

# Možnosti snížení obsahu biogenních aminů u modelového vzorku sýra

Bc. Andrea Dlabajová

---

Diplomová práce  
2018

 Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická

---

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická  
Ústav technologie potravin  
akademický rok: 2017/2018

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Andrea Dlabajová**  
Osobní číslo: **T16233**  
Studijní program: **N2901 Chemie a technologie potravin**  
Studijní obor: **Technologie potravin**  
Forma studia: **prezenční**

Téma práce: **Možnosti snížení obsahu biogenních aminů u modelového vzorku sýra**

Zásady pro vypracování:

### I. Teoretická část

1. Přírodní sýry holandského typu.
2. Charakterizace a vlastnosti biogenních aminů.
3. Možnosti snížení obsahu biogenních aminů v potravinách.

### II. Praktická část

1. Výroba modelových vzorků přírodních sýrů a založení skladovacího experimentu.
2. Stanovení vybraných charakteristik modelových vzorků sýrů v průběhu zrání.
3. Zpracování výsledků a formulace závěrů.

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

[1] DONNELLY, C. W. Cheese and microbes. Washington, ASM Press, 2014. ISBN 978-1-55581-859-3

[2] FOX, P.F. Cheese: Chemistry, physics, and microbiology. 3rd ed., London, Elsevier, 2004. ISBN 0122636538.

[3] HERRERO-FRESNO, A., MARTÍNEZ, N., SÁNCHEZ-LLANA, E. et al. Lactobacillus casei strains isolated from cheese reduce biogenic amine accumulation in an experimental model. Int. J. Food Microbiol. 157: 297-304. 2012.

[4] del RIO, B., REDRUELLO, B., LADERO, V. et al. Putrescine production by Lactococcus lactis subsp. cremoris CECT 8666 is reduced by NaCl via a decrease in bacterial growth and the repression of the genes involved in putrescine production. Int. J. Food Microbiol. 232: 1-6. 2016.

[5] XIE, C., WANG, H.-H., DENG, S., XU, X.-L. The inhibition of cell-free supernatant of Lactobacillus plantarum on production of putrescine and cadaverine by four amine-positive bacteria in vitro. LWT Food Sci. Technol. 67: 106-111. 2016.

Vedoucí diplomové práce:

**doc. RNDr. Leona Buňková, Ph.D.**

Ústav inženýrství ochrany životního prostředí

Datum zadání diplomové práce:

**2. února 2018**

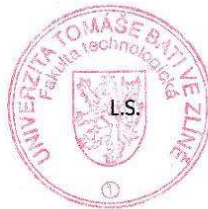
Termín odevzdání diplomové práce:

**25. dubna 2018**

Ve Zlíně dne 2. února 2018



doc. Ing. František Buňka, Ph.D.  
*děkan*



doc. Ing. František Buňka, Ph.D.  
*ředitel ústavu*

Příjmení a jméno: ANDREA DLABAJOVA

Obor: TECHNOLOGIE  
POTRAVIN

## 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 <sup>1)</sup>;
- 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 <sup>2)</sup>;
- beru na vědomí, že podle § 60 <sup>3)</sup> 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 <sup>3)</sup> odst. 2 a 3 mohu užít své dílo – diplomovou/bakalářskou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- beru na vědomí, že pokud bylo k vypracování diplomové/bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tedy pouze k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové/bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- beru na vědomí, že pokud je výstupem diplomové/bakalářské práce jakýkoliv softwarový produkt, považují se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Ve Zlíně 10.5.2018

Andrea Dlabajová

---

<sup>1)</sup> 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.

<sup>2)</sup> 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 vzdělávacího zařízení (školní dílo).

<sup>3)</sup> 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). Odpirá-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.

## ABSTRAKT

Diplomová práce je zaměřena na sledování vlivu dekarboxyláza-pozitivních (*Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 946) a degradujících kmenů mikroorganismů (*Micrococcus luteus* BD29 a *Pseudomonas fulva* BD13) na obsah biogenních aminů u modelového vzorku sýra holandského typu v průběhu 88 denního zrání. Sledována byla také texturní profilová analýza, chemická analýza a zastoupení mikroorganismů v průběhu zrání sýru. Ve všech vzorcích byl detekován pouze tyramin. Z výsledků je patrné, že přídavek biogenní aminy degradujících kmenů snižuje produkci tyraminu.

Klíčová slova: biogenní aminy, sýry holandského typu, tyramin, dekarboxyláza-pozitivní kmeny, biogenní aminy degradující kmeny

## ABSTRACT

The thesis is focused on the effect of decarboxylase positive (*Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 946) and biogenic amine-degrading starter strains (*Micrococcus luteus* BD29 and *Pseudomonas fulva* BD13) on production of biogenic amines in a model system of Dutch-type cheese during a 88-day ripening. Microflora of milk and cheese, the development of textural properties and chemical analyse were also observed during cheese ripening. Only tyramine was detected in all samples. The results show that the addition of the biogenic amine-degrading starter strains resulted to a decrease in production of biogenic amines.

Keywords: biogenic amines, Dutch-type cheese, tyramine, biogenic amine-producing starter strains, biogenic amine-degrading starter strains

Chtěla bych poděkovat vedoucí mé bakalářské práce doc. RNDr. Leoně Buňkové Ph.D. za odborné vedení, ochotu, čas, cenné rady, trpělivost a vstřícnost při konzultacích.

Také bych chtěla poděkovat doc. Ing. Vendule Pachlové, Ph.D., Ing. Ludmile Zálešákové a Anetě Růčkové za ochotu a pomoc při zpracování praktické části této bakalářské práce. Poděkování patří i celé mé rodině za trpělivost a podporu při studiu.

Tato práce vznikla za podpory projektu Ministerstva zemědělství, Národní agentury pro zemědělský výzkum – program aplikovaného výzkumu ZEMĚ, číslo projektu QK1710156 a Interní grantové agentury Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně č. IGA/FT/2018/003.

Prohlašuji, že odevzdaná verze bakalářské/diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou totožné.

# OBSAH

<b>ÚVOD.....</b>	<b>11</b>
<b>I TEORETICKÁ ČÁST.....</b>	<b>12</b>
<b>1 BIOGENNÍ AMINY.....</b>	<b>13</b>
1.1 CHARAKTERISTIKA BIOGENNÍCH AMINŮ.....	13
1.2 VZNIK BIOGENNÍCH AMINŮ .....	13
1.3 ROZDĚLENÍ BIOGENNÍCH AMINŮ.....	14
1.4 VÝSKYT BIOGENNÍCH AMINŮ V POTRAVINÁCH.....	14
1.4.1 Sýry .....	15
1.4.1.1 Zastoupení biogenních aminů v různých druzích sýrů .....	15
1.4.1.2 Mikroorganismy produkující biogenní aminy v sýrech .....	17
1.4.1.3 Faktory ovlivňující tvorbu biogenních aminů v sýrech.....	17
1.4.1.4 Vliv pasterace na obsah biogenních aminů v sýrech .....	18
1.4.2 Alkoholické nápoje .....	19
1.4.3 Maso.....	19
1.4.4 Potraviny rostlinného původu .....	19
1.5 PRODUKCE BIOGENNÍCH AMINŮ .....	19
<b>2 MOŽNOSTI ELIMINACE BIOGENNÍCH AMINŮ .....</b>	<b>21</b>
2.1 STARTOVACÍ MIKROFLÓRA.....	21
2.2 DEGRADACE BIOGENNÍCH AMINŮ.....	22
2.2.1 <i>Lactobacillus</i> .....	22
2.2.2 <i>Brevibacterium</i> .....	23
2.2.3 <i>Micrococcus</i> .....	23
2.2.4 <i>Staphylococcus</i> .....	23
2.2.5 <i>Bacillus</i> .....	24
2.2.6 <i>Pseudomonas</i> .....	24
2.2.7 <i>Citrobacter</i> .....	24
<b>3 PŘÍRODNÍ SÝRY HOLANDESKÉHO TYPU .....</b>	<b>25</b>
3.1 TECHNOLOGIE VÝROBY .....	25
3.1.1 Úprava mléka .....	25
3.1.1.1 Standardizace .....	25
3.1.1.2 Pasterace .....	26
3.1.1.3 Baktofugace .....	27
3.1.1.4 Přídavné látky .....	27
3.1.2 Přídavek čistých mlékařských kultur .....	27
3.1.3 Sýření .....	28
3.1.4 Zpracování sýřeniny.....	28
3.1.4.1 Krájení .....	29
3.1.4.2 Míchání .....	29
3.1.4.3 Dohřívání .....	29
3.1.5 Formování sýřeniny .....	30
3.1.6 Lisování.....	30
3.1.7 Solení.....	30



3.1.8	Zrání .....	31
3.1.8.1	První fáze zrání .....	31
3.1.8.2	Druhá fáze zrání .....	32
3.1.8.3	Proteolýza .....	32
3.1.8.4	Lipolýza .....	32
3.1.8.5	Reakce volných aminokyselin .....	32
<b>II</b>	<b>PRAKTICKÁ ČÁST .....</b>	<b>33</b>
<b>4</b>	<b>METODIKA .....</b>	<b>34</b>
4.1	VÝROBA MODELOVÝCH VZORKŮ SÝRA .....	34
4.1.1	Materiál a pomůcky .....	34
4.1.1.1	Příprava prostor .....	35
4.1.1.2	Příprava provozního zákysu .....	35
4.1.1.3	Úprava mléka .....	35
4.1.1.4	Sýření mléka .....	36
4.1.1.5	Zpracování sýřeniny .....	36
4.1.1.6	Formování a lisování .....	36
4.1.1.7	Solení sýrů a balení .....	37
4.2	ZÁKLADNÍ CHEMICKÁ ANALÝZA .....	37
4.2.1	Stanovení obsahu sušiny .....	37
4.2.2	Stanovení obsahu tuku .....	38
4.2.3	Stanovení pH .....	38
4.2.4	Stanovení obsahu soli .....	38
4.3	TEXTURNÍ PROFILOVÁ ANALÝZA .....	39
4.4	MIKROBIOLOGICKÝ ROZBOR .....	39
4.5	STANOVENÍ OBSAHU VOLNÝCH AMINOKYSELIN .....	40
4.6	STANOVENÍ OBSAHU BIOGENNÍCH AMINŮ .....	41
4.6.1	Derivatizace .....	41
4.6.2	Vlastní chromatografické stanovení .....	41
<b>5</b>	<b>VÝSLEDKY A DISKUZE .....</b>	<b>42</b>
5.1	ZÁKLADNÍ CHEMICKÁ ANALÝZA .....	42
5.1.1	Stanovení obsahu sušiny .....	42
5.1.2	Stanovení obsahu tuku v sušině .....	43
5.1.3	Stanovení pH .....	44
5.1.4	Stanovení obsahu soli .....	45
5.2	TEXTURNÍ PROFILOVÁ ANALÝZA .....	46
5.3	MIKROBIOLOGICKÝ ROZBOR .....	47
5.3.1	Celkový počet mikroorganismů .....	47
5.3.2	Mléčné koky .....	49
5.3.3	Bakterie rodu <i>Lactobacillus</i> .....	50
5.4	STANOVENÍ OBSAHU VOLNÝCH AMINOKYSELIN .....	51
5.5	STANOVENÍ OBSAHU BIOGENNÍCH AMINŮ .....	54
5.5.1	Tyramin .....	54
	<b>ZÁVĚR .....</b>	<b>58</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....</b>	<b>60</b>

<b>SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....</b>	<b>69</b>
<b>SEZNAM OBRÁZKŮ .....</b>	<b>70</b>
<b>SEZNAM TABULEK.....</b>	<b>71</b>

## ÚVOD

Biogenní aminy jsou nízkomolekulární zásadité dusíkaté látky, nacházejí se v buňkách rostlinných i živočišných tkání a jejich výskyt je sledován především u potravin, kde jsou považovány za indikátory bakteriálního kažení. Jejich příjem ve vysokých koncentracích má negativní vliv na organismus, může způsobovat hypotenzi, hypertenzi, zvracení, bušení srdce, migrény a dýchací potíže. Z těchto důvodů v posledních dvou desetiletích značně zesílil zájem o jejich výzkum.

Biogenní aminy se vyskytují v potravinách, které jsou bohaté na proteiny nebo volné aminokyseliny. Vznikají dekarboxylací těchto aminokyselin působením živých organismů za účasti enzymů dekarboxyláz. Sýry jsou ideálním prostředím pro tvorbu biogenních aminů díky přítomnosti bakterií podílejících se na výrobě a také tvorbě aminokyselin při proteolýze v průběhu zrání sýrů.

Z hlediska bezpečnosti potravin a zdraví konzumenta je potřeba předejít hromadění biogenních aminů v potravinách. K jejich snížení nebo minimalizaci výskytu lze využít amin-negativní (neprodukující) nebo amin-oxidující (degradující) mikroorganismy nebo enzymy, které biogenní aminy oxidují. K dalším významným metodám patří výběr startérových kultur, obalových materiálů, ošetření vysokým hydrostatickým tlakem, ozáření nebo použití některých přídatných látek.

## **I. TEORETICKÁ ČÁST**

# 1 BIOGENNÍ AMINY

## 1.1 Charakteristika biogenních aminů

Biogenní aminy (BA) jsou zásadité dusíkaté sloučeniny, vznikají dekarboxylací aminokyselin, aminací nebo transaminací aldehydů a ketonů. Mají nízkou molekulovou hmotnost a vyskytující se v rostlinných buňkách a živočišných tkáních. V organismu mají důležité fyziologické funkce, jsou například zdrojem dusíku v biochemických reakcích, působí jako prekurzory pro syntézu hormonů, nukleových kyselin, proteinů a alkaloidů, také mají vliv na regulaci buněčného růstu. V nadměrném množství ale mohou mít nežádoucí až toxické účinky. Patří mezi ukazatele bakteriálního kažení, a proto je jejich výskyt sledován především u potravin. V nízkých koncentracích jsou přirozenou součástí potravin, vysoké koncentrace jsou ovšem známkou pokročilého stupně kažení [1, 2, 3].

## 1.2 Vznik biogenních aminů

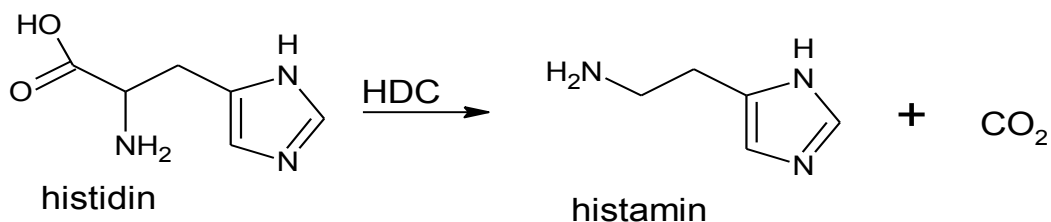
Nejčastějším způsobem vzniku biogenních aminů je jejich vznik z aminokyselin působením enzymů dekarboxyláz, kofaktorem je pyridoxalfosfát. Enzym z karboxylové skupiny aminokyseliny odštěpí oxid uhličitý a vznikne amin. U potravin je to nejčastěji za účasti bakteriálních dekarboxyláz. Další možný způsob vzniku je aminace nebo transaminace aldehydů a ketonů. V tabulce 1 jsou uvedeny jednotlivé aminokyseliny jako prekurzory pro vznik biogenních aminů [4,5].

Tabulka 1. Biogenní aminy a jejich prekurzory [7]

<b>Biogenní amin</b>	<b>Původní aminokyselina</b>
histamin	histidin
kadaverin	lyzin
putrescin	arginin, ornitin
agmatin	arginin
fenyletylamin	fenylalanin
tyramin	tyrozin
dopamin	3,4 - dihydroxyfenylalanin
tryptamin	tryptofan

Pro tvorbu biogenních aminů v potravinách je důležitá aktivita mikrobiálních dekarboxylačních enzymů. Tuto aktivitu ovlivňuje mnoho faktorů, mezi které patří například teplota, doba skladování potraviny, aktivita vody, pH nebo redoxní potenciál [4, 5, 6].

Na obrázku 1 je zobrazen vznik histaminu z aminokyseliny histidinu za přítomnosti enzymu histidindekarboxylázy [7].



Obrázek 1. Vznik histaminu z aminokyseliny histidinu za účasti enzymu histidindekarboxylázy (HDC).

### 1.3 Rozdělení biogenních aminů

Biogenní aminy můžeme dělit do skupin podle jejich chemické struktury na:

- alifatické: putrescin, kadaverin
- aromatické: tyramin, 2-fenyletylamin
- heterocyklické: histamin a tryptamin
- polyaminy: spermin, spermidin, putrescin případně i agmatin.

Pro zjednodušení se mohou heterocyklické aminy řadit mezi aromatické nebo se k polyaminům mohou přiřadit i diaminy. Spermin a spermidin lze zařadit mezi polyaminy i mezi alifatické aminy [1, 3, 8].

### 1.4 Výskyt biogenních aminů v potravinách

Biogenní aminy můžeme nalézt v různých typech potravin, zejména v potravinách, které jsou bohaté na bílkoviny. V nízkých koncentracích jsou součástí řady potravin, větší koncentrace se předpokládají u fermentovaných potravin, na jejichž výrobě se podílejí mikroorganismy. Obsah biogenních aminů kolísá ve velmi rozsáhlém rozmezí až několika řádů

v závislosti na spoustě faktorů. Biogenní aminy jsou také prekurzory určitých aromatických látek a dávají potravinám typickou chuť zralých potravin [3, 10].

