársky priemysel alebo terapeutické účely. Okrem toho kmene *Lactococcus lactis* produkujúce heterológne proteíny ako antigény sú študované pre použitie ako živé mukózne vakcíny (Sirén et al., 2009; Beresford et al., 2001; Salminen et al., 1998).

LACTOCOCCUS LACTIS AKO PROBIOTICKÁ KULTÚRA

Prínos probiotík je oceňovaný a skúmaný už po celé storočia. Hoci pojem funkčné potraviny bol zavedený v dávnej minulosti Hippokratom a jeho mottom „Dovoľte potravinám byť vašimi liekmi“, ale až nedávno súbor dôkazov začal podporovať hypotézu, že strava môže hrať významnú úlohu v modulácii dôležitých fyziologických funkcií tela (Vasiljevic, Shah, 2008).

Probiotiká sú definované ako živé organizmy, ktoré ak sú konzumované v dostatočnom množstve, sú prospešné pre zdravie hostiteľa (Vouloumanou et al., 2008).

Medzi všeobecne používané probiotiká patria kmene rodov *Lactobacillus* a *Bifidobacterium*, ktoré boli pôvodne izolované z ľudského intestinálneho traktu. Niekoľko štúdií sa zaoberalo probiotickou aktivitou laktokokov, ktoré sú bežne používané ako štartovacie kultúry počas spracovania fermentovaných mliečnych produktov. Všeobecne sa predpokladá, že laktokoky neprežívajú prechod gastrointestinálnym (GI) traktom. Niektoré kmene laktokokov však môžu prežívať v ľudskom i živočíšnom GI trakte (Kimoto et al., 2003; Klijn, Weerkamp, de Vos, 1995).

Schopnosť tolerovať žľové prostredie je nevyhnutnou charakteristikou probiotickej kultúry. Mnoho štúdií sa zaoberalo prežívaním kyslomliečnych baktérií v žľi a selekciou probiotík s najlepšimi vlastnosťami (Garriga et al., 1998; Jin et al., 1998).

Perrin, Gill a Schneider (2000) uviedli, že toxické účinky žlče môžu byť čiastočne zmiernené prídavkom sacharidu, ktorý môže byť metabolizovaný niektorými kmeňmi bifidobaktérií. Tolerancia niektorých kmeňov laktokokov sa odlišuje použitím rôznych druhov sacharidov v rastovom médiu (**Kimoto-Nira et al., 2009**).

Kimoto-Nira et al. (2010) testovali kmeň *Lactococcus lactis* G50 ako možného kandidáta probiotickej kultúry s imunomodulačnou aktivitou za rozličných podmienok. Výsledky ich práce potvrdili, že kmeň *Lactococcus lactis* G50 toleruje a preživa v prítomnosti lyzozýmu, pri nízkej hodnote pH prostredia a žlče, ale jeho rezistencia varíruje v závislosti od použitého zdroja uhlíka. Tiež pozorovali uprednostňovanie určitých sacharidov rozdielnymi kmeňmi kyslomliečnych baktérií a táto preferencia závisela od kmeňa a od typu gastrointestinálneho traktu. Probiotické vlastnosti troch kmeňov KMB (*Lactococcus lactis* CLFP 101, *Lactobacillus plantarum* CLFP 238 a *Lactobacillus fermentum* CLFP 242) izolovaných z rýb a schopnosť inhibovať príľnavosť 5 patogénnych mikroorganizmov rýb (*Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas salmonicida*, *Yersinia ruckeri* a *Vibrio anguillarum*) hostujúcich v intestinálnej mukóznej vrstve *in vitro* podmienkach skúmali **Balcázar et al. (2008)**. Výsledky ukázali, že len *Lactococcus lactis* CLFP 101 pôsobil protiadhézne a antibakteriálne voči všetkým patogénnym mikroorganizmom. Všetky kmene kyslomliečnych baktérií boli schopné prežiť pri pomerne nízkych hodnotách pH prostredia a pri vysokej koncentrácii rybacej žlče.

ANTIMIKROBIÁLNA AKTIVITA

Kyslomliečne baktérie sú zodpovedné za fermentáciu a majú biokonzervačný účinok využívaný v početných potravinových a krmovínových procesoch. Biokonzervácia slúži na predĺženie trvanlivosti a na zvýšenie bezpečnosti potravín použitím prirodzenej alebo pridanej mikroflóry a ich antimikrobiálnych produktov. Antimikrobiálne zložky produkované kyslomliečnymi baktériami zahŕňajú organické kyseliny, peroxid vodíka, oxid uhličitý, diacetyl, bakteriocíny a nízkomolekulárne antimikrobiálne látky, ale niekoľko štúdií sa venovalo aj ich polysacharidovým metabolitom, zvlášť exopolysacharidom (**Wu et al., 2010; Rohwer a Edwards, 2002**).

Mechanizmus pôsobenia antimikrobiálnych látok nemôže byť presne definovaný, pretože ide o komplexnú interakciu medzi viacerými zložkami, môžeme hovoriť o synergickom efekte (**Greifová et al., 2008**).

Už roku 1973 Haines a Harmon testovali inhibičné schopnosti 8 druhov baktérií patriacich do rodov *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* a *Streptococcus*. Dokázali, že zmesné kultúry spomínaných baktérií v laboratórnych podmienkach s médiom obsahujúcim *Staphylococcus aureus* potlačovali jeho rast viac ako samotné kultúry (**Haines a Harmon, 1973a, 1973b**).

Neskôr v roku 2008 **Charlier et al.** monitorovali 75 kmeňov *Lactococcus lactis* a ich potenciál inhibovať rast *Staphylococcus aureus* v mlieku a dokázali, že inhibičné vlastnosti týchto vybraných kmeňov boli rôzne. Väčšina kmeňov *Lactococcus lactis* (93 %) rast *Staphylococcus aureus* inhibovala a niekoľko kmeňov (7 %) nemalo voči *Staphylococcus aureus* žiadny inhibičný účinok.

Bolo zistené, že laktokoky izolované z iných zdrojov ako z mliečnych produktov, preukazovali vyššiu antimikrobiálnu aktivitu ako kmene izolované z mliečnych produktov, zahŕňajúc aj priemyselné štartéry. Tento fenomén môže byť vysvetlený tak, že schopnosť produkovať antibakteriálne látky týmito divokými kmeňmi je spôsobená konkurenčným bojom o prežitie s inými mikroorganizmami (**Wouters et al., 2002**).

BAKTERIOCÍNY

Mnoho mikrobiálnych skupín produkuje bakteriocíny patriace do heterogénnej skupiny peptidov a proteínov s antimikrobiálnym účinkom (**Castellano et al., 2008**). Bakteriocíny niektorých baktérií inhibujú rast príbuzných mikrobov, zatiaľ čo iné inhibujú širokú škálu mikroorganizmov, zahŕňajúcu prirodzených patogénov potravín a spórotvorných mikroorganizmov ako sú *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* a *Clostridium tyrobutyricum* (**Gálvez et al., 2008**).