Pro vznik biogenních aminů v potravinách musí být splněny tři základní podmínky:

1. Přítomnost aminokyselin v substrátu
2. Přítomnost mikroorganismů s dekarboxylázovou aktivitou
3. Vhodné podmínky pro růst a množení mikroorganismů.

Obsah biogenních aminů se liší ve fermentovaných a nefermentovaných potravinách.

Mezi fermentované potraviny řadíme zrající sýry, fermentované alkoholické nápoje (víno, pivo), fermentovanou zeleninu, fermentované masné výrobky a ryby a rybí výrobky. U těchto potravin jsou biogenní aminy produkovány hlavně během fermentace a dozrávání. Za produkci biogenních aminů u fermentovaných potravin jsou zodpovědné zejména grampozitivní bakterie rodu *Lactobacillus*. Gramnegativní bakterie jsou zpravidla inhibovány samotným procesem fermentace [9, 10, 11].

V nefermentovaných potravinách vznikají biogenní aminy převážně působením hnilobných bakterií. Nejčastěji se vyskytují v mase v důsledku nesprávného skladování. Výskyt biogenních aminů lze předpokládat i v ovoci a zelenině v pokročilém stádiu kažení [12, 13, 14].

#### 1.4.1 Sýry

Při proteolýze, v průběhu zrání sýrů, jsou mléčné bílkoviny rozkládány až na aminokyseliny. Dostupnost těchto aminokyselin a přítomnost bakterií podílejících se na výrobě dělají ze sýrů ideální prostředí pro tvorbu biogenních aminů [13, 14, 15].

##### 1.4.1.1 Zastoupení biogenních aminů v různých druzích sýrů

Různé druhy sýrů mají odlišný obsah BA, tyto rozdíly jsou především způsobeny jiným výrobním postupem (použitím startovacích kultur, dobou trvání zrání a jeho podmínkami. Podle profilu biogenních aminů (s přihlédnutím na nejvyšší přípustná množství) můžeme sýry dělit na:

- sýry s vysokým obsahem biogenních aminů - měkké zrající sýry (např. Romadur, tvarůžky, brynza), sýry s vysokodohřivanou sýřeninou (např. ementál)

- sýry se zvýšeným obsahem biogenních aminů - sýry s nízkodohřívanou sýřeninou (např. eidam), plísňové sýry (např. Hermelín, Niva), kozí sýry
- sýry s nízkým obsahem biogenních aminů - smetanové, čerstvé (cottage, ricotta), termizované měkké sýry (např. Lučina).

Čerstvé sýry, vyrobené z pasterovaného mléka, neobsahují téměř žádné biogenní aminy, hlavním důvodem je absence zrání [13, 14, 52, 53, 54].

Sýry zrající v solném nálevu mají nízký obsah biogenních aminů, a to z důvodu nízkého pH, vysoké koncentraci soli, ne příliš rozsáhlé proteolýzy a solnému nálevu, kam migrují volné aminokyseliny [14, 15].

Měkké zrající sýry jsou sýry, které mohou mít vysoký obsah biogenních aminů. Ve studii Standarová et al. zaměřené na stanovení obsahu biogenních aminů v sýrech z české obchodní sítě byly nalezeny nejvyšší koncentrace celkových BA u tvarůžků (2 540 mg/kg), brynzy (2 490 mg/kg) a u ostatních měkkých zrajících sýrů [22].

Podle studie Standarová et al. měly sýry s bílou plísní na povrchu nebo plísní uvnitř hmoty velmi odlišný obsah biogenních aminů u různých výrobců. Celkově však byly koncentrace BA u těchto sýrů nízké [22].

Hlavními biogenními aminy vyskytující se v sýrech jsou tyramin, putrescin, kadaverin a histamin, jsou obsaženy v jednotkách až stovkách mg/kg. 2-fenylethylamin se v sýrech vyskytuje v jednotkách až desítkách mg/kg tryptamin je zastoupený ve velmi malých množstvích. Množství se nemusí lišit jen v závislosti na typu sýru, rozdílné hodnoty se mohou objevit i v rámci stejného typu sýru [16, 17, 18]. Některé druhy sýrů a biogenní aminy, které se v těchto sýrech vyskytují, jsou uvedeny v tabulce č. 2.

Tabulka 2. Biogenní aminy vyskytující se v různých druzích sýrů [23]

<b>Brie</b>	kadaverin	<b>Gouda</b>	kadaverin
	putrescin		putrescin
<b>Camembert</b>	kadaverin		tryptamin
	putrescin		tyramin
	tyramin	<b>Mozzarella</b>	kadaverin
<b>Čedar</b>	histamin	<b>Parmezán</b>	tyramin
	putrescin	<b>Roquefort</b>	kadaverin
	tyramin		putrescin
	fenyletylamin		Tyramin



#### **1.4.1.2 Mikroorganismy produkující biogenní aminy v sýrech**

Nejběžnějšími druhy mikroorganismů produkující biogenní aminy v sýrech jsou *Lactobacillus buchneri*, *L. acidophilus*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. casei*, *L. plantarum*, *Bacillus macerans*, *Propionibacterium* sp., *Enterococcus faecium* a *Streptococcus mitis*. Mikroorganismy zodpovědné za vznik biogenních aminů v sýrech mohou být přítomny již v mikroflóře mléka, použity jako startérové kultury nebo součástí kontaminace v průběhu výroby [24, 25].

Po rybách je sýr nejčastější potravinou spojovanou s otravou histaminem, a to především díky grampozitivní bakterii *Lactobacillus buchneri*, která má gen pro produkci histidindekarboxylázy. Díky tomuto enzymu vzniká z aminokyseliny histidinu dekarboxylací histamin. Vyšší pH a zračí teploty sýrů zvyšují schopnost tohoto mikroorganismu tvořit histamin.

Bakterie rodu *Lactobacillus* nejsou zodpovědné při výrobě sýrů jen za tvorbu histaminu, ale i tvorbu tyraminu a putrescinu [24].

#### **1.4.1.3 Faktory ovlivňující tvorbu biogenních aminů v sýrech**

Obsah BA v sýrech ovlivňuje spousta faktorů, mezi které patří doba zrání sýrů, teplota v průběhu zrání, druh sýru, aktivita vody, obsah soli, obsah tuku, hygiena v průběhu výroby, výběr startovacích kultur, pasterace, homogenizace, teplota syřidla, atd. [26, 27, 28]

Zrající sýry obsahují vyšší průměrné koncentrace aminů než čerstvé sýry, ve většině případů platí, že čím déle proces zrání trvá, tím je koncentrace BA vyšší. V průběhu zrání sýrů se může zvýšit počet biogenních aminů z původního 1 mg/l v mléce na stovky až tisíce mg/kg ve vyzrálých sýrech. Je nutné udržovat nízké teploty při skladování, aby byla co nejvíce utlumena dekarboxylační aktivita mikroorganismů [27, 28, 74].

Nemalý vliv má i tvar sýru, kdy se vyšší obsah BA vyskytuje v kulatých sýrech ve srovnání s pravoúhlými. Vnější část sýru má podstatně vyšší obsah BA než část vnitřní, i přesto že v průběhu zrání dochází k odparu vody, tedy ke snižování vodní aktivity především v povrchové části sýru. Vodní aktivita je sice pro řadu mikroorganismů limitujícím faktorem, ovšem rozdíl mezi aktivitou vody ve vnější a vnitřní části sýru je příliš malý, aby to mohlo mít vliv na koncentraci BA. Odlišné množství biogenních aminů v různých částech sýru je zřejmě dáno různými podmínkami, které ovlivňují aktivitu a růst jednotlivých mikroorganismů.

Důležitý je i výběr obalu, při zrání pod fólií se vyskytuje vyšší obsah biogenních aminů než při zrání pouze pod kůrou [28, 29, 30].

Významný vliv má i hodnota pH, která ovlivňuje dekarboxylázovou aktivitu. Optimální pH pro tyrozindekarboxylázovou a histidindekarboxylázovou aktivitu je pH 5. Obecně se vyšší aktivita obvykle pohybuje v kyselejší oblasti (pH 4-5,5), kdy jsou mikroorganismy silněji povzbuzeny k produkci dekarboxylázových enzymů jako součást jejich obranného mechanismu proti překyselení [25, 27].

Také vysokotlaká homogenizace má příznivý vliv na snížení obsahu BA, dochází při ní totiž k deaktivaci většiny mikroorganismů a tím i k výraznému poklesu obsahu BA. Vysokotlaká homogenizace se primárně používá k vyšší výtěžnosti a zkrácení doby zrání.

Při výrobě sýrů je nutné dodržovat hygienické zásady při získávání a zpracování surovin. Použití kvalitního mléka a dobré hygienické postupy při výrobě sýrů jsou důležité pro snížení rizika tvorby biogenních aminů. V mikroflóře kravského mléka jsou přítomny některé polyaminy a lze je stanovit i po zpracování ve finálních výrobcích, je to především putrescin a spermidin [26, 27, 28, 29, 30].

#### ***1.4.1.4 Vliv pasterace na obsah biogenních aminů v sýrech***

Obecně vyšší hodnoty BA se objevují u sýrů vyrobených z nepasterizovaného mléka kvůli vyššímu výskytu bakterií čeledi *Enterobacteriaceae* a non-startérových laktobacilů. Přítomnost bakterií čeledi *Enterobacteriaceae* v sýřenině ukazuje na kontaminaci během výroby sýrů po pasterizaci. Pasterací dojde také k inaktivaci některých proteáz a tedy pomalejší proteolýze a následnému vzniku BA. Eliminace bakterií a inaktivace proteáz má přímý vliv na proteolýzu a dostupnost prekurzorů – aminokyselin [9, 13].

Novella-Rodríguez et al. ve své studii posuzují obsah BA v kozích sýrech vyrobených z pasterizovaného a nepasterizovaného mléka v průběhu 90 dní. Zatímco u syrového mléka bylo největší množství naměřeno u sperminu a spermidinu, v hotovém výrobku byly tyto aminy zastoupeny jen minoritně. V průběhu dozrávání se obsah ostatních aminů zvyšoval a ke konci studie bylo nejvíce tyraminu. Konečné množství tyraminu v sýrech vyrobených ze syrového mléka bylo 30x vyšší než v sýrech z pasterizovaného mléka. 7x vyšší obsah u sýrů vyrobených ze syrového mléka oproti pasterovanému byl naměřen také u kadaverinu, putrescinu, histaminu a tryptaminu [30].

### 1.4.2 Alkoholické nápoje

Ve vínu je výskyt biogenních aminů přisuzován aktivitě kvasinek při primární fermentaci, přítomnosti bakterií mléčného kvašení a jablečno-mléčnému kvašení zajišťující odkyselení vína. Běžnými biogenními aminy vyskytujícími se ve víně jsou tyramin, histamin, putrescin, kadaverin a 2-fenyletylamin. Obsah biogenních aminů ve víně se může pohybovat od několika mg/l do přibližně 50 mg/l, kdy se obsah může lišit v závislosti na kvalitě použitých surovin, možné mikrobiální kontaminaci v průběhu výroby a době a podmínkách skladování [31, 32].

Výskyt biogenních aminů v pivu závisí na množství mikroorganismů v mladině, typu sladu a jiných surovin, technologickém postupu výroby, mikrobiální kontaminaci během procesu výroby a podmínkách skladování. V pivu můžeme nalézt putrescin, agmatin, spermin a spermidin, tyto biogenní aminy většinou pocházejí z původní suroviny a jsou běžnou součástí piva. Vyskytovat se v pivu může ale i histamin, tyramin a kadaverin, které naopak ukazují na nežádoucí kontaminaci při procesu výroby [33].

### 1.4.3 Maso

Maso je velmi bohaté na bílkoviny a volné aminokyseliny fungující jako prekurzory pro tvorbu biogenních aminů. Přirozeně se zde vyskytuje spermin a spermidin, v důsledku skladování však mohou být přítomny i jiné biogenní aminy, především tyramin, kadaverin, putrescin a histamin [34].

### 1.4.4 Potraviny rostlinného původu

V ovoci a zelenině se biogenní aminy nacházejí ve velmi malém množství, které nemá negativní účinky pro organismus. Zvýšené hodnoty v těchto potravinách se můžou vyskytnout, pokud ovoce a zelenina nebyly řádně skladovány nebo s nimi bylo nesprávně manipulováno [9].

## 1.5 Produkce biogenních aminů

Množství a typ biogenního aminu závisí na druhu mikroorganismu, který jej produkuje, a také na typu potraviny, ve které se daný mikroorganismus nachází. Dekarboxylázy aminokyselin nejsou u bakterií zpravidla časté. Objevují se u rodů *Bacillus*, *Citrobacter*, *Clostridium*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Photobacterium*, *Pseudomonas*, *Proteus*, *Salmonella*,

*Shigella* a mléčných bakterií rodu *Lactobacillus*, *Pediococcus* a *Enterococcus* [2, 35]. Bakterie produkující biogenní aminy u různých typů potravin jsou uvedeny v tabulce 3 [9].

Tabulka 3 Přítomnost biogenních aminů a bakterií, které je produkují, v potravinách [9]

Potraviny	Bakterie	Vytvářené aminy
<b>Ryby</b>	<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> spp., <i>Staphylococcus xylosus</i>	histamin, tyramin, kadaverin, putrescin, agmatin, spermin, spermidin
<b>Sýry</b>	<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>Paenibacillus macerans</i> , <i>Propionibacterium</i> spp.	histamin, kadaverin, putrescin, tyramin, fenyletylamin, tryptamin
<b>Maso a masné výrobky</b>	rody <i>Pediococcus</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Micrococcus</i> , čeleď <i>Enterobacteriaceae</i>	histamin, kadaverin, putrescin, tyramin, fenyletylamin, tryptamin
<b>Fermentovaná zelenina</b>	<i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides</i> , <i>Pediococcus</i> spp.	histamin, kadaverin, putrescin, tyramin, tryptamin
<b>Fermentované produkty ze sóje</b>	<i>Rhizopus oligosporus</i> , <i>Trichosporon beiglii</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i>	histamin, kadaverin, putrescin, tyramin, tryptamin

## 2 MOŽNOSTI ELIMINACE BIOGENNÍCH AMINŮ

Z hlediska bezpečnosti potravin a zdraví konzumenta je potřeba předejít hromadění biogenních aminů v potravinách. K jejich snížení nebo minimalizaci výskytu lze využít amin-negativní (neprodukující) nebo amin-oxidující (degradující) mikroorganismy nebo enzymy, které biogenní aminy oxidují. K dalším významným metodám patří výběr startérových kultur, obalových materiálů, ošetření vysokým hydrostatickým tlakem, ozáření nebo použití některých přídatných látek [36, 37].

### 2.1 Startovací mikroflóra

Výběr vhodné startovací kultury při výrobě fermentovaných potravin je jeden z neúčinnějších způsobů snížení koncentrace biogenních aminů v těchto potravinách. Startovací kultura je komerční preparát obsahující živé mikroorganismy, při výrobě fermentovaných potravin se využívá jejich metabolické aktivity. Při správném teplotním režimu odbourávají sacharidy na organické kyseliny a tím snižují pH, štěpí lipidy a bílkoviny, také redukuje dusičnany na dusitany. Díky startovacím kulturám se ve výrobku tvoří typické aroma a chuť a prodlužuje se trvanlivost. Startovací kultury nejčastěji obsahují bakterie mléčného kvašení, které tvoří [36, 37, 38]:

- kyselinu mléčnou ze sacharidů
- antimikrobní látky – bakteriociny
- látky aromatické a chuťové.

Některé kmeny bakterií, používaných při výrobě fermentovaných potravin jako startovací kultury, tvoří biogenní aminy. Proto je jedním z požadavků použití startovacích kultur bez dekarboxylázové aktivity. Tyto kultury nejsou schopné dekarboxylovat aminokyseliny za vzniku biogenních aminů, jsou tzv. amin-negativní.

Existuje ale také skupina amin-oxidačních startérových kultur, které jsou schopné oxidovat biogenní aminy na aldehyd, peroxid vodíku a amoniak [38, 39].

Mnohé studie dokazují možnost snížení obsahu biogenních aminů v důsledku použití určité startovací kultury. Například k výraznému snížení obsahu tyraminu došlo při použití *Kocuria varians* jako startovací kultury při výrobě fermentovaných uzenin. *Lactobacillus plantarum* účinně potlačoval produkci tyraminu a kadaverinu v kysaném zelí [39].

## 2.2 Degradace biogenních aminů

K degradaci již vzniklých biogenních aminů v potravinách lze využít enzym aminoroxidázu. Tento enzym může být izolován z orgánů prasat (játra, ledviny), z lidské placenty a krevní plazmy nebo ze samotných mikroorganismů. K účinné degradaci biogenních aminů lze přímo použít i bakterie, které tento enzym vytvářejí. Schopnost degradovat biogenní aminy za pomoci enzymu aminoroxidázy byla prokázána u některých bakterií rodů:

- *Bacillus*
- *Brevibacterium*
- *Lactobacillus*
- *Micrococcus*
- *Staphylococcus*
- *Halomonas*
- *Rhodococcus*

Aktivita aminoroxidáčních enzymů bakterií závisí na různých faktorech, například koncentrace solí v potravine nebo teplotě skladování [40, 41, 42].