Niekoľko rodov alebo ich druhov ako sú *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*, *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*, *Lactococcus lactis* ssp. *diacetylactis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus plantarum* a *Lactobacillus curvatus* sú schopné syntetizovať peptidy alebo bakteriocíny, ktorých činnosť je namierená len proti taxonomicky úzko súvisiacim baktériám (**Batish et al., 1997**).

Niektoré z bakteriocínov produkované druhmi *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* sa používajú od roku 1950 ako potravinárske prídavné látky. Ako príklad môžeme uviesť nizín, ktorý má antibakteriálny účinok na grampozitívne mikroorganizmy a je schopný inhibovať klíčenie spór rodov *Clostridium* a *Bacillus* (**González et al., 2007**).

Vedecká literatúra ponúka príklady niekoľkých kmeňov kyslomliečnych baktérií schopných produkovať bakteriocíny. V tomto zmysle, určitý kmeň *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* produkuje nizín, bakteriocín, ktorý púta vo vedeckej oblasti najväčšiu pozornosť. Avšak, iné laktokoky sú tiež významnými producentami bakteriocínov. Napríklad lacticin 481 produkovaný kmeňom *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* CNRZ 481, lactococcin B produkovaný *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* 9B4, lactococcin G produkovaný *Lactococcus lactis* LMG 2081 a diplococcin produkovaný *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* a i. (**Lee et al., 1999**).

BIOSURFAKTANTY

Záujem o biosurfaktanty za posledné roky značne vzrástol. Sú potencionálnymi kandidátmi pre mnohé komerčné využitie v ropnom, farmaceutickom, biomedicínskom a potravinárskom priemysle (**Iyer et al., 2010**).

Biosurfaktanty sú mikrobiálne zlúčeniny s vyslovene povrchovou aktivitou, ktoré majú rozmanité chemické štruktúry ako glykolipidy, lipopeptidy, polysacharidovo-proteínové komplexy, lipopolysacharidy, fosfolipidy, mastné kyseliny a neutrálne lipidy. Sú užitočné nielen ako antibakteriálne, antifungálne a antivirotické látky, ale majú tiež potenciál pre použitie ako hlavné imunomodulačné molekuly, antiadhezívne činitele a dokonca ako vakcíny (**Rodrigues et al., 2006**).

Rodrigues et al. (2004) študovali biosurfaktant produkovaný kmeňom *Lactococcus lactis* 53 s cieľom tento biosurfaktant izolovať a identifikovať, zahŕňajúc jeho molekulárne zloženie. Tento biosurfaktant izolovaný z *Lactococcus lactis* 53 bol fyzikálnochemicky a biochemicky charakterizovaný ako mnohozložkový biosurfaktant pozostávajúci z proteínu a polysacharidov, ktorý preukázal antimikrobiálnu aktivitu voči vybraným baktériám a mikroskopickým vláknitým hubám (**Rodrigues et al., 2006, 2004a, 2004b**).

TECHNOLOGICKÝ VÝZNAM

Acidifikačné schopnosti

Kvalitná výživa dojníc je nutným predpokladom pre dosahovanie požadovaného látkového zloženia a technologických vlastností mlieka. Odrazom nedostatočného energetického krytia dojníc je znížená produkcia mlieka, mlieko vykazuje nižší obsah bielkovín (klesá najmä kazeínová zložka), nízke hodnoty beztukovej sušiny a titračnej kyslosti, dochádza k zhoršovaniu syriteľnosti a kysacej schopnosti mlieka (**Kološta, 1998**). Špecificky typická chuť a aróma tradične vyrábaných druhov syra závisí od druhu mlieka, jeho mikrobiologickej kvality, stupňa okyslenia zrazeného mlieka vo fáze formovania, výrobných technológií a podmienok zrenia (**Gonzáles et al., 2010**).

Lactococcus lactis je používaný ako mezofilná štartovacia kultúra pre jeho schopnosť acidifikovať mlieko, čo vedie ku koagulácii a tvorbe arómových látok počas zrenia. Z tohto dôvodu sa kladie dôraz na skúmanie parametrov, ktoré ovplyvňujú okysľovanie mlieka pomocou *Lactococcus lactis*. Zatiaľ nie je známe, ako redukovať acidifikačnú lag – fázu a zvýšiť životnosť buniek po inokulácii (**Jeanson et al., 2009**).

V tradičnej výrobe syrov sa len zriedka používa zmes mezofilných a termofilných kultúr. Avšak kmeň *Streptococcus thermophilus* sa stále viac používa s mezofilnými štartovacími kultúrami na reguláciu acidifikácie počas spracovania, formovania, lisovania a skladovania syrov. Okrem toho *Streptococcus thermophilus* môže byť užitočný proti bakteriofágom (**Champagne et al, 2009; Stokes et al., 2001**).

Champagne et al. (2009) sa zaoberali štúdiom interakcií medzi kultúrami *Lactococcus lactis* a *Streptococcus thermophilus* pri modelovej výrobe syra Cheddar. Výsledky ich práce poukazujú na ochrannú funkciu *Streptococcus thermophilus* voči bakteriofágom, zvýšenie rýchlosti acidifikácie počas čedarizácie, zníženie acidifikácie počas lisovania a skladovania a redukciu tvorby exopolysacharidov, zatiaľ čo kultúry *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* biovar. *diacetylactis* sa významne podieľajú na tvorbe chuti a arómy. Ak sa použije štartovacia kultúra pre tieto čedarové syry zložená z kultúr *Streptococcus thermophilus* a *Lactococcus lactis*, dosiahne sa optimálna chuť, textúra a post-acidifikácia.

Proteolytická a lipolytická aktivita

Škála a stupeň voľných aminokyselín vo fermentovanom mlieku závisí od mnohých premenlivých faktorov ako je druh mlieka, zloženie štartovacej kultúry, prípravných a skladovacích podmienok (**Juillard et al., 1995**). *Lactococcus lactis* ako dôležitý komponent štartovacích kultúr používaných vo výrobe syrov vyžaduje komplex

aminokyselín a jeho optimálny rast v mlieku závisí od jeho veľmi zložitého proteolytického systému zahŕňajúceho bunkovú proteínázu spojenú so stenou, niekoľko peptidových transportných systémov lokalizovaných v membráne a množstvo intracelulárnych peptidáz (**Kunji et al., 1996**).

Ak je v mlieku nedostatočné množstvo nízkomolekulových komponentov, rast štartovacej kultúry závisí od jej proteolytickej schopnosti hydrolyzovať kazeíny. Kazeíny sú hlavným zdrojom aminokyselín pre *Lactococcus lactis*, zabezpečujú 98 % rastu (**Juillard et al., 1995**). Príspevok esenciálnych aminokyselín kazeínmi závisí od typu proteínázy (**Iyer et al., 2010**).