### 2.2.1 *Lactobacillus*

*Lactobacillus* je rod grampozitivních, fakultativně anaerobních či mikroaerofilních, nepohyblivých a nesporulujících bakterií z kmene *Firmicutes*. Některé laktobacily se používají při výrobě jogurtu, sýru, piva, cideru, vína, nakládaných okurek, kysaného zelí a dalších typů fermentovaných potravin.

*Lactobacillus casei* je homofermentativní druh, který je hojně využíván při výrobě sýrů, byla u něho prokázána vysoká aktivita při odbourávání histaminu, putrescinu a tyraminu při výrobě sýrů. Výzkum byl proveden na třech vzorcích sýrů (Zamorano, Cabrales, Emental) [43, 44].

Degradace histaminu z 30-50% za použití bakterií *Lactobacillus sakei* a *Vergibacillus halodonitrificans* byla prokázána u rybí pasty Rihaakuru vyrobené z tuňáka. Tato pasta je považována za tradiční pokrm maledivské kuchyně. Lepšího výsledku při degradaci histaminu ale docílili použitím diaminooxidázy izolované z prasečích jater, kdy koncentrace histaminu při použití tohoto enzymu byla pod detekčním limitem (<0,1 mg/kg). V tomto případě bylo tedy pro vyšší účinnost výhodnější využít přímo enzym diaminooxidázu. Nejlepším řešením by ovšem bylo zabránit růstu mikroorganismů ještě u syrového masa v

průběhu skladování. Nicméně toto není vždy možné, protože Rihaakuru se vyrábí z ryb s nízkou kvalitou masa a velmi často nejsou zajištěny vyhovující podmínky ke skladování [42].

Také homofermentativní druh *Lactobacillus plantarum* má schopnost degradovat biogenní aminy. Bylo prokázáno snížení putrescinu a histaminu působením právě tohoto druhu [43, 44, 45].

### 2.2.2 *Brevibacterium*

Nepřavidelné nesporulující a nepohyblivé grampozitivní tyčinky, které se využívají především k výrobě sýrů zrající pod mazem, jako je např. Romadur nebo Olomoucké tvarůžky. Z alfa-methioninu tvoří methanthiol, který vytváří typické aroma sýrů čedarového typu. Tyto bakterie mají inhibiční účinky proti plísním, které mohou růst na povrchu sýra a produkovat nebezpečné mykotoxiny. *Brevibacterium linens* má vysoký potenciál pro rozklad histaminu a tyraminu [10].

### 2.2.3 *Micrococcus*

*Micrococcus* je rod grampozitivních nesporulujících bakterií z kmene *Actinobacteria*, který se vyskytuje například v pivu, ale i v mléčných a jiných živočišných výrobcích. Ve studii zabývající se potenciálem mikroorganismů degradovat histamin a tyramin byla prokázána degradace alespoň jednoho z těchto dvou biogenních aminů u 17 ze 44 kmenů. *Kocuria (Micrococcus) varians* LTH 1540 vykazoval nejvyšší tyraminoxidázovou aktivitu ze všech testovaných kmenů, a proto byl dále zkoumán. Nejvyšší aktivita tyraminoxidázy byla naměřena při pH 7 a 37 až 40 ° C [77, 78].

### 2.2.4 *Staphylococcus*

*Staphylococcus* je klinicky nejvýznamnější bakteriální rod čeledi *Staphylococcaceae*. Tyto bakterie jsou nesporulující nepohyblivé grampozitivní fakultativně anaerobní koky. Vyskytují se na kůži a na sliznicích člověka a zvířat, kde jsou součástí přirozené mikroflóry. Nacházejí se také v potravinách, mnohdy jsou příčinou otrav při špatném uskladnění potravin. *Staphylococcus xylosus* je využíván k fermentaci masných výrobků. Má schopnost degradovat histamin a tyramin. Některé literární zdroje uvádějí, že tento kmen může omezit tvorbu biogenních aminů ve výrobcích masného průmyslu. Produkuje bakteriociny, které

působí proti mikroorganismům schopným produkovat biogenní aminy. Aktivita bakterie *Staphylococcus xylosus* vedla ke snížení histaminu a tyraminu v solených a fermentovaných ančovičkách [46, 47].

### 2.2.5 *Bacillus*

*Bacillus* je grampozitivní sporulující tyčinkovitá bakterie z čeledi *Bacillaceae*. Tyto bakterie jsou aerobní nebo fakultativně aerobní. Většina druhů bacilů je nepatogenních, výjimku tvoří *Bacillus anthracis* a *B. cereus*. Vysoký potenciál rozkládat tyramin a histamin prokázal *B. coagulans*. *B. subtilis* snižuje hladinu histaminu a kadaverinu ve fermentovaných sójových výrobcích. Další bacily se schopností degradovat biogenní aminy jsou *B. megaterium*, *B. licheniformis*, *B. cereus*, *B. polymyxa*, a jiné [48].

### 2.2.6 *Pseudomonas*

*Pseudomonas* je rod gramnegativních nesporelujících pohyblivých aerobní tyčinek ze skupiny *Gammaproteobacteria*. Druh *Pseudomonas aeruginosa* je schopen využívat putrescin, spermidin a spermin jako zdroj dusíku. Spermidindehydrogenáza oxiduje spermidin a spermin. Tyto bakterie jsou schopné růst za nízkých teplot a za nezvyklých podmínek prostředí. Jsou velmi často důvodem kažení potravin. *Pseudomonas fragi* způsobuje kažení mléčných produktů, ve vejci se mohou vyskytnout např. *Pseudomonas taetrolens* a *P. mucidolens*, zatímco *Pseudomonas lundensis* způsobuje kažení mléka, sýrů a masa [51, 52].

### 2.2.7 *Citrobacter*

*Citrobacter* je rod gramnegativních bakterií z čeledi *Enterobacteriaceae*, má schopnost redukovat množství dusičnanů. *Citrobacter freundii* oxiduje biogenní aminy, zejména spermidin a spermin [4].



### 3 PŘÍRODNÍ SÝRY HOLANDSKÉHO TYPU

Sýr je mléčný výrobek, který je vyrobený vysrážením mléčné bílkoviny z mléka působením syřidla nebo jiných vhodných koagulačních činidel, oddělením podílu syrovátky a následným prokysáním nebo zráním [52, 53].

Tvrdé a polotvrdé sýry se dělí na tři základní skupiny:

- sýry s nízkodohřívanou sýřeninou (sýry holandského typu, sýry s hnětenou sýřeninou, sýry s mletou sýřeninou typu čedar)
- sýry s vysokodohřívanou sýřeninou (sýry ementálského typu, sýry bez tvorby ok, sýry ke strouhání)
- sýry s kombinovanými charakteristikami

Sýry holandského typu tvoří hlavní skupinu polotvrdých sýrů. Vyrábějí se převážně z kravského mléka, jen malé procento těchto sýrů je vyráběno z mléka ovčího nebo kozího. Nejznámějším zástupci jsou sýr Gouda a Eidam. V mnoha zemích se vyrábí sýry s podobnou technologií ale s odlišnými názvy. Většina těchto sýrů obsahuje 40-52 % tuku v sušině a jsou vyráběny ve velikostech od 0,2 do 20 kg v nejrůznějších tvarech. Holandské sýry se nechávají zrát po dobu nejméně čtyř týdnů až více než rok [52, 53, 54].

#### 3.1 Technologie výroby

##### 3.1.1 Úprava mléka

Prvním a velmi důležitým krokem technologie výroby sýrů holandského typu je výběr mléka o potřebné chemické a mikrobiologické kvalitě. Mikrobiologická jakost syrového mléka ovlivňuje nejen technologické vlastnosti během výroby ale i trvanlivost konečného výrobku. Mléko určené pro výrobu sýrů nesmí mít porušenou kysací schopnost (schopnost přeměny laktózy na kyselinu mléčnou) a sýřitelnost (schopnost mléka srazit se po přidavku syřidla) [52, 56, 55].

##### 3.1.1.1 Standardizace

Nezbytným technologickým krokem je standardizace mléka pro dosažení požadovaného složení a opakovatelnosti kvality konečného výrobku. Procentuální obsah tuku v mléce je velmi variabilní a snadno ovlivnitelný řadou faktorů, mezi které patří plemenná příslušnost

a dědičnost, stáří dojnice, výživa, roční období a jiné. Standardizací se rozumí smísení přesně stanoveného množství smetany a odstředěného mléka pro získání předepsané tučnosti finálního výrobku. Standardizaci předchází odstředění mléka v bubnových odstředivkách, získá se mléko s minimálním obsahem tuku 0,03 – 0,05 % a smetana o obsahu tuku 35 – 45 %. Pro výrobu sýrů eidamského typu s obsahem 45 % tuku v sušině se používá průměrná tučnost mléka 2,7 – 3 %, pro tržní druhy s 30 % tuku v sušině se používá mléko o tučnosti 1,5 – 1,7 % [53, 54, 54, 66].

### **3.1.1.2 Pasterace**

V syrovém mléce, i přestože pochází ze zdravé dojnice, se můžou vyskytovat určité mikroorganismy. Jsou to zejména grampozitivní koky (streptokoky, stafylokoky, mikrokoky), bakterie mléčného kvašení, korynebakterie, pseudomonády anebo kvasinky. Zdrojem kontaminující mikroflóry mléka je povrch vemene, dojící zařízení, vzduch, člověk, atd. Použití tepelně neošetřeného mléka by mohlo vést k řadě technologických problémů nebo znehodnocení výrobku při zrání (duření sýrů, síťovitost, netypické děrování, hořká chuť sýrů, tvarohovitost sýrů) [26, 28].

Pasterací mléka dojde k omezení počtu nežádoucích mikroorganismů, zajištění zdravotní nezávadnosti a inaktivaci některých mléčných enzymů. Pro výrobu sýrů holandského typu se většinou používá šetrná pasterace při teplotě 72 °C po dobu 15 sekund nebo jiná rovnocenná kombinace času a teploty. To zajistí inaktivaci alkalické fosfatázy, ale laktoperoxidáza si svou aktivitu uchová [26, 28, 57, 66].

Vysoká pasterace není pro výrobu sýrů vhodná. Nastává při ní denaturace sérových bílkovin a tím se zpomaluje proces sýření a zhoršuje se synereze. Rozpustný vápník přechází na koloidní formu a dochází k zadržování nadměrného množství syrovátky v sýřenině. Zvyšuje se sice výtěžnost, ale sušina nemá požadovanou hodnotu a klesá kvalita sýra [55, 57].

Tepelné ošetření mléka nemusí být podmínkou, některé druhy sýrů se mohou vyrábět i z nepasterizovaného mléka, např. některé typy sýru Gouda. Pro výrobu sýrů ze syrového mléka se doporučuje minimální doba zrání 2 měsíce, více se takové sýry vyrábějí v zahraničí, například ve Francii [55, 57, 66].

### 3.1.1.3 Baktofugace

Baktofugací rozumíme mechanické odstraňování mikroorganismů a jejich spor pomocí využití odstředivých sil. Uplatnění nachází především při výrobě déle zrajících sýrů jako alternativa k aplikaci dusičnanů. V praxi se baktofugace spojuje s terminací nebo šetrnou pasterací [53, 57, 66].

### 3.1.1.4 Přídavné látky

Nejčastější přídavné látky při výrobě sýrů holandského typu jsou [52, 55, 66, 67]:

- Chlorid vápenatý, využívá se k obnovení sýřitelnosti mléka a zlepšení kvality sýřeniny. Při pasteraci dochází ke zhoršení sýřitelnosti v důsledku změn rozpustné a koloidní fáze minerálních látek. Díky chloridu vápenatému se také získá pevnější sýřenina a zabrání se tvorbě sýrového prachu a tím se zvyšuje výtěžnost při výrobě.
- Dusičnan draselný, chrání zrající sýry před duřením. Inhibuje nežádoucí mikroorganismy rozkládající laktózu za vzniku plynů. Cílem je především odstranit spory bakterie *Clostridium tyrobutyricum*, které přežívají pasteraci, produkují kyselinu máselnou a jsou příčinou pozdního duření sýrů. Alternativou může být přídavek enzymu lysozymu, ten však může působit inhibičně i na některé bakterie mléčného kvašení.
- Barviva, využívá se například  $\beta$ -karoten anebo annatto pro dosažení standardnosti barvy konečného výrobku.
- Koření.

### 3.1.2 Přídavek čistých mlékařských kultur

Po úpravě mléka a zchlazení na teplotu 32 °C se mléko inokuluje čistými mlékařskými kulturami, které zajišťují prokysání mléka, podílejí se na tvorbě chuti a vůně v průběhu zrání sýrů díky tvorbě acetoinu a diacetylu a mají vliv na konečnou texturu a konzistenci.

Pro zákysovou kulturu při výrobě sýrů holandského typu jsou především využívány mikroorganismy z rodu *Lactococcus* a *Leuconostoc*. *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* se vyznačuje dobrou virulencí a odolností vůči reakci prostředí, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* je pokládán za původce jemné chuti smetanové kultury. Z rodu *Leuconostoc* se využívá *L. mesenteroides* subsp. *cremoris* a *L. mesenteroides* subsp. *dextranicum*. Dále

mohou být používány mikroorganismy z rodu *Lactobacillus* (*L. casei* a *L. plantarum*) a *Streptococcus* (*S. hollandicus*). Kultura pro sýry holandského typu (také označována jako eidamská kultura) se složením podobá jogurtové kultuře. Některé kmeny také produkují potravinářsky významný bakteriocin nizin potlačující technologicky nežádoucí patogenní mikroorganismy [56, 58, 61, 65, 66].

U sýrů holandského typu se při dalším zpracování syrovátka zředí vodou, tím se snižuje kyselost a to umožňuje rozvoji plynatvorných a jiných mikroorganismů. Pro zabránění rozvoje těchto mikroorganismů se používají různé preventivní způsoby ochrany [65, 66].

### 3.1.3 Sýření

Při výrobě sýrů holandského typu se zpravidla využívá enzymatické (sladké) srážení kaseinových micel pomocí syřidla. Aktivní složkou syřidla je chymozin, proteolytický enzym, který se získává extrakcí a purifikací ze žaludku sajících telat. Z důvodu stále se rozšiřujícího sýrařského průmyslu a nedostatku chymozinu se začaly využívat i jiné zdroje chymozinu-podobných enzymů. Tyto chymozinu-podobné enzymy lze získat extrakcí z mikroorganismů (*Rhizomucor pusillus*, *R. miehei*), které tyto enzymy produkují přirozeně nebo z geneticky modifikovaných mikroorganismů (*Escherichia coli*, *Aspergillus niger*) [56, 62, 63, 64].

Syřidlové enzymy v první fázi sýření specificky štěpí  $\kappa$ -kaseinovou frakci mezi 105. a 106. aminokyselinou. Vznikne tak hydrofóbní para- $\kappa$ -kasein a hydrofilní  $\kappa$ -kaseinmakropeptid. Při rozštěpení 60 - 80 %  $\kappa$ -kaseinových frakcí začíná probíhat sekundární koagulační fáze za vzniku trojrozměrného gelu. Dochází k synerezi (smršťování) sýřeniny za současného uvolňování syrovátky. Důležitou podmínkou k tvorbě gelu je přítomnost vápenatých iontů, s jejichž rostoucí koncentrací se sladké srážení zrychluje. Při terciární fázi dochází k proteolytickému působení syřidla na kasein v průběhu zrání sýrů [63, 64, 66].

U sýrů holandského typu se volí dávka syřidla tak, aby sýření proběhlo do 40 minut [60].

### 3.1.4 Zpracování sýřeniny

Sýřenina je bílkovinný gel, v jehož kapilárách jsou uzavřeny tukové kuličky. Gel obsahuje i velké množství vody - syrovátky, kterou je nutné odstranit. Cílem zpracování je připravit sýřeninu o požadované velikosti částic, obsahu vody a texturních vlastnostech [55, 60, 63].

### **3.1.4.1 Krájení**

Krájení se provádí pomocí sýrařské harfy (kovový rám vyplněný svisle i podélně nerezovými strunami). Cílem krájení (harfování) je uvolnění syrovátky. Nežádoucím jevem je vznik sýrařského prachu (uvolnění velmi malých částic odcházejících do syrovátky) [60, 64, 66].

### **3.1.4.2 Míchání**

Rozkrájená sýřenina se šetrně míchá, dochází k dalšímu oddělení syrovátky, zmenšení zrn a zvýšení pevnosti pokožky a tuhosti zrna. Při zpracovávání sýřeniny odtéká volná voda a při synerezi i voda kapilární. Zrno se udržuje v pohybu, aby se zabránilo vzniku shluků, které by mohly být zárodkem pro tzv. syrovátkové hnízda – nepravidelné kaverny finálního výrobku. Pro podporu synereze a zpevnění stěn zrn se může zařadit na pár minut odpočinek, je ovšem nutné zabránit nadměrnému usazování zrn na dno [60, 64, 66, 69].

### **3.1.4.3 Dohřívání**

Sýry holandského typu patří do skupiny sýrů s nízkodohřívanou sýřeninou. Vlivem dohřívání se vyloučí další podíl kapilární vody ze sýřeniny a dochází k vytužení sýrového zrna. Cílem dohřívání je dosažení požadované sušiny konečného výrobku. U nízkodohřívaných sýrů se aplikuje prací voda o teplotě 50 - 60 °C za účelem zvýšení teploty zrna na dosoušecí teplotu 36 – 42 °C. Kromě přídavku vody lze dohřívát i pomalým nepřímým ohřevem mezipláště. Proces dohřívání trvá cca 60 minut, přičemž rychlejší dohřívání může vést k uzavření povrchových vrstev zrna a zadržení vyššího podílu vody uvnitř zrna [60, 62, 63].

Přídavku prací vody může předcházet odpuštění části syrovátky. Množství odpuštěné syrovátky a přídavek prací vody závisí na požadované tučnosti, konzistenci a kyselosti finálního výrobku. Obvykle se odpuští 35 % syrovátky a nahrazuje se 50 – 80 % jejího objemu prací vodou. Odpuštěním syrovátky se sníží koncentrace živin, zejména laktózy uzavřené v sýřenině, to reguluje mikrobiální činnost a pH klesne jen na 5,2 – 5,4. Synereze je dále podpořena mícháním sýřeniny v syrovátce po dosažení konečné teploty, tzv. dosoušením [60, 62, 63, 64, 66, 69].

### 3.1.5 Formování sýřeniny

Požadovaný tvar a velikost sýrů se získává formováním sýřeniny. Zrno se současně se syrovátkou (zrno nesmí oschnout) vypouští do speciálních perforovaných tvořítek. Vypouštění probíhá samospádem nebo čerpadly. Díky perforovanému plášti tvořítek dochází ke snadnějšímu odtoku syrovátky [60, 62, 63, 64].

### 3.1.6 Lisování

U sýrů holandského typu se neprovádí pouze samovolný odtok syrovátky, ale využívá se i mechanické síly při lisování, kdy se zrno stlačuje do forem. Zrno se spojuje a vytváří se hladký povrch sýru. Počáteční tlak se volí nižší a postupně se zvyšuje. Vysoký počáteční tlak by způsobil tvorbu tlusté kůrky povrchové vrstvy sýru a zabránil by odtoku syrovátky z vnitřní části. Doba lisování sýrů eidamského typu je 60 minut za využití lisovacího tlaku 50 – 400 KPa [60, 62, 63, 64].

Při formování a lisování sýrů je důležitá okolní teplota a tedy i teplota sýru z důvodu probíhajícího prokysávání. Při formování a lisování dochází k hlavnímu rozkladu laktózy bakteriemi mléčného kvašení a ke vzniku kyseliny mléčné. Pokud není prokysání do konce lisování ukončeno, ukládají se sýry na 20 až 24 hodin do vytemperované místnosti k dokysání [60, 63, 63, 64].

### 3.1.7 Solení

Solení sýrů je technologická operace, která ovlivňuje chuť a konzistenci sýru a také umožňuje další odchod syrovátky, zpevňuje povrch sýru a ovlivňuje průběh zrání. Zpomalí se metabolické procesy, včetně mléčného kvašení a dojde k potlačení činnosti nežádoucích mikroorganismů [63, 64].

Sýry holandského typu mají obsah soli 1,5 – 3 %, patří tedy do skupiny se středním obsahem soli. Nejčastějším způsobem solení je solení v solné lázni. Uplatňují se zde osmoticko - difúzní procesy, do sýru přes drobné kanálky pronikají rozpuštěné látky, zejména NaCl, do solné lázně přechází část syrovátky se zbytky laktózy, kyseliny mléčné a dalších látek. Solná lázeň má přesně definované parametry (teplotu, kyselost a koncentraci NaCl) podle druhu sýru. Pro výrobu sýrů holandského typu se využívá solná lázeň o teplotě 14 – 16 °C, pH 5,2 a koncentraci NaCl 18 - 20 %. Tyto parametry se musí udržovat v požadovaném rozmezí, doplňuje se NaCl, solná lázeň se chladí a měří se kyselost. Doba solení v solné

lázni závisí na velikosti, tvaru sýra a také na požadovaném obsahu soli ve finálním výrobku [63, 64, 67].

Při solení v solné lázni postupuje sůl od povrchu do středu sýra. Na povrchu se vytváří solný prstenec, pásmo s nejvyšším obsahem soli. Pod solným prstencem se vyskytují další pásma se snižující se koncentrací NaCl směrem ke středu sýru. Po několikadenním zrání dochází k vyrovnání obsahu soli v celém výrobku [63, 64, 67].

Solná lázeň je možným vektorem kontaminace halotolerantních mikroorganismů, tzv. mikroorganismů schopných snášet prostředí s vysokou koncentrací soli. Běžně se provádí pravidelná obměna solných lázní [63, 64, 67].

Po vysolení se sýry nechávají obvykle několik hodin oschnout a uloží se do zracích polic nebo beden balené ve zracím obalu případně bez obalu. Jako zrací obaly se běžně využívají kryovakové obaly, plastové nátěry nebo vosk [60].

### **3.1.8 Zrání**

Čerstvě vyrobená sraženina je neurčité chuti a má gumovitou texturu. Charakteristické aroma a textura se vyvíjí až v průběhu zrání. Zrání sýrů je soubor biochemických reakcí způsobených mikrobiálními enzymy a enzymy syřidla. Přírodní sýr není vhodným prostředím pro mikroorganismy z důvodu nízkého pH, vysoké koncentrace soli a absence významného množství zkvasitelných sacharidů. V průběhu několika týdnů dochází k poklesu počtu buněk kyselové kultury, po buněčné smrti nastává lyze buněk a uvolněné enzymy přispívají ke zrání sýrů [64, 70, 72, 74, 76].

#### **3.1.8.1 První fáze zrání**

V první fázi zrání dochází k rozkladu zbytkové laktózy bakteriemi mléčného kvašení a ke vzniku kyseliny mléčné, která uvolňuje z kaseinu vápník za vzniku mléčnanu vápenatého. Dochází k výraznému ovlivnění slepování sýřeniny a vzniku homogenní hmoty. Žádoucí je, aby ve zralých sýrech bylo co nejmenší množství laktózy, přispívá to k zamezení vývoje nežádoucí sekundární mikroflóry. Kyselina mléčná je prekurzorem pro další reakce probíhající během zrání [72, 74].

Mléčnan může být metabolizován na kyselinu máselnou, CO<sub>2</sub> a vodík prostřednictvím bakterie *Clostridium tyrobutyricum*, to způsobuje vadu sýrů zvanou pozdní duření. Tato vada se vyskytuje zejména u sýrů solených v solných lázních [72].

Citronan-pozitivní kmeny *Lactococcus lactis* anebo *Leuconostoc* spp. metabolizují malé množství citronanu zachyceného v sýřenině za vzniku sensoricky aktivních látek (diacetyl, acetoin, 2,3-butandiol) [72, 74, 76].

### **3.1.8.2 Druhá fáze zrání**

Ve druhé fázi zrání dochází k mikrobiálnímu rozkladu kyseliny mléčné za vzniku jiných kyselin (propionová, octová), oxidu uhličitého a vody. V této fázi se snižuje kyselost sýra. V důsledku zvyšující se koncentrace oxidu uhličitého dochází k tvorbě ok [72, 73, 76].

### **3.1.8.3 Proteolýza**

Proteolýza je nejvýznamnější biochemický děj probíhající při zrání sýrů. Je katalyzována proteinázami pocházejícími ze syřidla (chymozin), mléka (zejména plazmin), zákysové kultury a nezákysových bakterií mléčného kvašení [72, 73].

V průběhu proteolýzy dochází k rozkladu kaseinových bílkovin na peptidy, ty jsou následně hydrolyzovány skupinou peptidáz za vzniku značného množství volných aminokyselin. Proteolýza může probíhat anearobně v celé hmotě sýra nebo aerobně od povrchu dovnitř [72, 74 76].

### **3.1.8.4 Lipolýza**

Při lipolýze dochází k enzymatické hydrolýze triacylglycerolů na mastné kyseliny a glycerol. Při této reakci dochází k uvolňování aroma v sýru. Při zrání sýrů holandského typu bývá lipolýza velmi nízká. Oxidace lipidů je limitována z důvodu nízkého oxidačně-redukčního potenciálu a nízkého obsahu polynenasycených mastných kyselin v mléčném tuku. Zdroje lipolytických enzymů jsou velmi podobné zdrojům proteolytických enzymů [71, 75].

### **3.1.8.5 Reakce volných aminokyselin**

Produkty proteolýzy, peptidy a aminokyselin, dávají sýru typickou chuť a vůni. Hlavním důvodem je to, že aminokyseliny fungují jako prekurzory pro další katabolické reakce. Reakcí volných aminokyselin vznikají sensoricky aktivní látky (aldehydy, ketony, estery, amoniak, kyseliny, atd.). Kromě těchto látek vznikají z aminokyselin i biogenní aminy [72, 74, 76].



## **II. PRAKTICKÁ ČÁST**

## 4 METODIKA

### 4.1 Výroba modelových vzorků sýra

V technologických laboratořích Ústavu technologie potravin Fakulty technologické byly vyrobeny 4 modelové vzorky sýru holandského typu s nízkodohřívanou sýřeninou s obsahem tuku v sušině 45 %.

- Pro výrobu A: byl použit biogenní aminy produkující kmen (*Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 946)
- Pro výrobu B: byl použit BA produkující kmen (*L. lactis* subsp. *cremoris* CCDM 946) + degradující kmen (*Micrococcus luteus* BD29)
- Pro výrobu C: byl použit BA produkující kmen (*L. lactis* subsp. *cremoris* CCDM 946) + degradující kmen (*Pseudomonas fulva* BD13)
- Pro výrobu K: byl použit jen smetanový provozní zákys (kontrolní výroba)

#### 4.1.1 Materiál a pomůcky

- syrové mléko
- smetanová kultura Laktoflora<sup>®</sup>
- chlorid vápenatý 36 % (Milcom a. s., Česká republika)
- syřidlo Chymax M (Chr. Hansen, Dánsko)
- bezjodá sůl
- antimykotický přípravek Delvacid (O.K. Servis BioPro s. r. o., Česká republika)
- kyselina peroctová Divosan Activ (Diversey, Česká republika)
- laboratorní odstředivka FT15 (Armfield Inc., Velká Británie)
- výrobce sýrů (Driml, Česká republika)
- analytické váhy (A&D GH-200 EC, Česká republika)
- vakuová balička Mini Jumbo (Henkelman, Nizozemsko)
- zrací komora (Candy, Itálie)

- germicidní UV lampa NBVE 110/55 (Ultra Viol, Polsko)
- vyvíječ vodní páry
- termostat Microbiological IL53
- plastové zkumavky, automatická pipeta, kádinky, odměrné válce.

#### **4.1.1.1 Příprava prostor**

Standardizační nádoby a vnitřní prostory výrobniku byly ošetřeny parou pomocí vyvíječe vodní páry pro odstranění případné kontaminace. Prostory technologické laboratoře byly vysvíceny germicidní lampou po dobu 4 hodin. Všechny pomůcky, které se dostaly do přímého styku se surovinou, meziproduktem nebo konečným produktem, byly dezinfikovány ponorem do zředěného roztoku persterilu a následně dostatečně opláchnuty pitnou vodou pro zabránění přenosu reziduí dezinfekčních látek.

#### **4.1.1.2 Příprava provozního zákysu**

Pro výrobu sýrů z 35 l mléka bylo použito 160 ml smetanového provozního zákysu smetanové kultury Laktoflora<sup>®</sup>. Zákys byl připraven z vysoce pasterovaného mléka v 50ml plastových zkumavkách. Zkumavky s mlékem byly na 30 minut ponořeny ze 2/3 výšky sloupce pasterovaného mléka do vodní lázně a zahřívány. Poté se mléko ve zkumavkách nechalo vychladnout na teplotu  $30 \pm 2$  °C, mléko bylo inokulováno smetanovou kulturou o množství 0,15 g/40 ml mléka a důkladně promícháno pro rozptýlení kultury. Zákys byl kultivován v termostatu při  $28 \pm 1$  °C po dobu 16-20 hodin. Zákys s vybraným kmenem BA produkujícího kmene a BA degradujícího kmene byl připraven inokulací 5 ml živného média s kmenem narostlým přes noc do 40 ml mléka. Kultivace byla provedena stejným způsobem jako u smetanového zákysu.

#### **4.1.1.3 Úprava mléka**

Syrové mléko bylo předeřháto ve výrobniku na teplotu 37 °C. Předeřháté mléko bylo vedeno do zásobní nádrže odstředivky, která byla předem nastavena na šestý rychlostní stupeň. Účinkem odstředivky došlo k separaci mléčného tuku a mléčné plazmy. Obě frakce produktů byly sbírány odtokovými kanály do připravených nádob.

Mléko bylo standardizováno smícháním odstředěného mléka a smetany dle vypočteného poměru. Pro dosažení 45 % tuku v sušině bylo mléko standardizováno na obsah tuku 3,2 %.

Pasterace mléka byla provedena diskontinuálním způsobem ve výrobníku při teplotě 72 °C po dobu 30 vteřin. Mléko bylo následně ochlazeno na inokulační a sýřicí teplotu 32±1 °C.

Do mléka bylo přidáno 17,5 ml nasyceného roztoku CaCl<sub>2</sub> pro podporu sýření. Mléko bylo následně inokulováno připraveným provozním zákysem (160 ml) a dokonale promícháno. Kultura byla ponechána 20 minut reaktivovat za současného míchání.

#### ***4.1.1.4 Sýření mléka***

Za stálého míchání bylo k mléku přidáno 1 120 µl syřidla ředěného v desetinasobku pitné vody. Sýřicí teplota byla udržována při 32±1 °C. Směs byla krátce promíchána a ponechána 30 minut v klidu.

#### ***4.1.1.5 Zpracování sýřeniny***

Po 30 minutách sýření byla sýřenina prokrojena podélně i příčně pomocí sýrařské harfy. Prokrájená sýřenina byla ponechána 10 minut v klidu pro uvolnění syrovátky. Následně bylo provedeno drobení sýřeniny po dobu 5 minut za pomoci sýrařské harfy s vertikálními strunami a sýřenina byla ručně míchána po dobu 30 minut k vytužení sýrařských zrn. Za stálého míchání bylo přes síto odebráno část syrovátky o objemu 10,5 l a k sýrařskému zrnu byla pomalu přidána voda o objemu 7 l a teplotě 60 °C. Teplota systému vzrostla na 37 °C. Dosoušení bylo provedeno za stálého ručního míchání po dobu 30 minut.

#### ***4.1.1.6 Formování a lisování***

Sýřenina byla slita do vany a předlisována pomocí 2 kostek 20 minut. Předlisovaná sýřenina byla přemístěna do 12 lisovacích forem vyložených plachetkou a lisována podle následujícího schématu.

Tabulka 4. Schéma prvního lisování

1. lisování		
doba lisování	zátěž na páce	poznámka
15 minut	0,5 kg	2 formy
30 minut	3 kg	3 formy
30 minut	4,5 kg	

Otočení sýrů.

Tabulka 5. Schéma druhého lisování

2. lisování	
doba lisování	zátěž na páce
30 minut	1,5 kg
30 minut	4,5 kg

Po lisování byly sýry uloženy v nádobách a ponechány do druhého dne prokysat.

#### **4.1.1.7 Solení sýrů a balení**

Byly připraveny 4 solné lázně rozpuštěním 1,075 kg bezjodé soli v 4,3 l vody. Do každé solné lázně byly vloženy vždy tři bloky sýra a ponechány solení po dobu 3 hodin.

Vylisované a nasolené sýry byly ošetřeny antimykotickou suspenzí Delvocid XT1.

Sýry byly baleny do smrštitelné fólie. Sýry ve fólii byly vloženy do vakuové baličky, víko bylo uzavřeno, byl odsát vzduch a vytvořen svar ve fólii. Zabalené sýry byly vloženy na 2 sekundy do horké vody k smrštění fólie.

Sýry byly uloženy ve zrací komoře.

## **4.2 Základní chemická analýza**

### **4.2.1 Stanovení obsahu sušiny**

Do předem vysušených misek s křemičitým pískem byly naváženy 3 g vzorku sýru. Každý vzorek byl s pískem co nejvíce promíchán. Vzorky byly sušeny v sušárně (Venticell, Br-

něnská Medicinská Technika a. s., ČR) při teplotě  $105 \pm 1$  °C po dobu 5 hodin a poté zvaženy. Výsledný obsah sušiny byl vypočítán podle následujícího vzorce:

$$\text{obsah sušiny [hm. \%]} = (m_3 - m_1) / m_2 \cdot 100$$

$m_1$  – hmotnost misky s pískem [g]

$m_2$  – hmotnost vzorku před sušením [g]

$m_3$  – hmotnost misky s pískem a vzorkem po vysušení [g]

#### 4.2.2 Stanovení obsahu tuku

Bylo naváženo 3,00 g vzorku sýru na lodičku zasazenou do butyrometru. Lodička byla vsunuta do hrdla tukoměru. Horním otvorem butyrometru bylo nalito 14 ml kyseliny sírové. Následně byl butyrometr vložen do vodní lázně o teplotě 65 °C a opatrně promícháván. Po rozpuštění vzorku sýru byl přidán 1 ml amylalkoholu a zředěná kyselina sírová do 2/3 stupnice butyrometru. Směs byla v butyrometru promíchána, vytemperována na teplotu 65 °C a následně odstředěna. Poté se na stupnici butyrometru přímo odečetly hmotnostní procenta tuku. Tuk v sušině byl vypočítán pomocí vzorce:

$$x = (100 \cdot t) / s$$

s – sušina [%]

t – tučnost [%]

x – tuk v sušině [%]

#### 4.2.3 Stanovení pH

Pro stanovení hodnoty pH byl použit vpichový pH metr (EUTECH INSTRUMENTS The Netherlands). Výsledná hodnota pH byla stanovena jako průměrná hodnota z deseti měření.