Katabolizmus aminokyselín zohráva dôležitú rolu v poskytovaní prekursorov pre biosyntézu aminokyselín, nukleotidov a vitamínov a v produkcii veľkého množstva kľúčových arómových komponentov (**Chaves et al., 2002**). Konkrétnejšie, kazeíny sú degradované na peptidy a aminokyseliny a tie sú hlavnými prekuzormi pre prchavé aromatické komponenty (**Smit, Smit a Engels, 2005**).

Proteolytickou aktivitou sa zaoberali aj **Picon et al. (2010)**, ktorí testovali 24 divokých kmeňov *Lactococcus lactis* izolovaných zo španielskeho syra vyrobeného zo surového mlieka, u ktorých bola preukázaná rozdielna proteolytická a peptidolytická aktivita.

Görner a Valík (2004) vo svojej publikácii uvádzajú, že baktérie mliečného kysnutia nemajú výrazné proteolytické a lipolytické vlastnosti, ale vo svojom metabolizme predsa len tvoria z bielkovín štiepne produkty, peptidy a aminokyseliny, ktoré slúžia ako živiny náročným baktériám mliečného kysnutia ako ľahko využiteľný zdroj dusíka.

Gonzáles et al. (2010) izolovali z tradičného španielskeho syra „Genestoso cheese“ 24 kmeňov kyslomliečnych baktérií. Zhodnotili ich enzymatickú aktivitu (acidifikáciu a proteolytické schopnosti a karboxypeptidázovú, aminopeptidázovú, kazeinolytickú a esterázovú aktivitu) s cieľom selektovať pôvodné kmene v záujme spracovania syrov. Tieto kmene boli selektované na základe ich antimikrobiálnej aktivity a identifikované ako *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* (13 kmeňov), *Leuconostoc mesenteroides* (2 kmene), *Leuconostoc pseudomesenteroides* (1 kmeň), *Lactobacillus paracasei* (2 kmene), *Lactobacillus plantarum* (1 kmeň) a *Enterococcus faecalis* (5 kmeňov). Kmene *Lactococcus* sp. preukázali najvyšší stupeň acidifikácie a proteolytickej aktivity. Bezbunkový extrakt z kmeňa *Lactobacillus paracasei* vykazoval najvyšší stupeň aminopeptidázovej aktivity. Najvyšší stupeň kazeinolytickej aktivity preukázal bezbunkový extrakt jedného kmeňa *Lactococcus lactis*. Vysoké hodnoty boli tiež získané bezbunkovými extraktami *Lactobacillus* sp. a niektorými leukonostokmi. Karboxypeptidázová aktivita bola celkovo nízka alebo nepostrehnuteľná u väčšiny kmeňov. Najvyššia miera esterolytickej aktivity bola detegovaná u druhov rodu *Enterococcus*.

Kyslomliečne baktérie sú málo lipolytické v porovnaní s inými skupinami baktérií (napr. *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Achromobacter*). Esterolytický a lipolytický systém baktérií mliečného kysnutia zostáva slabo charakterizovaný. Esterázy kyslomliečnych baktérií, mikroskopických vláknitých húb a baktérií rodu

Pseudomonas majú za následok ovocnú prichuť v potravinách. Mikrobiálne lipázy a esterázy sú neodmysliteľné v zlepšovaní kvality, urýchľujú zrenie syrov, fermentovaných mäsových výrobkov a iných potravín (Reddy et al., 2008).

Exopolysacharidy

Exopolysacharidy (EPS) sú definované ako dlhé polysacharidy vylučované mikrobiálnymi bunkami (Laws, Gu a Marshall, 2001). Polysacharidy sa všeobecne nachádzajú v rastlinách, mikroorganizmoch (huby a baktérie), riasách a zvieratách. Vďaka ich dostupnosti a reologickým vlastnostiam, polysacharidy reprezentujú triedu vysoko hodnotných polymérov s veľkým priemyselným využitím v potravinárskom, kozmetickom, textilnom a farmaceutickom priemysle. Využívajú sa napríklad ako emulgátory, stabilizátory a zlepšovače textúry v potravinárskom priemysle (Krizkova et al., 2006; McCue, Shetty, 2002). Niekoľko pokusov bolo vykonaných na riadenie fermentačných podmienok kvôli vzrastu produkcie EPS (Macedo et al., 2002; Grobber et al., 1998), no doteraz je ešte mnoho nevyriešených otázok. Tiež niekoľko štúdií sa uskutočnilo na využitie EPS produkovaných kyslomliečnymi baktériami ako hlavnej funkčnej zložky predovšetkým pri výrobe syrov a jogurtov (Folkenberg et al., 2005; Hassan, Frank a Elsoda, 2003; Hassan et al., 1996).

Tvorba EPS, zdá sa, vzrastá so zvyšujúcim sa obsahom proteínov v médiu. Ostatné zložky média ako minerálne látky, špecifické aminokyseliny, karbohydráty tiež ovplyvňujú zloženie a výťažok exopolysacharidov (De Vuyst a Degeest, 1999; Grobber et al., 1998).

Ayala-Hernández et al. (2009) sledovali účinok prídavku srvátkových bielkovín na reologické vlastnosti ultrafiltračného permeátu fermentovaného exopolysacharidy-produkujúcim kmeňom *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* JFR1. Mliečne permeáty obsahujúce 8% tuhých látok s rozličnými prídavkami srvátkových bielkovín (0, 2, 4, 6 a 8 %) boli fermentované 12 hod pri teplote 30 °C. Reologické vlastnosti fermentovaných vzoriek boli zhodnotené a porovnávané s kontrolnými vzorkami fermentovanými exopolysacharidy-neprodukujúcimi kmeňmi. Pozorovaním elektrónovým mikroskopom bola tiež potvrdená existencia interakcií medzi srvátkovými proteínovými agregátmi a EPS. Prítomnosť EPS značne zvyšovala viskozitu a viskoelastické vlastnosti média, hlavne u vzoriek obsahujúcich viac ako 2 % prídavok srvátkových proteínov. Získané výsledky názorne dokazujú význam interakcie v utváraní štruktúr EPS-proteín a môžu pomôcť vysvetliť viskozitné mechanizmy EPS vo fermentovaných mliečnych produktoch. Produkcia vysokoviskózneho materiálu by mohla byť potenciálne využívaná v budúcnosti ako nová bohatá vláknitá ingrediencia v mliekarenských produktoch.

Mlieko, srvátka alebo produkty z nich vyrobené sú vhodnými substrátmi na produkciu EPS kvôli ich vysokému obsahu laktózy (Macedo et al., 2002).