#### 4.2.4 Stanovení obsahu soli

Bylo provedeno potenciometrické stanovení obsahu soli. Nejprve byla provedena standardizace roztoku dusičnanu stříbrného. Byl navážen 1 g vzorku s přesností na 4 desetinná místa, pro každý vzorek byla připravena vždy tři opakování. Vzorek byl rozmělněn v třecí misce s 10 ml destilované vody o teplotě 60 °C a převeden do kádinky. Ke vzorku bylo přidáno

2 ml  $\text{HNO}_3$  a následně byl vzorek doplněn destilovanou vodou na objem 120 – 130 ml. Kádinka byla titrována roztokem dusičnanu stříbrného o koncentraci  $c = 0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ . Byly

zaznamenávají hodnoty napětí vždy po 0,5 ml přidavku dusičnanu stříbrného. Objem byl vypočten z druhé derivace.

### 4.3 Texturní profilová analýza

Pro účely stanovení tvrdosti jednotlivých vzorků sýra byla stanovena texturní profilová analýza pomocí přístroje TA.XT Plus (Stable Micro Systems Ltd., Godalming, Velká Británie) a sondy o průměru 100 mm. Nejprve byl ze středu každého vzorku vykrojen válec o průměru 35 mm a výšce 20 mm. Následně byl proveden kompresní test ve dvou cyklech se stlačením vzorku o 25 % jeho původní výšky rychlostí 2 mm/s. Tvrdost, jako maximální síla v N dosažená během prvního stlačení, byla vyhodnocena ze zátěžové křivky.

### 4.4 Mikrobiologický rozbor

Pomocí mikrobiologického rozboru byly stanoveny tyto skupiny mikroorganismů: mléčné koky, bakterie rodu *Lactobacillus*, enterokoky, enterobakterie, kvasinky, plísně a celkový počet mikroorganismů.

Sterilně bylo odváženo 5g vzorku, ke kterému bylo přidáno 45 ml fyziologického roztoku, směs byla homogenizována po dobu 3 minut. Poté byla připravena řada desetinného ředění a důkladně promíchána na vortexu. 100  $\mu$ l vzorku bylo pipetováno na povrch kultivačních pūd metodou rozřeru. Obdobným způsobem byl proveden i mikrobiologický rozbor syrového a pasterovaného mléka.

K detekci mléčných skoků byla použita diagnostická živná pūda M17 agar, kultivace proběhla aerobně při 37 °C po dobu 48 hodin, ke stanovení počtu bakterií rodu *Lactobacillus* byla použita pūda M.R.S. agar (DeMan-Rogosa-Sharpe agar), kultivace proběhla anaerobně při 37 °C po dobu 48 hodin. Celkový počet mikroorganismů byl stanoven na neselektivní živné pūdě PCA (Plate Count Agar) aerobně při 30 °C po dobu 48 hodin, enterokoky byly stanoveny na selektivní pūdě Slanetz Bartley agar aerobně při 37 °C po dobu 48 hodin. Stanovení enterobakterií bylo provedeno na selektivně diagnostické Endově pūdě při 30 °C po dobu 48 hodin za aerobních podmínek, kvasinky a plísně byly stanoveny na pūdě

CHYGA (Chloramphenicol Yeast Glucose Agar) při 25 °C po dobu 72 hodin za aerobních podmínek.

Počet mikroorganismů byl vypočten podle vzorce:  $N = \Sigma C / (V(n_1+0,1n_2)d)$ .

$\Sigma C$  – součet kolonií ze všech ploten vybraných pro výpočet

V – objem inokula v ml

$n_1$  – počet ploten vybraných k výpočtu z prvního zvoleného ředění

$n_2$  – počet ploten vybraných k výpočtu z druhého zvoleného ředění

d – faktor ředění odpovídající prvnímu pro výpočet zvolenému ředění

Výsledný počet mikroorganismů byl uveden jako log CFU/g.

#### 4.5 Stanovení obsahu volných aminokyselin

Nejprve byl každý vzorek nastrohán a lyofilizován (lyofilizátor ALPHA 1-4 LSC, CHRIST, LABICOM s. r. o., ČR). K 1 g lyofilizátu bylo přidáno 10 ml lithno-citrátového pufru, vzorek byl promíchán na vortexu a 30 minut se nechal třepat na třepačce (LT2). Poté byl vzorek odstředěn při 6000 ot./min po dobu 10 min (odstředivka EBA 21, Hettich ZENTRIFUGEN, Germany, Tuttlingen). Ke vzniklému supernatantu bylo přilito 7 ml lithno-citrátového pufru a celý postup byl ještě 2x opakován za dalších přísadků lithno-citrátového pufru. Získaný extrakt byl napipetován do ependorfkových zkumavek, odstředěn a pomocí stříkačkového filtru o porozitě 0,45  $\mu\text{m}$  přefiltrován.

Postup deprivatizace byl následující: 5  $\mu\text{l}$  vzorku + 35  $\mu\text{l}$  borátového pufru (0,2M, pH 7,3) + AQC (1mg/1ml ACN) vzorek byl zahřát na 55°C, poté byl vzorek zchlazen a bylo přidáno 170  $\mu\text{l}$  kyseliny mravenčí (20mM).

Následně proběhla analýza na HPLC (chromatograf Agilent Technologies, Santa Clara, USA. Analytická kolona s předkolonou XBridge® BEH Plus C18 (3 x 10 mm, 2,5  $\mu\text{m}$ ), Waters, Irsko).

Dávkovaný objem na kolonu byl 5  $\mu\text{l}$ , teplota autosampleru 5 °C, teplota analytické kolony 37 °C, vlnová délka 254 nm, ostatní parametry byly ponechány jako defaultně nastavené výrobcem.



## 4.6 Stanovení obsahu biogenních aminů

### 4.6.1 Derivatizace

Ke každému vzorku po extrakci kyselinou chloristou bylo přidáno 100  $\mu\text{l}$  1,7-heptandiaminu (Sigma-Aldrich) v koncentraci 500 mg/l jako interního standardu. Následně byl 1 ml vzorku odpipetován do derivatizační nádoby a přidáno 1,5 ml karbonátového pufru s pH 11,1 – 11,2. Ke vzorku bylo přidáno 2 ml čerstvě připraveného roztoku danzylchloridu (Sigma-Aldrich) o koncentraci 5 g/l v acetonu (Merck). Derivatizační nádoba byla dobře uzavřena a nechala se třepat v temnu 20 hodin.

Po uplynutí stanovené doby třepání bylo ke vzorku přidáno 200  $\mu\text{l}$  prolinu (Sigma-Aldrich), derivatizační nádoba byla dobře uzavřena a byla třepána další hodinu. Poté bylo ke vzorku přidáno 3 ml heptanu a 3 minuty se vzorek ručně třepal. Následně bylo odpipetováno 1 ml heptanové vrstvy do vialky. Obsah vialky byl odpařen při teplotě 65 °C do sucha pod proudem dusíku a suchý odparek byl zředěn 1,5 ml acetonitrilu (Sigma-Aldrich). Vialky byly uchovávány v mrazícím zařízení při teplotách -18 °C do doby analýzy.

### 4.6.2 Vlastní chromatografické stanovení

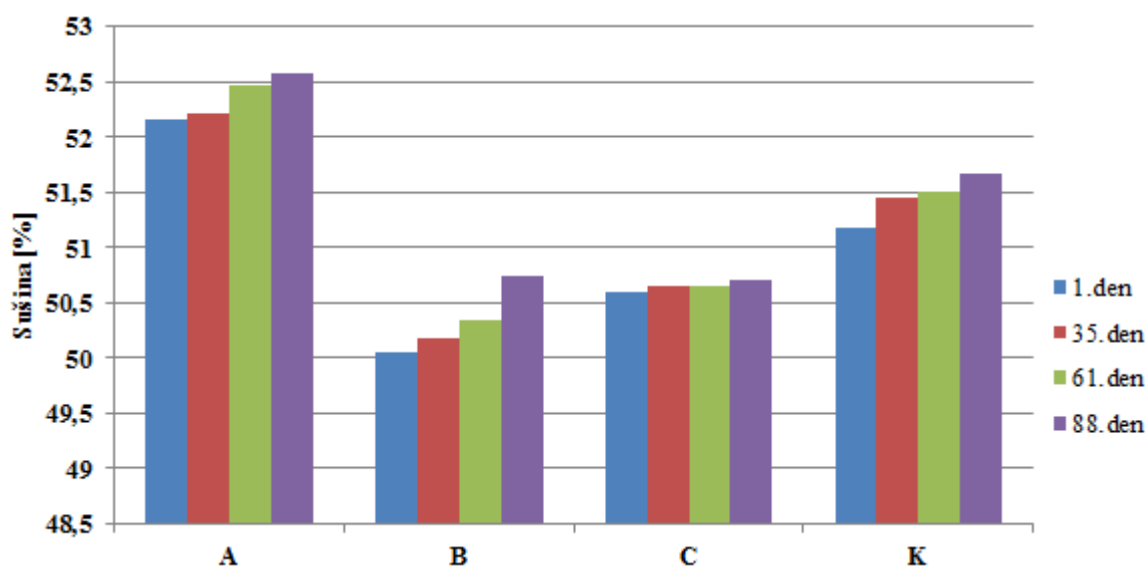
Bezprostředně před analýzou byly vzorky přefiltrovány přes stříkačkový filtr s porozitou 0,22  $\mu\text{m}$  a dávkovány do chromatografického systému. Výskyt biogenních aminů byl vyhodnocen pomocí mobilní a stacionární fáze na koloně Zorbax C18 RRHD s rozměry 3 x 50 mm a pórovitostí 1,8  $\mu\text{m}$ . Průtok kolonou byl 0,45 ml/min. Stanovení bylo prováděno při teplotě 30 °C a vlnové délce 254 nm (UV/VIS-DAD detektorem). Výsledky obsahu biogenních aminů byly hodnoceny pomocí softwaru CLARITY.

## 5 VÝSLEDKY A DISKUZE

### 5.1 Základní chemická analýza

#### 5.1.1 Stanovení obsahu sušiny

V modelových vzorcích sýrů byl v průběhu zrání stanovován obsah sušiny, výsledky jsou uvedeny na obrázku 2.



Obrázek 2. Stanovení obsahu sušiny u modelových vzorků sýrů v průběhu zrání

Z obrázku 2 je patrné, že obsah sušiny se v průběhu zrání sýrů nepatrně zvyšoval u každého vzorku. U modelového vzorku A (pro výrobu byl použit biogenní aminy produkující kmen *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 946) byl obsah sušiny 1. den zrání 52,15 %, 35. den zrání 52,22 %, to je o 0,07 % více než 1. den, 61. den byla naměřena sušina 52,47 % (o 0,25 % vyšší než 35. den) a 88. den byla sušina 52,58 % (vyšší o 0,11 % oproti 61. dnu). U modelového vzorku B (pro výrobu byl použit BA produkující kmen *L. lactis* subsp. *cremoris* CCDM 946 + degradující kmen *Micrococcus luteus* BD29) byl obsah sušiny první den zrání 50,06 %, 35. den se zvýšil obsah o 0,12 % na 50,18 %, 61. den se zvýšil o 0,16 % na 50,34 % a 88. den se zvýšil o 0,41 % na 50,75 %. U modelového vzorku C (pro výrobu byl použit BA produkující kmen *L. lactis* subsp. *cremoris* CCDM 946 + degradující kmen *Pseudomonas fulva* BD13) byly zaznamenány nejmenší rozdíly v obsahu sušiny v průběhu zrání. První den zrání byl naměřen obsah sušiny 50,60 %, 35.

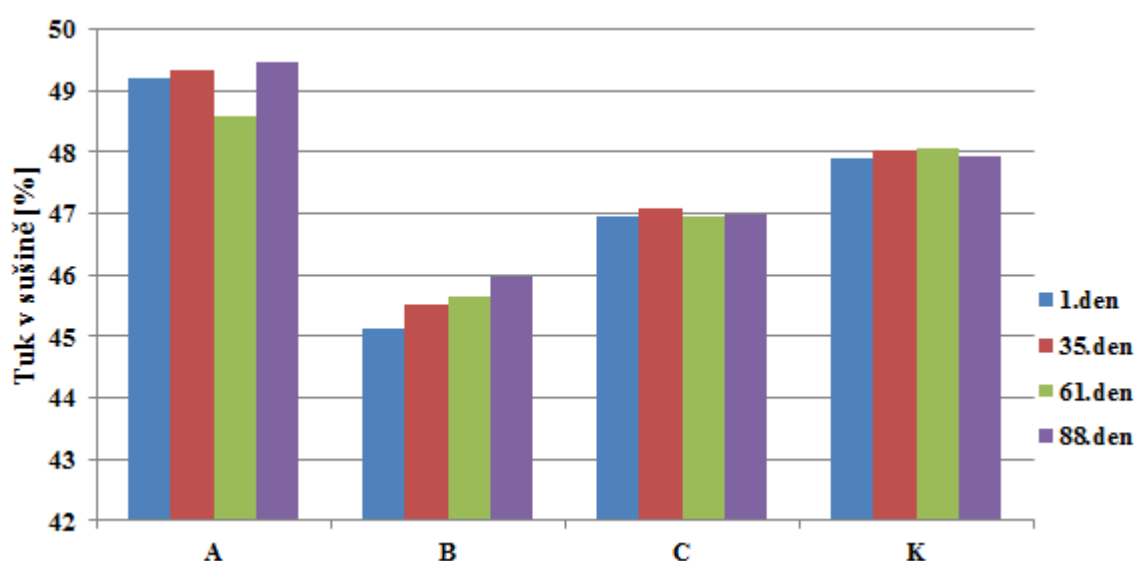
den 50,65 % (o 0,05 % více), 61. den 50,66 % (pouze o 0,01 % více než 35. den) a 88. den 50,70 % (o 0,04 % více než 61. den). U kontrolního vzorku K (pro výrobu použit pouze smetanový provozní zákys) byl naměřen obsah sušiny 1. den zrání 51,18 %, 35. den 51,45 % (o 0,27 % více), 61. den 51,50 % (o 0,05 % více než 35. den) a 88. den 51,67 % (o 0,17 % více než 61. den). Při porovnání jednotlivých vzorků mezi sebou měl nejvyšší obsah sušiny vzorek A (v prvním dnu zrání byl obsah sušiny o 2,09 % vyšší než u vzorku B, o 1,55 % vyšší než u vzorku C a o 0,97 % vyšší než u kontrolního vzorku K). Ke zvyšování sušiny docházelo díky částečnému vysychání v průběhu zrání sýrů. Sýry nebyly baleny v nepropustném obalu, proto docházelo k odpařování vody ze sýru.

88. den byl zaznamenán pokles vody u vzorku A o 0,82 %, u vzorku B o 1,38 %, u vzorku C o 0,20 % a u vzorku K o 0,96 % oproti dnu prvnímu.

Fox et al. při analýze sýru Gouda v průběhu zrání zjistili, že odpařováním vody poklesl obsah vody v sýru během prvních 10 dnů o 1,5%. Rychlost odpařování se postupně zpomalovala. Za rok došlo ke snížení vody v sýru o 10 % [78]. V námi prováděném experimentu, byl maximální pokles obsahu vody o 1,38 % za 3 měsíce zrání.

### 5.1.2 Stanovení obsahu tuku v sušině

V modelových vzorcích sýrů byl v průběhu zrání stanovován obsah tuku v sušině, výsledky jsou uvedeny na obrázku 3.

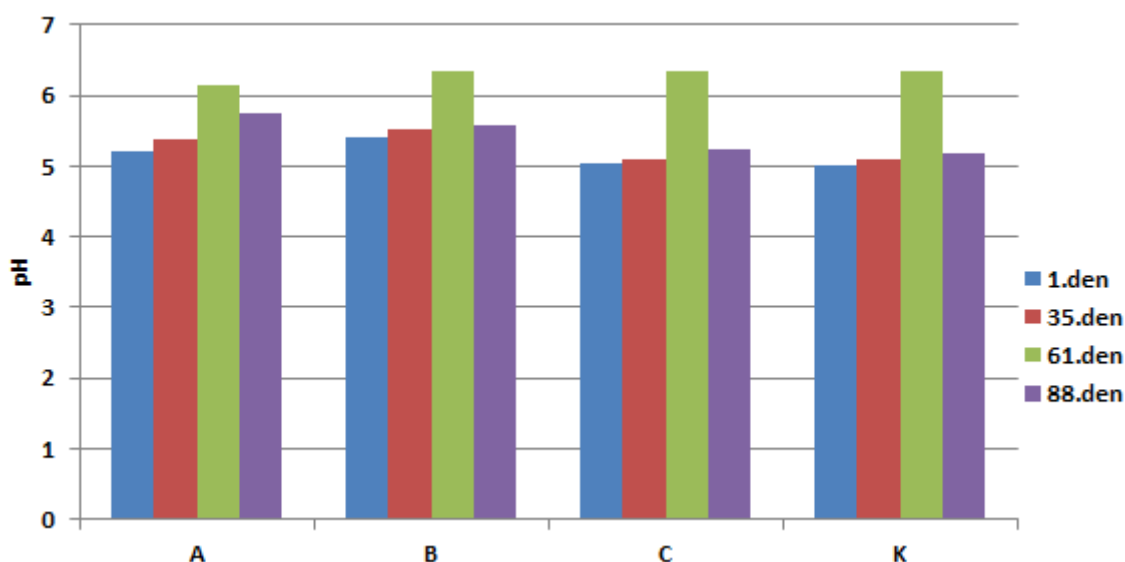


Obrázek 3. Stanovení obsahu tuku v sušině u modelových vzorků sýrů v průběhu zrání

Z obrázku 3 je patrné, že nejvyšší průměrný obsah tuku v sušině byl naměřen u vzorku A (vzorek, u kterého byl naměřen i nejvyšší obsah sušiny). Vzorky B a C (pro výrobu byly kromě BA produkující kmene použity i BA degradující kmene) měly podstatně nižší průměrný obsah tuku v sušině než vzorky A a K (taktéž tomu bylo s obsahem sušiny). Obsah tuku v sušině se ne vždy v průběhu zrání zvyšoval, jako tomu bylo u obsahu sušiny. U vzorku A byl tuk v sušině v prvním dnu zrání 49,22 %, 35. den 49,35 % (o 0,13 % vyšší), ale 61. den 48,60 % (o 0,75 % nižší než 35. den), 88. den bylo naměřeno 49,46 % tuku v sušině (o 0,86 % více než 35. den). U vzorku B byl tuk v sušině v prvním dnu zrání 45,13 %, 35. den 45,51 % (o 0,38 % vyšší), 61. den 45,66 % (o 0,15 % vyšší než 35. den), 88. den bylo naměřeno 45,97 % (o 0,31 % více než 35. den). Velmi malé rozdíly v obsahu tuku v sušině byly pozorovány u vzorku C i K. Průměrný obsah tuku v sušině v průběhu zrání u vzorku C byl  $47,00 \% \pm 0,06 \%$  a u vzorku K  $47,98 \% \pm 0,07 \%$ .

### 5.1.3 Stanovení pH

V modelových vzorcích sýrů bylo v průběhu zrání měřeno pH, výsledky jsou uvedeny na obrázku 4.



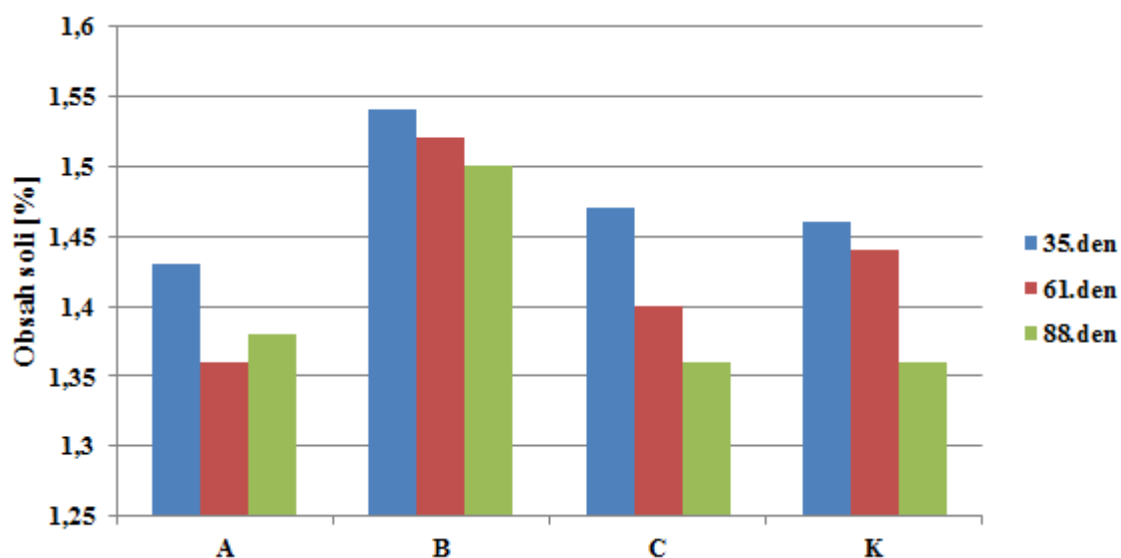
Obrázek 4. Stanovení pH u modelových vzorků sýrů v průběhu zrání

Z obrázku 4 je patrné, že nejnižší hodnota pH byla naměřena v prvním dnu zrání sýrů (vzorek A pH = 5,20, vzorek B pH = 5,41, vzorek C pH = 5,03 a vzorek K pH= 5,02). Důvodem je fermentace laktózy a tvorba kyseliny mléčné startérovými bakteriemi mléčného

kvašení [72]. 35. den zrání byl zaznamenán mírný nárůst hodnot pH taktéž u každého vzorku. Průměrný nárůst byl o  $2,07 \pm 0,94$  %. Nejvyšší pH bylo naměřeno 61. den zrání u všech vzorků. U vzorku A bylo naměřeno pH 6,15 (o 14,10 % vyšší pH než 35. den), u vzorku B bylo naměřeno pH 6,35 (o 15,25 % vyšší pH než 35. den), u vzorku C bylo naměřeno pH taktéž 6,35 (o 24,75 % vyšší pH než 35. den) a u vzorku K bylo naměřeno pH 6,33 % (o 24,12 % vyšší pH než 35. den). Zvyšování pH v těchto dnech zrání sýrů je přisuzováno fermentací citrátu, ztrátě  $\text{CO}_2$  a proteolýze, při které dochází k tvorbě látek zásadité povahy [79]. 88. den zrání byl zaznamenán pokles pH u všech vzorků, pravděpodobně z důvodu lipolýzy. Bakterie mléčného kvašení obvykle nedisponují příliš aktivními lipázami a esterázami, ale za podmínek delšího zrání mohou lipázy bakterií mléčného kvašení vykazovat větší aktivitu a jsou hlavními původci lipolýzy u sýrů [79]. Snížení pH analyzované v 88. dnu zrání pravděpodobně souvisí se zvýšeným počtem bakterií rodu *Lactobacillus* zjištěným taktéž v 88. dnu zrání. Tyto mikroorganizmy mohou intracelulárními lipázami způsobovat slabou lipolýzu. Při lipolýze dochází k uvolnění volných mastných kyselin a tedy ke snížení pH [79]. U vzorku A bylo pH v 88. dnu zrání nižší o 6,50 % oproti 61. dnu, u B o 11,97 %, u C o 17,64 % a u K o 18,01 %.

#### 5.1.4 Stanovení obsahu soli

V modelových vzorcích sýrů byl v průběhu zrání stanovován obsah soli, výsledky jsou uvedeny na obrázku 5.

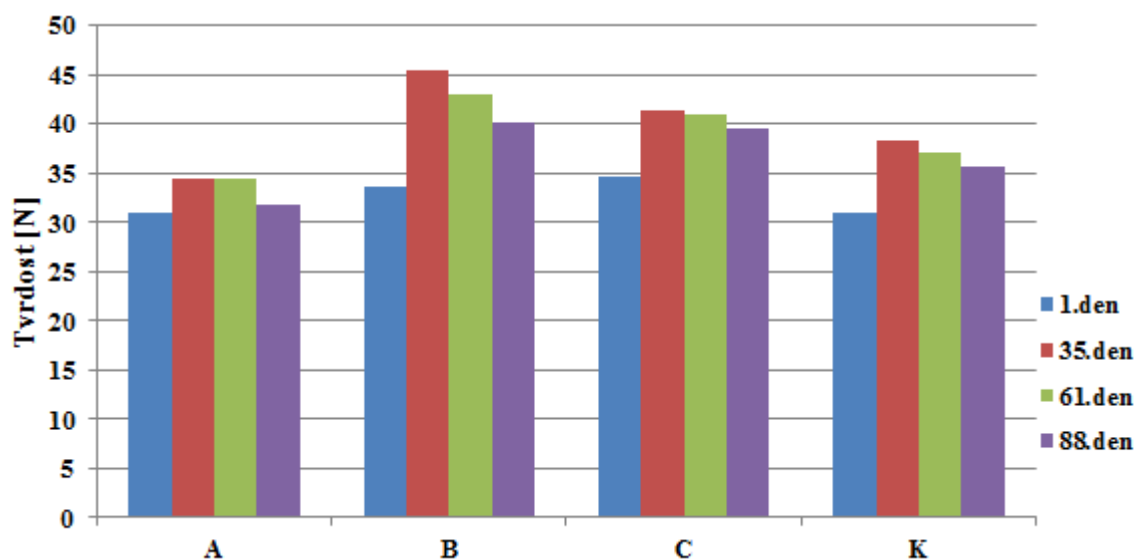


Obrázek 5. Stanovení obsahu soli u modelových vzorků sýrů v průběhu zrání

V prvních dnech po solení sýrů v solné lázni se na povrchu sýrů vytváří solný prsteneček, pásmo s nejvyšším obsahem soli. Pod solným prstencem se vyskytují další pásma se snižující se koncentrací NaCl směrem ke středu sýru. Obsah soli v bloku sýru se v průběhu zrání vyrovnává prostřednictvím difuze, u sýrů holandského typu trvá vyrovnávání koncentrace asi 4 týdny [67]. Z tohoto důvodu byla sůl stanovována až 35. den zrání. Obsah soli se u stanovovaných vzorků měnil jen nepatrně. Téměř u všech vzorků se obsah soli v průběhu zrání mírně snižoval, výjimka byla u vzorku A, kdy 88. den byl stanoven o 0,02 % vyšší obsah soli než 35. den. Průměrný obsah soli v průběhu zrání u vzorku A byl  $1,39 \pm 0,03$  %, u vzorku B  $1,52 \pm 0,02$  %, u vzorku C  $1,41 \pm 0,05$  a u vzorku K  $1,42 \pm 0,04$  %.

## 5.2 Texturní profilová analýza

V modelových vzorcích sýrů byla v průběhu zrání prováděna analýza texturních vlastností, výsledky tvrdosti, vyjádřené jako maximální síla (N) použitá pro stlačení vzorku o 25 % původní výšky, jsou uvedeny na obrázku 6.



Obrázek 6. Vývoj tvrdosti u modelových vzorků sýrů v průběhu zrání sýrů

Z obrázku 6 je patrné, že během prvního měsíce zrání se tvrdost zvyšovala u všech vzorků. Nejvýraznější nárůst byl pozorován u vzorku B, kdy 1. den zrání byla naměřena tvrdost 33,70 N a 35. den byla zaznamenána tvrdost 45,46 N, o 34,90 % vyšší. Zvyšování tvrdosti sýru je v prvních dnech zrání pravděpodobně způsobeno pomalejší proteolýzou a hydratací

kaseinu. Poté tvrdost v průběhu zrání klesala u všech vzorků. Klesání tvrdosti je pravděpodobně způsobeno následkem proteolýzy matrice kaseinu [80].

Tvrdost sýrů má také přímou souvislost s obsahem tuku v sušině, čím méně tuku v sušině bylo naměřeno, tím vyšší byla tvrdost sýru a naopak. Vyšší tvrdost sýrů s nižším obsahem tuku v sušině jsou přisuzovány neporušenosti kontinuity proteinové matrice menším zastoupením tukových kuliček. Nejvíce tuku v sušině bylo naměřeno u vzorku A, tento vzorek také vykazuje nejmenší tvrdost [81].

### 5.3 Mikrobiologický rozbor

Pomocí mikrobiologického rozboru byly stanoveny tyto skupiny mikroorganismů: mléčné koky, bakterie rodu *Lactobacillus*, enterokoky, enterobakterie, kvasinky, plísně a celkový počet mikroorganismů.

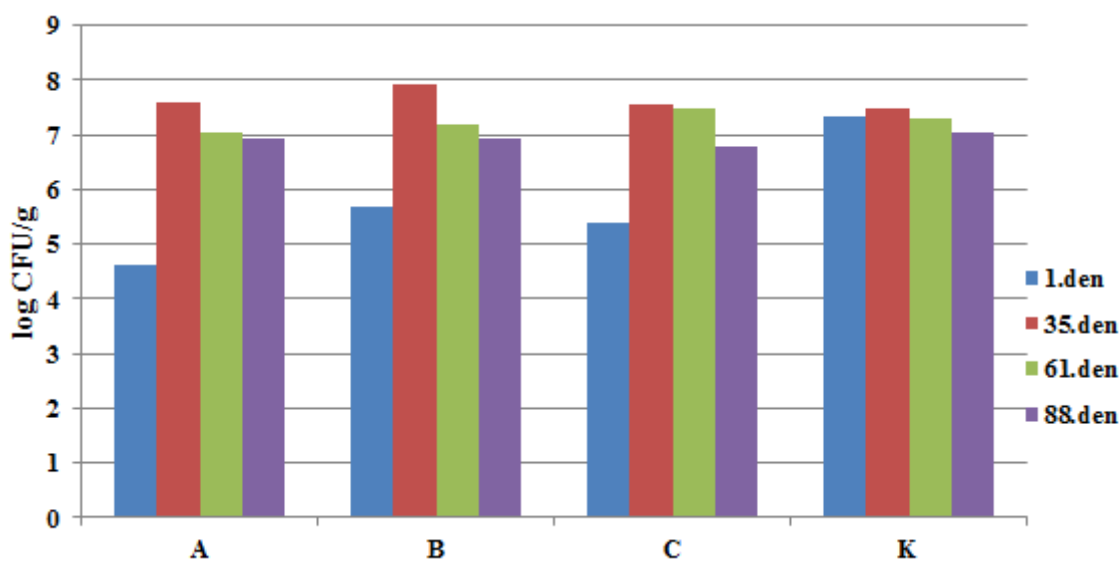
V průběhu celého experimentu nebyla během tříměsíčního zrání modelových vzorků sýrů u žádného z nich stanovena přítomnost enterokoků, enterobakterií ani kvasinek a plísní, což svědčí o tom, že během výroby byly dodržovány hygienické zásahy a nedošlo k nežádoucí kontaminaci.

#### 5.3.1 Celkový počet mikroorganismů

Tabulka 6. Stanovení CPM u mléka před a po pasteraci

	mléko před pasterací [log CFU/g]	mléko po pasteraci [log CFU/g]
<b>A</b>	4,08	< 1
<b>B</b>	4,26	< 1
<b>C</b>	4,21	< 1
<b>K</b>	4,51	< 1

Z tabulky 6 je patrné, že pomocí pasterace došlo ke zničení patogenních mikroorganismů a většiny vegetativních forem ostatních mikroorganismů.

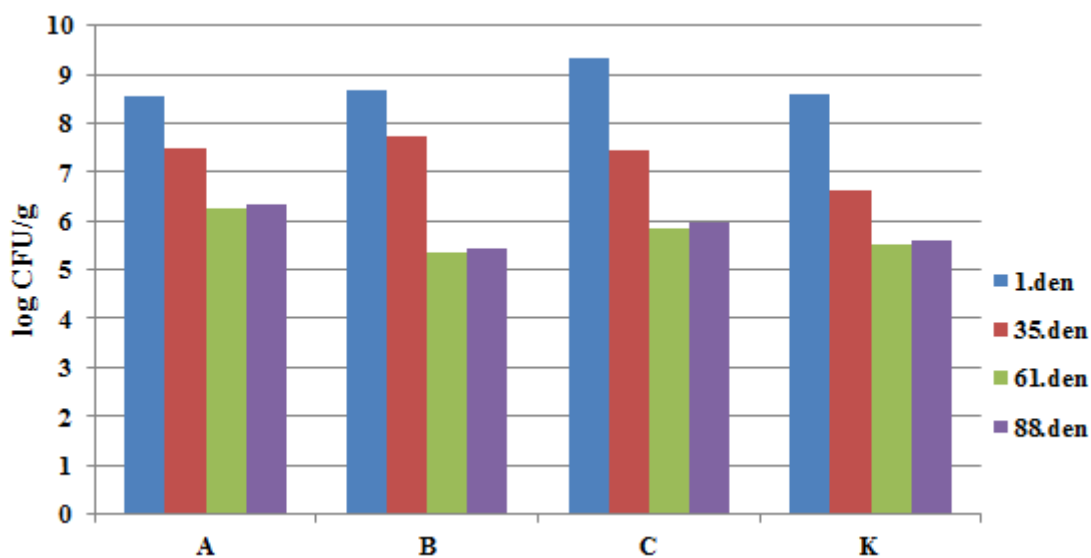


Obrázek 7. Stanovení celkového počtu mikroorganizmů u modelových vzorků sýrů v průběhu zrání

Obrázek 7 znázorňuje celkový počet mikroorganizmů analyzovaný v průběhu zrání v jednotlivých modelových vzorcích sýrů. První den byl zjištěn nevyšší celkový počet mikroorganizmů u vzorku K, 6,94 log CFU/g. 35. den se tento počet nepatrně zvýšil na 6,95 log CFU/g a v následujících dnech byl zaznamenán mírný pokles. Celkový počet mikroorganizmů u ostatních vzorků zaznamenal 35. den významný nárůst oproti 1. dnu. Nejvýraznější nárůst byl zjištěn z vzorku A, kdy první den byla hodnota celkového počtu mikroorganizmů 4,63 log CFU/g a 35. den se zvýšil až na 5,70 log CFU/g. Po zvýšení, které bylo zjištěno u všech vzorků 35. den, celkový počet mikroorganizmů klesal taktéž u všech vzorků.