Za posledné roky sa čím ďalej, tým viac ukazuje, že niektoré polysacharidy izolované z kultivovateľných mikroorganizmov majú antioxidantné vlastnosti a nízku cytotoxicitu (Krizkova et al., 2006; McCue a Shetty, 2002). Bolo publikovaných mnoho prác prejednávajúcich

o skrýningu, izolácii, charakterizácii, biosyntéze a funkčných vlastnostiach exopolysacharidov produkovaných kyslomliečnymi baktériami (Pan a Mei, 2010). Je v nich veľa informácií o exopolysacharidoch produkovaných niektorými kmeňmi *Lactococcus lactis* ako aj *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*. Avšak o kmeňoch *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* nie sú publikované štúdie diskutujúce o produkcii, purifikácii, charakterizácii a biologických vlastnostiach exopolysacharidov vo vzťahu k ich antioxidantným vlastnostiam *in vitro* a *in vivo* (Ayala-Hernández et al., 2009, 2008; Ruas-Madiedo et al., 2002).

Antioxidantný potenciál exopolysacharidov získaných z *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* 12 izolovaného z čínskej nakladanej kapusty popísali vo svojej práci Pan a Mei. Tieto exopolysacharidy preukázali silnú celkovú antioxidantnú kapacitu ako aj schopnosť inhibovať hydroxylové radikály a superoxidovú aniónovú aktivitu (Pan, Mei, 2010).

REZISTENCIA VOČI ANTIBIOTIKÁM

Klinické používanie antibiotík dosiahlo významné zníženie chôrob a úmrtnosti spojených s infekčnými ochoreniami a viedlo k úspešným chirurgickým zákrokom a protirakovinovej liečbe. Používanie antibiotík bolo rozšírené aj vo veterinárnej medicíne, kde sú využívané ako terapeutické faktory, tiež v poľnohospodárstve ako podpora rastu a prevencia ochorení rastlín (Levy, Marshall, 2004; Wegener, 2003).

Rezistencia na rozličné druhy antibiotík je významnou vlastnosťou kyslomliečnych baktérií a je považovaná za jedno z kritérií pre hodnotenie bezpečnosti kmeňov používaných pri výrobe potravín aj krmovín, pretože také mikroorganizmy môžu teoreticky preniesť rezistentné gény na patogény (Ammor, Flórez a Mayo, 2007; Flórez, Delgado a Mayo, 2005).

Rezistencia kyslomliečnych baktérií voči antibiotikám môže byť spôsobená množstvom rôznych mechanizmov, zahŕňajúc zníženú absorpciu antibiotík, inaktiváciu alebo modifikáciu miesta účinku antibiotika či hydrolýzu alebo modifikáciu antibiotika (Normark a Normark, 2002).

Lactococcus lactis je obvyčajne citlivý na spektrum antibiotík (makrolidy, bacitracín, erythromycín, lincomycín, novobiocín, teicoplanín a vancomycín), širokospektrálne antibiotiká (rifampicín, spectinomycín a chloramfenikol) a beta-laktámové antibiotiká (penicilín, ampicilín, amoxicilín, piperacilín, ticarcilín a imipenem). Citlivosť voči tetracyklínu, cefalotínu, nitrofurantoinu, cefotetánu je variabilná. Veľa druhov rodu *Lactococcus* je rezistentných na metronidazol, cefoxitín, trimethoprim, kyselinu nalidixovú a polymyxin B a aminoglykozidy gentamicín a kanamycín (Flórez, Delgado a Mayo, 2005; Temmerman et al., 2002; Herrero et al., 1996;).

Ammor, Flórez a Mayo (2007) vo svojej práci poukázali na rozdielnú senzitivitu rodov KMB na antibiotiká. V ich publikácii je uvedené, že *Pediococcus* sp. je citlivý na gentamicín, netilmicín, erythromycín, niektoré druhy rodu *Lactococcus* sú rezistentné na kyselinu nalidixovú a citlivé na antibiotiká erythromycín a vancomycín a beta-laktámové antibiotiká penicilín, ampicilín.

Tab 1 Mikrobiologické „breakpoints“ pre *Lactococcus lactis* (EFSA Journal, 2008)

Antibiotikum	ampicilín	vankomycín	gentamicín	kanamycín	streptomycín	erytromycín	klindamycín	tetracyklín	chloramfenikol
	(mg.l ⁻¹)								
<i>Lactococcus lactis</i>	2	4	32	64	64	2	4	4	8

Jasne definované hodnoty, ktoré rozlišujú odolné a citlivé kmene, sú životne dôležité. Tiež rozdiel medzi vnútornou (nešpecifickou, neprenosnou) a získanou rezistenciou je tiež veľmi dôležitý. EFSA stanovila tzv. mikrobiologické „breakpoints“ (mg/l) pre jednotlivé KMB, my uvádzame hodnoty pre *Lactococcus lactis*. Kmene s minimálnou inhibičnou koncentráciou vyššou než je uvedený „breakpoints“ sú považované za rezistentné (Flórez, Delgado a Mayo, 2005).

BIOGÉNNE AMÍNY

Biogénne amíny (BA) sú nízkomolekulové alifatické, aromatické alebo heterocyklické bázičné zlúčeniny odvodené od aminokyselín. Patria medzi významné zlúčeniny, ktoré sa nachádzajú v živých organizmoch ako metabolické medziprodukty a produkty, ktoré vykazujú biologickú aktivitu (Bover-Cid et al., 2008; Fernández et al., 2007; Landete, Ferrer a Pardo, 2007).

Niektoré druhy baktérií (laktobacily, enterokoky a iné) si pri adaptácii zvyšujú suboptimálne pH prostredie dekarboxyláciou aminokyselín histidínu a fenylalanínu na histamín a tyramín.

Tvorba biogénnych amínov baktériami môže byť ovplyvnená mnohými vonkajšími faktormi, ktoré môžu ovplyvňovať predovšetkým kinetiku dekarboxylázových reakcií. Medzi vonkajšie faktory, ktoré ovplyvňujú tvorbu biogénnych amínov u baktérií, patrí teplota a pH prostredia, aero-/anaerobióza, dostupnosť zdroja uhlíka (napr. glukózy), prítomnosť rastových faktorov, rastová fáza buniek, koncentrácia NaCl, vodná aktivita a i. (Emborg a Dalgaard, 2008; Greif, Greifová a Karovičová, 2006; Gardini et al., 2005; Santos et al., 2003; Bover-Cid et al., 2001; Gardini et al., 2001; Greif, Greifová a Karovičová, 1997).

Koncentrácia BA v čerstvom mlieku je nepatrná. V čerstvom mlieku, mliečnych nápojoch a výrobkoch, ktoré nie sú fermentované, sa nachádzajú amíny (propylamín, hexylamín, alifatické di- a polyamíny, histamín a tyramín) v malom množstve (menej ako 1 mg.kg⁻¹). Množstvo tyramínu v syre môže dosiahnuť hodnotu 500 mg/kg, ak sú prítomné proteolytické enzýmy a tyramíndekarboxyláza pozitívne kmene *Enterococcus faecalis* ssp. *liquifaciens* (Greif a Greifová, 2006).