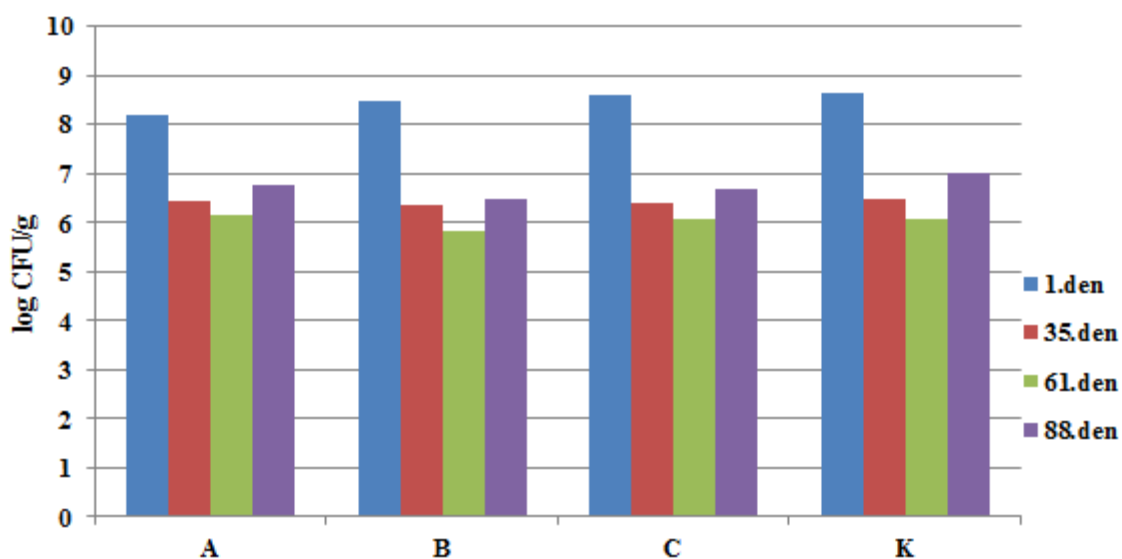
### 5.3.2 Mléčné koky



Obrázek 8. Stanovení mléčných koků u modelových vzorků sýrů v průběhu zrání

Z obrázku 8 je patrné, že nejvyšší počet mléčných koků byl stanoven první den zrání. Nejvíce mléčných koků bylo zjištěno u vzorku C, kdy hodnota v prvním dnu zrání dosahovala až 9,35 log CFU/g. Přírodní sýr není dobrým prostředím pro mikroorganismy z důvodu nízkého pH, poměrně vysokému obsahu soli a absenci významného množství zkvasitelných sacharidů. Zákysové kultury mohou v prvních dnech zrání dosáhnout počtů přibližně  $10^7$  -  $10^{9-10}$  CFU/g. V průběhu několika prvních týdnů u většiny sýrů jejich počet klesá [79]. To potvrzují i následující dva odběry (35. den a 61. den), ve kterých bylo zjištěno snižování počtu mléčných koků. Po dvou měsících zrání došlo k nepatrnému zvýšení počtu mléčných koků u všech vzorků. Počet mléčných koků v sýrech ovlivňuje spousta faktorů, mezi které patří doba zrání sýrů, teplota v průběhu zrání, druh sýru, aktivita vody, obsah soli, obsah tuku, atd. [27].

### 5.3.3 Bakterie rodu *Lactobacillus*

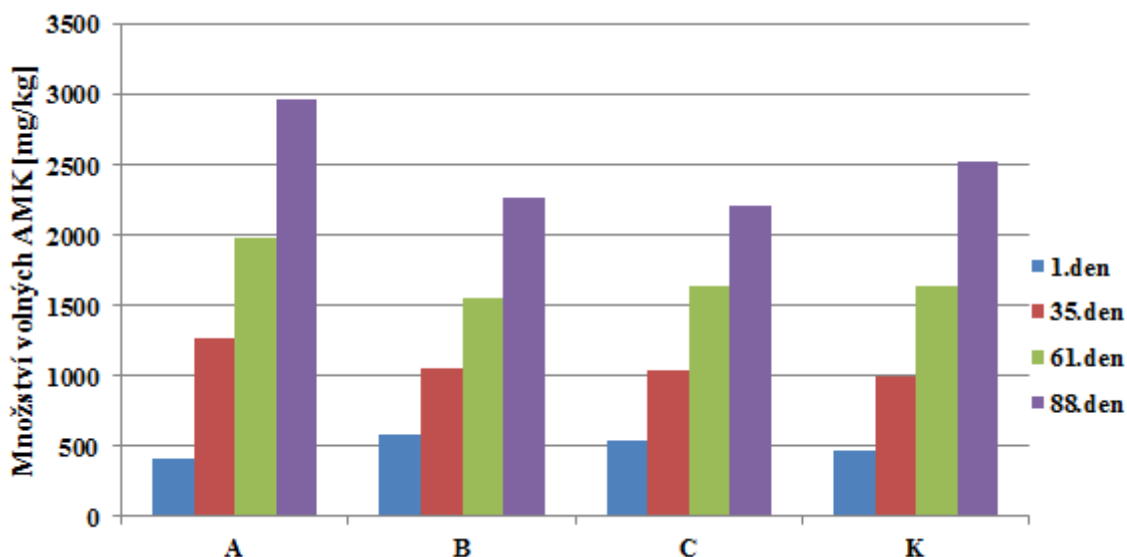


Obrázek 9. Stanovení bakterií rodu *Lactobacillus* u modelových vzorků sýrů v průběhu zrání

Z obrázku 9 je patrné, že nejvyšší počet bakterií rodu *Lactobacillus* byl zjištěn první den zrání. Následující dva rozborů ukázaly na snížení počtu těchto bakterií u všech vzorků, jako tomu bylo u mléčných koků. Naopak při posledním rozboru (88. den) byl zaznamenán zvýšený počet bakterií rodu *Lactobacillus* oproti posledním dvěma rozborům u všech vzorků. V tomto období zrání již nejsou dominantní mikroflórou zákysové kultury. Dominují spíše nezákysové non-startérové bakterie mléčného kvašení (NSBMK). Převážnou část NSBMK tvoří právě laktobacily. Vyznačují se také proteolytickou aktivitou způsobenou proteázami a peptidázami vázanými na buněčnou stěnu. Intracelulárními lipázami mohou také způsobovat slabou lipolýzu [79]. Zvýšený počet bakterií rodu *Lactobacillus* pravděpodobně souvisí se sníženým pH analyzovaným v 88. dnu zrání (obrázek 4 stanovení pH).

## 5.4 Stanovení obsahu volných aminokyselin

V modelových vzorcích sýrů byl v průběhu zrání stanovován obsah volných aminokyselin (FAA). Výsledné koncentrace celkového obsahu volných aminokyselin u jednotlivých vzorků v průběhu zrání jsou uvedeny na obrázku 10.



Obrázek 10. Celkový obsah volných aminokyselin (FAA) u modelových vzorků sýrů v průběhu zrání

Z obrázku 10 je patrné, že u všech vzorků došlo v průběhu zrání ke zvyšování množství volných aminokyselin, které má za následek probíhající proteolýza, jejíž jsou volné aminokyseliny konečnými produkty. Nejvyšší celkový obsah volných aminokyselin, 2969,7 mg/kg, při posledním měření (88. den) byl analyzován u vzorku A. Naopak nejnižší celkový obsah volných aminokyselin, 2209,7 mg/kg, při posledním měření (88. den) byl analyzován u vzorku C.

Tabulka 7. Obsah volných aminokyselin (FAA) ve vzorcích sýrů A a B v průběhu zrání

	A [mg/kg]				B [mg/kg]			
	1.den	35.den	61.den	88.den	1.den	35.den	61.den	88.den
<b>serin</b>	ND	22,5	44,9	301,9	ND	20,7	25,3	63,4
<b>histidin</b>	ND	102,4	158,4	117,1	ND	ND	ND	ND
<b>arginin</b>	60,4	101,5	253,7	327,1	240,4	291,9	336,5	480,0
<b>treonin</b>	14,7	51,9	62,2	95,5	39,8	55,3	53,2	105,2
<b>alanin</b>	12,8	52,2	72,5	107,5	16,1	43,0	50,6	68,7
<b>prolin</b>	62,4	77,8	88,3	109,0	66,7	61,5	69,8	65,6
<b>tyrozin</b>	13,5	26,5	40,8	89,6	23,5	50,8	69,8	108,9
<b>methionin</b>	ND	25,4	43,5	65,8	ND	10,6	33,2	53,4
<b>ornithin</b>	16,5	166,9	215,7	282,2	12,5	104,9	127,3	186,1
<b>lysin</b>	160,0	229,2	297,6	405,0	119,3	181,7	242,5	336,7
<b>isoleucin</b>	7,7	33,3	39,4	54,0	5,8	12,6	24,2	40,7
<b>leucin</b>	14,2	208,9	403,5	647,0	10,5	108,8	303,0	544,5
<b>phenylalanin</b>	13,2	139,2	237,1	323,1	10,7	77,8	183,0	272,2
<b>tryptofan</b>	34,3	34,8	19,1	44,9	44,1	48,8	38,3	50,9

ND – aminokyselina nedetekována

Tabulka 8. Obsah volných aminokyselin (FAA) ve vzorcích sýrů C a K v průběhu zrání

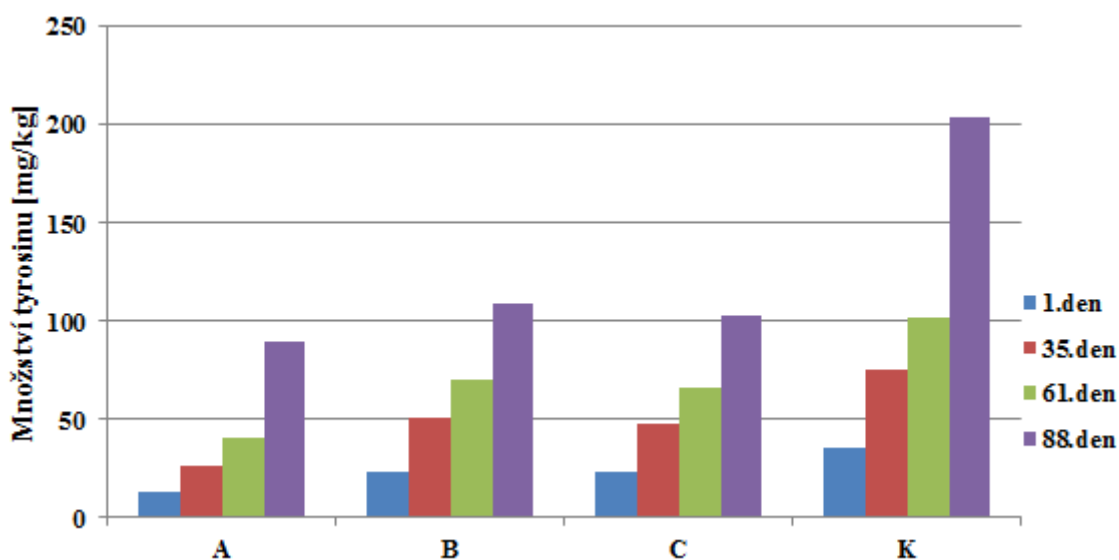
	C [mg/kg]				K [mg/kg]			
	1.den	35.den	61.den	88.den	1.den	35.den	61.den	88.den
<b>serin</b>	ND	10,4	17,8	36,9	ND	21,2	62,7	116,8
<b>histidin</b>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	24,9
<b>arginin</b>	226,4	262,0	366,7	393,6	125,4	200,1	205,2	317,3
<b>treonin</b>	26,3	31,3	53,0	62,2	20,6	32,9	45,7	62,0
<b>alanin</b>	9,8	42,6	58,4	76,1	20,0	7,7	60,1	80,9
<b>prolin</b>	67,5	70,8	76,4	93,4	61,3	70,0	87,0	85,5
<b>tyrozin</b>	23,1	47,6	65,7	102,4	35,4	75,5	101,4	204,0
<b>methionin</b>	ND	17,3	31,1	57,9	ND	15,3	42,6	74,1
<b>ornithin</b>	16,0	110,2	180,2	192,0	18,7	111,6	189,9	222,5
<b>lysin</b>	110,1	175,6	248,8	317,3	114,1	183,6	270,9	381,1
<b>isoleucin</b>	3,6	13,9	25,1	39,5	5,5	15,0	27,5	46,4
<b>leucin</b>	13,3	133,5	286,3	503,9	9,9	142,3	306,4	541,6
<b>phenylalanin</b>	11,6	92,7	175,1	282,6	11,4	99,6	200,3	316,4
<b>tryptofan</b>	32,8	38,5	49,1	51,9	40,4	44,1	43,1	49,5

ND – aminokyselina nedetekována

Obsah jednotlivých volných aminokyselin ve všech čtyřech vzorcích je uveden v tabulkách 7 a 8. Serin a methionin nebyly detekovány v 1. den zrání u žádného ze vzorků. Od 35. dne byly ale obě aminokyseliny detekovány u všech vzorků a jejich koncentrace se dále v průběhu zrání zvyšovala. Histidin byl detekován jen u vzorku A 35. den, 61. den a 88. den a u vzorku K 88. den zrání. 61. den u vzorku A bylo zaznamenáno zvýšení histidinu oproti předchozí analýze, ale v posledním měření byl jeho obsah nižší oproti 61. dnu.

Největší množství u všech vzorků bylo zaznamenáno u argininu, lyzinu a leucinu. Například leucinu bylo 88. den u vzorku A stanoveno 647,0 mg/kg, což je nejvyšší hodnota, která byla v průběhu zrání u všech vzorků zaznamenána. Jeho množství se od 1. dne zrání zvýšila až 46x. Obdobný trend byl zaznamenán u všech ostatních vzorků.

Rozklad bílkovin na aminokyseliny při proteolýze se odráží na změně pH v sýru. V průběhu zrání dochází ke zvyšování pH v důsledku tvorby amoniaku a jiných látek zásadité povahy [72]. V průběhu zrání bylo pozorováno zvyšování pH za současného růstu koncentrace aminokyselin do 61. dne, 88. den již byl zaznamenán pokles pH.



Obrázek 11. Koncentrace tyrozinu u modelových vzorků sýrů v průběhu zrání

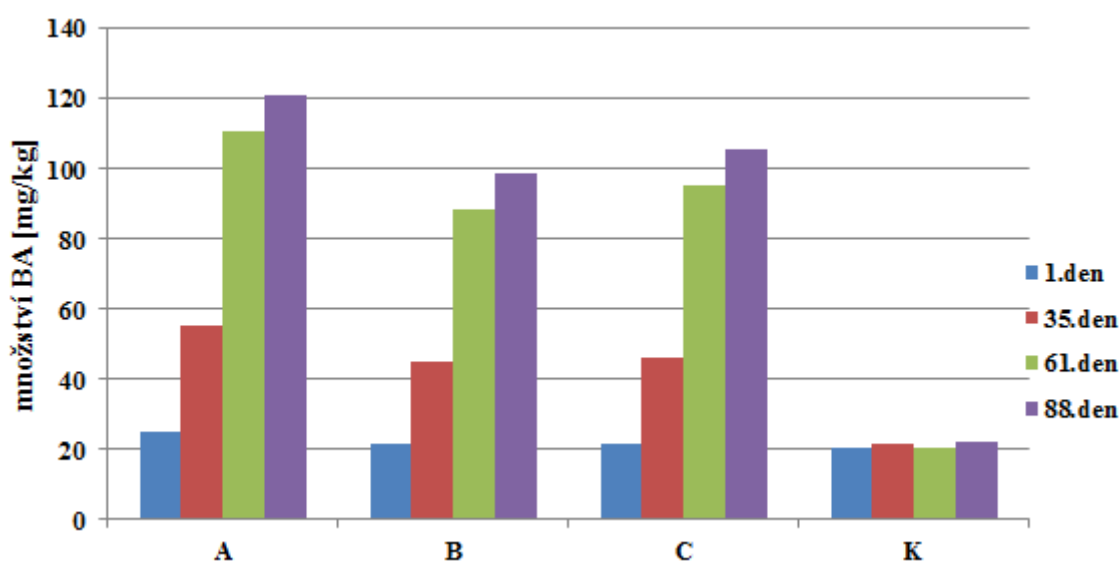
Obrázek 11 znázorňuje obsah tyrozinu v průběhu zrání jako reprezentativní aminokyselinu. Tyrozin je prekurzorem biogenního aminu tyraminu [9], který byl v průběhu zrání v modelových vzorcích sýrů detekován (obrázek 12). Množství tyrozinu se v průběhu zrání zvyšuje.

je u všech vzorků. Nejvyšší koncentrace tyrozinu byly naměřeny u vzorku K, což je také vzorek, kde byly analyzovány nejnižší koncentrace tyraminu. Naopak nejnižší koncentrace tyrozinu byly zjištěny u vzorku A, vzorek, kde byly naměřeny nejvyšší koncentrace tyraminu.