Buňková et al. (2010, 2009) sledovali vplyv aeróbného a anaeróbného prostredia a rôzneho obsahu NaCl (2 %, 1 % a bez NaCl) v médiu na produkciu tyramínu u šiestich kmeňov bakteriálneho rodu *Lactococcus*, ktoré sa používajú ako štartéry vo výrobe mliečnych produktov. Pri testovaní kmeňov *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* bola pozorovaná najvyššia produkcia tyramínu v médiu

obohatenom o 2 % NaCl v anaeróbnom prostredí pri teplote 10 ± 1 °C (zrecia teplota prírodných syrov).

Podmienkou vzniku toxického množstva amínov v syroch je proteolýza, ktorá je pri zretí syrov považovaná za jeden z najdôležitejších pochodov ovplyvňujúcich kvalitu syra. Na proteolýze mliečnych bielkovín sa podieľajú natívne proteázy z mlieka, proteázy z kvasinových kultúr, syridlové enzýmy, proteázy kontaminujúcej mikroflóry, ale hlavne baktérie štartovacích kultúr (*Lactococcus lactis*, *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *Enterococcus faecalis* a *Enterococcus faecium*). Štartovacie kultúry používané pri výrobe syrov na zvýšenie stupňa proteolýzy tiež prispievajú k tvorbe BA (Greif a Greifová, 2006).

Využitím štartovacích kultúr v syrárskej technológii je možné významne znížiť koncentráciu histamínu, ale aj putrescínu a kadaverínu. Nizín produkovaný *Lactococcus lactis* a Enterococin EFS 2 a Enterocin 4 produkovaný *Enterococcus faecalis* výrazne inhibujú rast mikroorganizmov produkujúcich histamín v syroch, ktorého producentmi sú predovšetkým *Lactobacillus buchneri* a *Lactobacillus brevis* (Greif a Greifová, 2006).

ZÁVER

Lactococcus lactis má široké využitie v mliečnej produkcii vďaka svojim pozitívnym vlastnostiam. Značne prispieva k organoleptickej kvalite a textúre fermentovaných produktov chuťovými a textúrou ovplyvňujúcimi činiteľmi, vyprodukovanými kyselinami znižuje pH hodnotu prostredia, čím dochádza k zrážaniu mlieka a tiež k zamedzeniu rastu nežiaducich baktérií. Úlohou výskumov je izolovať nové kmene, skúmať ich pozitívne a negatívne vlastnosti a po selekcii ich aplikovať vo výrobe mliečnych produktov.

Acknowledgments:

This work was supported by grant APVV no. 07/0158.

LITERATÚRA

- ADAMBERG, K., KASK, S., LAHT, T. M., PAALME, T. 2003. The effect of temperature and pH on the growth of lactic acid bacteria: a pH-auxostat study. In *International Journal of Food Microbiology*, vol. 85, 2003, p. 171-183.
- AMMOR, M. S., FLÓREZ, A. B., MAYO, B. 2007. Antibiotic resistance in non-enterococcal lactic acid bacteria and bifidobacteria. In *Food Microbiology*, vol. 24, 2007, p. 559-570.
- AYALA-HERNÁNDEZ, I., HASSAN, A. N., GOFF, H. D., MIRA DE ORDUNA, R., CORREDIG, M. 2008. Production, isolation and characterization of exopolysaccharides produced by *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* JFR1 and their interaction with milk proteins: Effect of pH and media

- composition. In *International Dairy Journal*, vol. 18, 2008, p. 1109-1118.
- AYALA-HERNÁNDEZ, I., HASSAN, A. N., GOFF, H. D., CORREDIG, M. 2009. Effect of protein supplementation on the rheological characteristics of milk permeates fermented with exopolysaccharide-producing *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*. In *Food Hydrocolloids*, vol. 23, 2009, p. 1299-1304.
- BALCÁZAR, J. L., VENDRELL, D., DE BLAS, I., RUIZ-ZARZUELA, I., MUZQIZ, J. L., GIRONES, O. 2008. Characterization of probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from intestinal microbiota of fish. In *Aquaculture*, vol. 278, 2008, p. 188-191.
- BATISH, V. K., ROY, U., LAL, R., GROVER, S. 2009. Antifungal attributes of lactic acid bacteria – A review. In *Critical Reviews in Biotechnology*, vol. 17, 1997, p. 2009-2225.
- BERESFORD, T. P., FITZSIMONS, N. A., BRENNAN, N. L., COGAN, T. M. 2001. Recent advances in cheese microbiology. In *International Dairy Journal*, vol. 11, 2001, p. 259-274.
- BIBAL, B., GOMA, G., VAYSSIER, Y., PAREILLEUX, A. 1988. Influence of pH, lactose and lactic acid on the growth of *Streptococcus cremoris*: a kinetic study. In *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 28, 1988, p. 340-344.
- BOVER-CID, S., HUGAS, M., IZQUIERDO-PULIDO, M., VIDAL-CAROU, M. C. 2001. Amino acid-decarboxylase activity of bacteria isolated from fermented pork sausages. In *International Journal of Food Microbiology*, vol. 66, 2001, p. 185-189.
- BOVER-CID, S., MIGUÉLEZ-ARRIZADO, M. J., BECKER, B., HOLZAPFEL, W. H., CARMEN, M., VIDAL-CAROU, M. C. 2008. Amino acid decarboxylation by *Lactobacillus curvatus* CTC273 affected by the pH and glucose availability. In *Food Microbiology*, vol. 25, 2008, p. 269-277.
- BUŇKOVÁ, L., BUŇKA, F., POLLAKOVÁ, E., PODEŠVOVÁ, T., DRÁB, V., KRÁČMAR, S. 2010. Effect of aero-/anaerobiosis on decarboxylase activity of selected lactic acid bacteria. In *Potravinárstvo*, vol. 4, 2010, p. 5-7.
- BUŇKOVÁ, L., BUŇKA, F., HLOBILOVÁ, M., VANÁTKOVÁ, Z., NOVÁKOVÁ, D., DRÁB, V. 2009. Tyramine production of technological important strains of *Lactobacillus*, *Lactococcus* and *Streptococcus*. In *European Food Research and Technology*, vol. 229, 2009, p. 533-538.
- CACHON, R., DIVIÉS, C. 1994. Generalized model of the effect of pH on lactate fermentation and citrate bioconversion in *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* biovar *diacetylactis*. In *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 41, 1994, p. 694-699.
- CASALTA, E., MONTEL, M. CH. 2008. Safety assessment of dairy microorganisms: The *Lactococcus* genus. In *International Journal of Food Microbiology*, vol. 126, 2008, p. 271-273.
- CASTELLANO, P., BELFIORE, C., FADDA, S., VIGNOLO, G. 2008. A review of bacteriocinogenic lactic acid bacteria used as bioprotective cultures in fresh meat produced in Argentina. In *Meat Science*, vol. 79, 2008, p. 483-499.
- CORROLER, D., DESMASURES, N., GUEGUEN, M. 1999. Correlation between polymerase chain reaction of analysis of the histidine biosynthesis operon, randomly amplified polymorphic DNA analysis and phenotypic characterization of dairy *Lactococcus* isolates. In *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 51, 1999, p. 91-99.
- DE VUYST, L., DEGEEST, B. 1999. Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. In *FEMS Microbiology Reviews*, vol. 23, 1999, p. 153-177.
- EMBORG, J., DALGAARD, P. 2008. Growth, inactivation and histamine formation of *Morganella psychrotolerans* and *Morganella morganii* – development and evaluation of predictive models. In *International Journal of Food Microbiology*, vol. 128, 2008, p. 234-243.
- FERNÁNDEZ, M., LINARES, D. M., RODRÍGUES, A., ALVAREZ, M. A. 2007. Factors affecting tyramine production in *Enterococcus durans* IPLA 655. In *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 73, 2007, p. 1400-1406.
- FLÓREZ, A. B., DELGADO, S., MAYO, B. 2005. Antimicrobial susceptibility of lactic acid bacteria isolated from a cheese environment. In *Canadian Journal of Microbiology*, vol. 51, 2005, p. 51-58.
- FOLKENBERG, D. M., DEJMEK, P., SKRIVER, A., IPSEN, R. 2005. Relation between sensory texture properties and exopolysaccharide distribution in set and in stirred yogurts produced with different starter cultures. In *Journal of Texture Studies*, vol. 36, 2005, p. 174-189.
- GÁLVEZ, A., LOPEZ, R. L., ABRIQUEL, H., VALDIVIA, E., OMAR, N. B. 2008. Application of bacteriocins in the control of foodborne pathogenic and spoilage bacteria. In *Critical Reviews in Biotechnology*, vol. 28, 2008, p. 125-152.
- GARDINI, F., MARTUSCELLI, M., CARUSO, M. C., GALGANO, F., CRUDELE, M. A., FAVATI, F., GUERZONI, M. E., SUZZI, G. 2001. Effects of pH, temperature and NaCl concentration on the growth kinetics, proteolytic activity and biogenic amine production of *Enterococcus faecalis*. In *International Journal of Food Microbiology*, vol. 64, 2001, p. 105-117.
- GARDINI, F., ZACCARELLI, A., BELLETI, N., FAUSTINI, F., CAVAZZA, A., MARTUSCELLI, M., MASTROCOLA, D., SUZZI, G. 2005. Factors influencing biogenic amine production by a strain of *Oenococcus oeni* in a model system. In *Food Control*, vol. 16, 2005, p. 609-616.
- GARRIGA, M., PASCUAL, M., MONFORT, J. M., HUGAS, M. 1998. Selection of lactobacilli for chicken probiotic adjuncts. In *Journal of Applied Microbiology*, vol. 84, 1998, p. 125-132.
- GONZÁLES, L., SACRISTÁN, N., ARENAS, R., FRESNO, J. M., TORNADIJO, M. E. 2010. Enzymatic activity of lactic acid bacteria (with antimicrobial properties) isolated from a traditional Spanish cheese. In *Food Microbiology*, vol. 27, 2010, p. 592-597.
- GONZÁLES, L., SANDOVAL, H., SACRISTÁN, N., CASTRO, J. M., FRESNO, J. M., TORNADIJO, M. E. 2007. Identification of lactic acid bacteria isolated from Genestoso cheese throughout ripening and study of their antimicrobial activity. In *Food Control*, vol. 18, 2007, p. 716-722.
- GÖRNER, F., VALÍK, L. 2004. *Aplikovaná mikrobiológia potravín*. Malé centrum : Bratislava, 2004, 528 p.
- GREIF, G., GREIFOVÁ, M., KAROVIČOVÁ, J. 2006. Effects of NaCl concentration and initial pH value on biogenic amine formation dynamics by *Enterobacter* spp. bacteria in model conditions. In *Journal of Food and Nutrition Research*, vol. 45, 2006, p. 21-29.
- GREIF, G., GREIFOVÁ, M., KAROVIČOVÁ, J. 1997. Tvorba kadaverínu a amoniaku činnosťou niektorých baktérií za modelových podmienok. In *Czech Journal of Food Science*, 16, 1997, p. 53-56.

- GREIF, G., GREIFOVÁ, M. 2006. Štúdium analýzy biogénnych aminov vo vybraných mliečnych výrobkoch. In *Mliekarstvo*, vol. 37, 2006, p. 38-42.
- GREIFOVÁ, M., KRAJČOVÁ, E., GREIF, G., PAGURKO, A., SCHMIDT, S. 2008. Antimikrobiálna aktivita *Lactobacillus reuteri* a produkty metabolizmu počas fermentácie glycerolu. In *Mliekarstvo*, vol. 39, 2008, p. 19-24.
- GROBBEN, G. J., CHIN-JOE, I., KITZEN, V. A., BOELS, I. C., BOER, F., SIKKEMA, J. 1998. Enhancement of exopolysaccharide production by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* NCFB 2772 with a simplified defined medium. In *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 64, 1998, p. 1333-1337.
- HAINES, W. C., HARMON, L. G. 1973. Effect of selected lactic acid bacteria on growth of *Staphylococcus aureus* and production of enterotoxin. In *Applied Microbiology*, vol. 25, 1973a, p. 436-441.
- HAINES, W. C., HARMON, L. G. 1973. Effect of variations in conditions of incubation upon inhibition of *Staphylococcus aureus* by *Pediococcus cerevisiae* and *Streptococcus lactis*. In *Applied Microbiology*, vol. 25, 1973b, p. 169-172.
- HASSAN, A. N., FRANK, J. F., ELSODA, M. 2003. Observation of bacterial exopolysaccharide in dairy products using cryo-scanning electron microscopy. In *International Dairy Journal*, vol. 13, 2003, p. 755-762.
- HASSAN, A. N., FRANK, J. F., SCHMIDT, K. A., SHALABI, S. I. 1996. Rheological properties of yogurt made with encapsulated nonropy lactic cultures. In *Journal of Dairy Science*, vol. 79, 1996, p. 2091-2097.
- HERRERO, M., MAYO, B., GONZÁLES, B., SUÁREZ, J. E. 1996. Evaluation of technologically important traits in lactic acid bacteria isolated from spontaneous fermentations. In *Journal of Applied Bacteriology*, vol. 81, 1996, p. 565-570.
- CHAMPAGNE, C. P., GAGNON, D., ST-GELAIS, D., VUILLEMARD, J. C. 2009. Interactions between *Lactococcus lactis* and *Streptococcus thermophilus* strains in Cheddar cheese processing conditions. In *International Dairy Journal*, vol. 19, 2009, p. 669-674.
- CHARLIER, C., EVEN, S., GAUTIER, M., LE LOIR, Y. 2008. Acidification is not involved in the early inhibition of *Staphylococcus aureus* growth by *Lactococcus lactis* in milk. In *International Dairy Journal*, vol. 18, 2008, p. 197-203.
- CHAVES, A. C., FERNANDÉZ, M., LERAYER, A. L., MIERAU, I., KLEEREBEZEM, M., HUGENHOLTZ, J. 2002. Metabolic engineering of acetaldehyde production by *Streptococcus thermophilus*. In *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 68, 2002, p. 5656-5662.
- IYER, R., TOMAR, S. K., MAHESWARI, T. U., SINGH, R. 2010. *Streptococcus thermophilus* strains: Multifunctional lactic acid bacteria. In *International Dairy Journal*, vol. 20, 2010, p. 133-141.
- JEANSON, S., HILGERT, N., COQUILLARD, M. O., SEUKPANYA, C., FAIVELEY, M., NEVEU, P., ABRAHAM, CH., GEORGESCU, V., FOURCASSIÉ, P., BEUVIER, E. 2009. Milk acidification by *Lactococcus lactis* is improved by decreasing the level of dissolved oxygen rather than decreasing redox potential in the milk prior to inoculation. In *International Journal of Food Microbiology*, vol. 131, 2009, p. 75-81.
- JIN, L. Z., HO, Y. W., ABDULLAH, N., JALALUDIN, S. 1998. Acid and bile tolerance of *Lactobacillus* isolated from chicken intestine. In *Letters in Applied Microbiology*, vol. 27, 1998, p. 183-185.
- JUILLARD, V., LA BARS, D., KUNJI, E. R. S., KONINGS, W. N., RICHARD, J. 1995. Oligopeptides are the main source of nitrogen for *Lactococcus lactis* growth in milk. In *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 61, 1995, p. 3024-3010.
- KHEDID, K., FAID, M., MOKHTARI, A., SOULAYMANI, A., ZINEDINE, A. 2009. Characterization of lactic acid bacteria isolated from the one humped camel milk produced in Morocco. In *Microbiological Research*, vol. 164, 2009, p. 81-91.
- KIMOTO, H., NOMURA, M., KOBAYASHI, M., MIZUMACHI, K., OKAMOTO, T. 2003. Survival of *lactococci* during passage through mouse digestive tract. In *Canadian Journal of Microbiology*, vol. 49, 2003, p. 707-711.
- KIMOTO-NIRA, H., KOBAYASHI, M., NOMURA, M., SASAKI, K., SUZUKI, CH. 2009. Bile resistance in *Lactococcus lactis* strains varies with cellular fatty acid composition: analysis by using different growth media. In *International Journal of Food Microbiology*, vol. 131, 2009, p. 183-188.
- KIMOTO-NIRA, H., SUZUKI, CH. SASAKI, K., KOBAYASHI, M., MIZUMACHI, K. 2010. Survival of a *Lactococcus lactis* strain varies with its carbohydrate preference under in vitro conditions simulated gastrointestinal tract. In *International Journal of Food Microbiology*, vol. 143, 2010, p. 226-229.
- KLIJN, N., WEERKAMP, A. H., DE VOS, W. M. 1995. Genetic marking of *Lactococcus lactis* shows its survival in the human gastrointestinal tract. In *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 61, 1995, p. 2771-2774.
- KOLOŠTA, M. 1998. Vplyv faktorov prvovýroby na vhodnosť mlieka na výrobu syrov. In *Mliekarstvo*, vol. 29, 1998, p. 21-24.
- KRIZKOVA, L., ZITNANOVA, I., MISLOVICOVA, D., MASAROVA, J., SASINKOVA, V., DURACKOVA, Z., KRAJCOVIC, J. 2006. Antioxidant and antimutagenic activity of mannan neoglycoconjugates: Mannan-human serum albumine and mannan-penicillin G acylase. In *Mutation Research*, vol. 606, 2006, p. 72-79.
- KUNJI, E. R. S., MIERAU, I., HAGTING, A., POOLMAN, B., KONINGS, W. N. 1996. The proteolytic system of lactic acid bacteria. In *Antonie van Leeuwenhoek*, vol. 70, 1996, p. 187-221.
- LANDETE, J. M., FERRER, S., PARDO, I. 2007. Biogenic amine production by lactic acid bacteria, acetic bacteria and yeast isolated from wine. In *Food Control*, vol. 18, 2007, p. 1569-1574.
- LAWS, A. P., GU, Y., MARSHALL, V. M. 2001. Biosynthesis, characterization and design of bacterial exopolysaccharides from lactic acid bacteria. In *Biotechnology Advances*, vol. 19, 2001, p. 597-625.
- LEE, D. A., COLLINS, E. B. 1976. Influence of temperature on growth of *Streptococcus cremoris* a *Streptococcus lactis*. In *Journal of Dairy Science*, vol. 59, 1976, p. 405-409.
- LEE, H. J., JOO, Y. L., PARK, C. H., KIM, S. H., HWANG, I., AHN, J. G., HEEN, T.I. 1999. Purification and characterization of a bacteriocin produced by *L. lactis* subsp. *lactis* H559 isolated from kimchi. In *Journal of Bioscience and Bioengineering*, vol. 88, 1999, p. 153-159.
- LEVY, S. B., MARSHALL, B. 2004. Antibacterial resistance world wide: causes, challenges and responses. In *Nature Medicine*, vol. 10, 2004, p. 122-129.
- MACEDO, M. G., LACROIX, C., GARDNER, N. J., CHAMPAGNE, C. P. 2002. Effect of medium supplementation on exopolysaccharide production by *Lactobacillus rhamnosus* RW-9595M in whey permeate. In *International Dairy Journal*, vol. 12, 2002, p. 419-426.

- MC CUE, P., SHETTY, K. 2002. A biochemical analysis of mungbean (*Vigna radiata*) response to microbial polysaccharides and potential phenolic-enhancing effects for nutraceutical applications. In *Food Biotechnology*, vol. 16, 2002, p. 57-79.
- NORMARK, B. H., NORMARK, S. 2002. Evolution and spread of antibiotic resistance. In *Journal of Internal Medicine*, vol. 252, 2002, p. 91-106.
- PAN, D., MEI, X. 2010. Antioxidant activity of an exopolysaccharide purified from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 12. In *Carbohydrate polymers*, vol. 80, 2010, p. 908-914.
- PERRIN, S., GRILL, J. P., SCHNEIDER, F. 2000. Effects of fructooligosaccharides and their monomeric components on bile salt resistance in three species of bifidobacteria. In *Journal of Applied Microbiology*, vol. 88, 2000, p. 968-974.
- PICON, A., GARCÍA-CASADO, M. A., NUÑEZ, M. 2010. Proteolytic activities, peptide utilization and oligopeptide transport systems of wild *Lactococcus lactis* strains. In *International Dairy Journal*, vol. 20, 2010, p. 156-162.
- REDDY, G., ALTAF, MD., NAVEENA, B. J., VENKATESHWAR, M., KUMAR, E. V. 2008. Amylolytic bacterial lactic acid fermentation – A review. In *Biotechnology Advances*, vol. 26, 2008, p. 22-34.
- RODRIGUES, L. R., TEIXEIRA, J. A., VAN DER MEI, H. C., OLIVEIRA, R. 2006. Physicochemical and functional characterization of a biosurfactant produced by *Lactococcus lactis* 53. In *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, vol. 49, 2006, p. 79-86.
- RODRIGUES, L. R., VAN DER MEI, H. C., TEIXEIRA, J. A., OLIVEIRA, R. 2004. Influence of Biosurfactants from Probiotic Bacteria on Formation of Biofilms on Voice Prostheses. In *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 70, 2004a, p. 4408-4410.
- RODRIGUES, L. R., VAN DER MEI, H. C., TEIXEIRA, J. A., OLIVEIRA, R. 2004. Biosurfactant from *Lactococcus lactis* 53 inhibits microbial adhesion on silicone rubber. In *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 66, 2004b, p. 306-311.
- ROHWER, F., EDWARDS, R. 2002. The phage proteomic tree: a genome-based taxonomy for phage. In *Journal of Bacteriology*, vol. 184, 2002, p. 4529-4535.
- RUAS-MADIEDO, P., TUINIER, R., KANNING, M., ZOON, P. 2002. Role of exopolysaccharides produced by *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* on the viscosity of fermented milks. In *International Dairy Journal*, vol. 12, 2002, p. 689-695.
- SALMINEM, S., VON WRIGHT, A., MORELLI, L., MARTEAU, P., BRASSART, D., DE VOS, W. M., FONDÉN, R., SAXELIN, M., COLLINS, K., MOGENSEN, G., BIRKELAND, S. E., MATTILA-SANDHOLM, T. 1998. Demonstration of safety of probiotics – a review. In *International Journal of Food Microbiology*, vol. 44, 1998, p. 93-106.
- SANTOS, W. C., SOUZA, M. R., CERQUEIRA, M. M. O. P., GLORIA, M. B. A. 2003. Bioactive amine formation in milk by *Lactococcus* in the presence or not of rennet and NaCl at 20 and 32 °C. In *Food Chemistry*, vol. 81, 2003, p. 595-606.
- SCHLEIFER, K. H., KRAUS, J., DVORAK, C., KILLPER-BÄLZ, R., COLLINS, M. D., FISCHER, W. 1985. Transfer of *Streptococcus lactis* and related streptococci to the genus *Lactococcus* gen. nov. In *Systematic and Applied Microbiology*, vol. 6, 1985, p. 183-195.
- SIRÉN, N., SALONEN, K., LEISOLA, M., NYSSÖLÄ, A. 2009. A new salt inducible expression system for *Lactococcus lactis*. In *Biochemical Engineering Journal*, 2009, vol. 48, p. 132-135.
- SMIT, G., SMIT, B. A., ENGELS, W. J. M. 2005. Flavour formation by lactic acid bacteria and biochemical flavour profiling of cheese products. In *FEMS Microbiology Reviews*, vol. 29, 2005, p. 591-610.
- STOKES, D., ROSS, R. P., FITZGERALD, G. F., COFFEY, A. 2001. Application of *Streptococcus thermophilus* DPC1842 as a adjunct to counteract bacteriophage disruption in a predominantly lactococcal Cheddar cheese starter: use in bulk starter culture systems. In *Lait*, vol. 81, 2001, p. 327-334.
- TECHNICAL GUIDANCE. 2008. Update of the criteria used in the assessment of bacterial resistance to antibiotics of human or veterinary importance. In *The EFSA Journal*, 2008, 732, p. 1. 1-15.
- TEMMERMAN, R., POT, B., HUYS, G., SWINGS, J. 2003. Identification and antibiotic susceptibility of bacterial isolates from probiotic products. In *International Journal of Food Microbiology*, vol. 81, 2003, p. 1-10.
- VASILJEVIC, T., SHAH, N. P. 2008. Probiotics – From Metchnikoff to bioactives. In *International Dairy Journal*, vol. 18, 2008, p. 714-728.
- VOULOUMANOU, E. K., MAKRIS, G. C., KARAGEORGOPOULOS, D. E., FALAGAS, M. E. 2009. Probiotics for the prevention of respiratory tract infections: a systematic review. In *International Journal of Antimicrobial Agents*, vol. 34, 2009, p. 197.e1–197e.10.
- WEGENER, H. C. 2003. Antibiotics in animal feed and their role in resistance development. In *Current Opinion in Microbiology*, vol. 6, 2003, p. 439-445.
- WOUTERS, J. T. M., AYAD, E. H. E., HUGENHOLTZ, J., SMIT, G. 2002. Microbes from raw milk for fermented dairy products. In *International Dairy Journal*, vol. 12, 2002, p. 91-109.
- WU, M. H., PAN, T. M., WU, Y. J., CHANG, S. J., CHANG, M. S., HU, CH.Y. 2010. Exopolysaccharide activities from probiotic bifidobacterium: Immunomodulatory effects (on J774A.1 macrophages) and antimicrobial properties. In *International Journal of Food Microbiology*, vol. 144, 2010, p. 104-110.

Contact address:

Ing. Zuzana Hladíková, Institute of Biotechnology and Food Technology, Department of Food Technology, Faculty of Chemical and Food Technology, Slovak University of Technology, Radlinského 9, 812 37 Bratislava, Slovakia, E-mail: zuzana.hladikova@stuba.sk

Ing. Jana Smetanková, Institute of Biotechnology and Food Technology, Department of Food Technology, Faculty of Chemical and Food Technology, Slovak University of Technology, Radlinského 9, 812 37 Bratislava, Slovakia, E-mail: jana.smetankova@stuba.sk

Ing. Gabriel Greif, PhD., Institute of Biotechnology and Food Technology, Department of Food Technology, Faculty of Chemical and Food Technology, Slovak University of Technology, Radlinského 9, 812 37 Bratislava, Slovakia, E-mail: gabriel.greif@stuba.sk

doc. Ing. Mária Greifová, PhD., Institute of Biotechnology and Food Technology, Department of Food Technology, Faculty of Chemical and Food Technology, Slovak University of Technology, Radlinského 9, 812 37 Bratislava, Slovakia, E-mail: maria.greifova@stuba.sk