## 5.5 Stanovení obsahu biogenních aminů

V modelových vzorcích sýrů byl v průběhu zrání stanovován obsah biogenních aminů. Byl detekován pouze jeden biogenní amin, tyramin, jehož výsledná koncentrace je uvedena na obrázku 12.

### 5.5.1 Tyramin



Obrázek 12. Koncentrace tyraminu u modelových vzorků sýrů v průběhu zrání

Z obrázku 12 je patrné, že nejnižší obsah tyraminu byl analyzován u modelového vzorku sýru K v každé fázi zrání. Tento obsah se také v průběhu zrání výrazně neměnil, jako tomu bylo u všech ostatních vzorků. Průměrný obsah tyraminu u vzorku K v průběhu zrání byl  $21,31 \pm 0,74$  mg/kg. Pro výrobu vzorku K byl použit pouze provozní smetanový zákys, který neobsahoval biogenní aminy produkující kmeny.

Nejvyšší obsah tyraminu byl měřen v každé fázi zrání u modelového vzorku sýru A, pro jehož výrobu byl použit biogenní aminy produkující kmen *Lactococcus lactis* subsp. *cre-*

*moris* CCDM 946. První den zrání bylo naměřeno 25,14 mg/kg tyraminu, v dalších fázích zrání se jeho obsah zvyšoval. 35. den zrání se obsah tyraminu zvýšil o 119,33 %, 61. den se jeho obsah zvýšil o dalších 101,16 % a 88. den zrání ještě o 9,29 % na konečných 121,23 mg/kg.

U vzorků B a C (vzorky, u kterých byly při výrobě použity kromě biogenní aminy produkujícího kmene i biogenní aminy degradující kmeny) bylo analyzováno ve všech odběrech nižší množství tyraminu než u vzorku A.

U modelového vzorku B (pro výrobu byl použit BA produkující kmen *L. lactis* subsp. *cremoris* CCDM 946 + degradující kmen *Micrococcus luteus* BD29), byl v prvním dnu analyzován tyramin v množství 21,35 mg/kg. Následující odběr 35. den se zvýšil jeho obsah o 112,08 % na 45,28 mg/kg, což bylo o 17,88 % méně než ten samý den zrání u vzorku A. 61. den se zvýšil obsah tyraminu o dalších 95,47 % oproti 35. dnu na 88,51 mg/kg, což bylo o 20,20 % méně než u vzorku A. 88. den bylo analyzováno 98,64 mg/kg tyraminu, o 11,45 % více než 61. den ale o 18,63 % méně než u vzorku A. V průběhu zrání tedy průměrně docházelo k nižší tvorbě tyraminu u vzorku B oproti vzorku A o  $17,95 \pm 1,86$  %.

Nižší tvorba tyraminu oproti vzorku A byla také analyzována u vzorku C (pro výrobu byl použit BA produkující kmen *L. lactis* subsp. *cremoris* CCDM 946 + degradující kmen *Pseudomonas fulva* BD13). První den zrání bylo naměřeno 21,68 mg/kg tyraminu, 35. den jeho obsah vzrostl na 46,27 mg/kg, o 113,00 % více než první den zrání a o 16,09 % méně než bylo naměřeno ten samý den u vzorku A. 61. den se zvýšil obsah tyraminu o dalších 106,12 % oproti 35. dnu na 95,39 mg/kg, což bylo o 14,00 % méně než u vzorku A. 88. den bylo analyzováno 105,61 mg/kg tyraminu, o 10,71 % více než 61. den ale o 12,88 % méně než u vzorku A. V průběhu zrání tedy průměrně docházelo k nižší tvorbě tyraminu u vzorku C oproti vzorku A o  $14,18 \pm 1,17$  %.

Při analýze 25 sýrů ze slovenského trhu, byly nejvyšší koncentrace biogenních aminů (ve stovkách mg/kg v závislosti na druhu sýru) spojovány právě s tyraminem. Dalšími biogenními aminy analyzovanými v podobných koncentracích byly putrescin, kadaverin, spermin a spermidin. Naopak koncentrace tryptaminu byla pod hranicí detekce ( $< 4,2$  mg/kg) [82].

Ve studii, která porovnávala produkci biogenních aminů dvou kmenů *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* (kmeny ze sbírky mlékarénských mikroorganismů - CCDM 824 a CCDM 946) v sýrech holandského typu během 90 dní zrání při 10 °C, bylo ke konci zrání zjištěno množství tyraminu, za použití kmene CCDM 824, 400 mg / kg. V sýrech, kde byl použit

kmen CCDM 946 množství dokonce překročilo 500 mg / kg. V těchto sýrech byl také detekován putrescin, jehož koncentrace se na konci zrání při použití obou kmenů téměř vyrovnala a nepřesahovala hodnotu 800 mg/kg [83].

Ve studii, jejímž cílem bylo popsat vývoj histaminu, tyraminu, putrescinu a kadaverinu ve 4 vrstvách sýru holandského typu v závislosti na 3 režimech zrání během 98 denního období, byl nejvyšší obsah tyraminu, putrescinu a kadaverinu určen v sýrech skladovaných ve zracím sklepe při teplotě 10 °C po celou dobu pozorování. Nižší obsah biogenních aminů byl zjištěn u sýrů, které byly po 38 dnech skladování ve zracím sklepe při 10 °C přemístěny do chladicího zařízení (5 °C). Během trvání pokusu nebyl v sýru zjištěn histamin. Jako hlavní producenti analyzovaných biogenních aminů byly zjištěny non-starterové bakterie mléčného kvašení *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus casei / paracasei* a *Lactobacillus plantarum* [84].

Cílem další studie bylo prozkoumat startérové kultury s potenciálem produkovat biogenní aminy v sýru během dozrávání. Byly izolovány bakterie rodu *Enterococcus*, *Lactobacillus* a koliformní bakterie ze sýru holandského typu na počátku zrání. Statisticky významné počty bakteriálních izolátů byly testovány na přítomnost specifických DNA sekvencí kódující enzymy tyrozindekarboxylázu (tyrDC) a histidindekarboxylázu (hDC). PCR analýza DNA ze 14 izolátů *Enterococcus* a 3 izolátů *Lactobacillus* potvrdila přítomnost cílených DNA sekvencí [85].





## ZÁVĚR

Diplomová práce byla zaměřena na možnosti snížení obsahu biogenních aminů u sýrů holandského typu v průběhu 88 dnů zrání za použití biogenní aminy degradujících kmenů. V teoretické části byly popsány biogenní aminy a možnosti jejich eliminace a technologie výroby sýrů holandského typu.

Praktická část diplomové práce byla zaměřena na výrobu modelových vzorků sýrů a založení tříměsíčního skladovacího experimentu. Během zrání byly odebírány vzorky a prováděna základní chemická analýza (pH, obsah sušiny, obsah tuku v sušině, obsah soli), mikrobiologický rozbor, texturní profilová analýza, stanovení koncentrace volných aminokyselin a biogenních aminů.

Z experimentu byly zjištěny následující výsledky:

- obsah sušiny se v průběhu zrání u každého vzorku nepatrně zvyšoval z důvodu odpařování vody,
- obsah tuku v sušině v průběhu zrání mírně kolísal, průměrný obsah tuku v sušině u vzorku A byl 49 %, u vzorku B 46 %, u vzorku C 47 % a u vzorku K 48 %,
- byl zaznamenán růst pH do 61. dne zrání, poté byl zjištěn výraznější pokles,
- obsah soli se u modelových vzorků měnil jen nepatrně a pohyboval se kolem 1,4 %,
- 35. den se zvýšila tvrdost sýrů, dalším zráním však modelové sýry ztrácely na tvrdosti,
- technologicky nežádoucí mikroorganismy nebyly v průběhu zrání modelových vzorků sýrů detekovány,
- počty mléčných koků a laktobacilů se v průběhu zrání snižovaly, 88. den byl zaznamenán nárůst těchto mikroorganismů,
- celkový obsah volných aminokyselin se v průběhu zrání zvyšoval
- arginin, lyzin a leucin byly dominantní aminokyseliny u všech vzorků
- nejvíce tyrozinu bylo detekováno u vzorku K, kde bylo detekováno nejméně tyraminu a naopak nejméně tyrozinu bylo analyzováno u vzorku A, kde bylo zjištěno nejvíce tyraminu,
- byl detekován pouze jediný biogenní amin, tyramin.,

- obsah tyraminu u vzorku C (pro výrobu použit pouze smetanový provozní zákys) se v průběhu zrání výrazně neměnil a jeho koncentrace byla u C ze všech vzorků nejnižší,
- obsah tyraminu byl nejvyšší u vzorku A (vzorek, pro jehož výrobu byl použit biogenní aminy produkující kmen *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 946),
- obsah tyraminu se oproti vzorku A snižoval o cca 18 % u vzorku B (pro výrobu byl použit BA produkující kmen *L. lactis* subsp. *cremoris* CCDM 946 + degradující kmen *Micrococcus luteus* BD29),
- obsah tyraminu se také snižoval oproti vzorku A u vzorku B cca o 14 % (pro výrobu byl použit BA produkující kmen *L. lactis* subsp. *cremoris* CCDM 946 + degradující kmen *Pseudomonas fulva* BD13).

## SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] WUNDERLICHOVÁ, L., BUŇKOVÁ, L., KOUTNÝ, M., VALENTA, T. a BUŇKA, F. Novel touchdown-PCR method for the detection of putrescine producing Gram-negative bacteria in food products. *Food Microbiology*. 2013, 34(2), 268-276. ISSN 07400020.
- [2] HALÁSZ, A., BARÁTH, Á., SIMON-SARKADI, L. a HOLZAPFEL, W. Biogenic amines and their production by microorganisms in food. *Trends in Food Science*. 1994, 5(2): 42-49. ISSN 09242244.
- [3] NUÑEZ, M., MEDINA, M. Biogenic Amines. *Encyclopedia of Dairy Sciences*. 2011. 451-456. ISBN 978049533.
- [4] ROMANO, V., LADERO, V., ALVAREZ, M. a LUCAS, P. Putrescine production via the ornithine decarboxylation pathway improves the acid stress survival of *Lactobacillus brevis* and is part of a horizontally transferred acid resistance locus. *International Journal of Food Microbiology*. 2014, 175: 14-19. ISSN 01681605.
- [5] KAROVIČOVÁ, J., KOHAJDOVÁ, Z. Biogenic Amines in Food. *Chemical Papers*. 2005, 70-79. ISSN 0366-6352
- [6] KOMPRDA, T. *Obecná hygiena potravin*. Vyd. 1. V Brně: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, 2004. ISBN 80-7157-757-X.
- [7] ADAMS, M.. Fermentation and food safety. *Gaithersburg, Md: Aspen Publishers*. 2001. ISBN 9780306482960.
- [8] SANTOS, S. Biogenic amines: their importance in foods. *International Journal of Food Microbiology*. 1996, 29(2-3), 213-231. ISSN 01681605.
- [9] KALÁČ, P., KŘÍŽEK, M. Biogenní aminy a polyaminy v potravinách a jejich vliv na lidské zdraví. *Potravinářská revue*. 2005, 2, 40-42. ISSN 1801-9102.
- [10] LEROY, F. a DE VUYST, L. Fermented Foods: Fermented Meat Products. *Encyclopedia of Food and Health*. 2016, s. 656. ISBN 9780123849533.
- [11] MORACANIN, S., STEFANOVIC, S., RADICEVIC, T., BOROVIĆ, B. a DJUKIC, D. Production of Biogenic Amines by Lactic Acid Bacteria Isolated from Uzicka Sausages. *Procedia Food Science*. 2015, 5, 308-311. ISSN 2211601X.

- [12] ALVAREZ, M. a MORENO-ARRIBAS, V. The problem of biogenic amines in fermented foods and the use of potential biogenic amine-degrading microorganisms as a solution. *Trends in Food Science & Technology*. 2014, 39(2), 146-155. ISSN 09242244.
- [13] YANG, S., YANG, Y., LI, X. a ZHANG, Y. Determination of Biogenic Amines in Cheese by On-line Solid Phase Extraction Coupled with Capillary High Performance Liquid Chromatography. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*. 2016, 44(3), 396-402. ISSN 18722040.
- [14] SANLI, T. a SENEL, E. Formation of Biogenic Amines in Cheese. *Processing and Impact on Active Components in Food*. 2015, 223-230. ISBN 9780124046993.
- [15] LOIZZO, M., MENICHINI, F., PICCI, N., PUOCI, F., SPIZZIRRI, U. a RESTUCCIA, D. Technological aspects and analytical determination of biogenic amines in cheese. *Trends in Food Science & Technology*. 2013, 30(1), 38-55. ISSN 09242244.
- [16] MAYER, H., FIECHTER, G. a FISCHER, E. A new ultra-pressure liquid chromatography method for the determination of biogenic amines in cheese. *Journal of Chromatography A*. 2010, 1217(19), 3251-3257. ISSN 00219673.
- [17] PERIN, L. a NERO, L. The Relevance of Biogenic Amines in Dairy Products. *Dairy in Human Health and Disease Across the Lifespan*. 2017, 169-182. ISBN 9780128098684.
- [18] KOMPRDA, T., SMĚLÁ, D., NOVICKÁ, K., KALHOTKA, L. Content and distribution of biogenic amines in Dutch-type hard cheese. *Food Chemistry*. 2007, 102(1), 129-137. ISSN 03088146.
- [19] LANCIOTTI, R., PATRIGNANI, F., IUCCI, L., GUERZONI, M., SUZZI, G., BELLETTI, N. a GARDINI, F. Effects of milk high pressure homogenization on biogenic amine accumulation during ripening of ovine and bovine Italian cheeses. *Food Chemistry*. 2007, 104(2), 693-701. ISSN 03088146.
- [20] PINHO, O., FERREIRA, I., MENDES, E., OLIVEIRA, B. a FERREIRA, M. Effect of temperature on evolution of free amino acid and biogenic amine contents during storage of Azeitao cheese. *Food Chemistry*. 2001, 75(3), 287-291. ISSN 03088146

- [21] LEUSCHNER. Effect of enhanced proteolysis on formation of biogenic amines by lactobacilli during Gouda cheese ripening. *International Journal of Food Microbiology*. 44(1-2), 15-20. ISSN 01681605.
- [22] STANDAROVÁ, E., BORKOVCOVÁ, I. a VORLOVÁ, L. Obsah biogenních aminů v sýrech z české obchodní sítě. *Veterinářství*. 2008, (58), 735-739. ISSN 0506 8231.
- [23] STRATTON, J., HUTKINS, R. a TAYLOR, S. Biogenic amines in cheese and other fermented foods, A Review, *Journal of Food Protection*. 1990, 460-470. ISSN 19449097.
- [24] FLASAROVÁ, R., PACHLOVÁ, V., BUŇKOVÁ, L., MENŠÍKOVÁ, A., GEORGOVÁ, N., DRÁB, V. a BUŇKA, F.. Biogenic amine production by *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* strains in the model system of Dutch-type cheese. *Food Chemistry*. 2016, 194, 68-75. ISSN 03088146.
- [25] HERRERO-FRESNO, A., MARTÍNEZ, N., SÁNCHEZ-LLANA, E., DÍAZ, M., FERNÁNDEZ, M., MARTIN, M., LADERO, V. a ALVAREZ, M.. *Lactobacillus casei* strains isolated from cheese reduce biogenic amine accumulation in an experimental model. *International Journal of Food Microbiology*. 2012, 157(2), 297-304. ISSN 01681605.
- [26] NOVELLA-RODRÍGEZ, S. et al. Evaluation of biogenic amines and microbial counts throughout the ripening of goat cheeses from pasteurized and raw milk. *Journal of Dairy Research*. 2004, Vol. 71, p. 245-252. ISSN 0481623
- [27] WEMMENHOVE, E., VAN VALENBERG, H., VAN HOOIJDONK, A., WELLS-BENNIK, M., a ZWIETERING, M. Factors that inhibit growth of *Listeria monocytogenes* in nature-ripened Gouda cheese: A major role for undissociated lactic acid. *Food Control*. 2018, 84, 413-418. ISSN 09567135.
- [28] VAN HOORDE, K., HEYNDRICKX, M., VANDAMME, P. a HUYS, G. Influence of pasteurization, brining conditions and production environment on the microbiota of artisan Gouda-type cheeses. *Food Microbiology*. 2010, 27(3), 425-433. ISSN 07400020.
- [29] TABANELLI, G., MONTANARI, C. a GARDINI, F. Biogenic Amines in Food: A Review of Factors Affecting Their Formation. *Reference Module in Food Science*. 2018, 2018. ISBN 9780081005965.

- [30] NOVELLA-RODRÍGEZ, et al. Evaluation of biogenic amines and microbial counts throughout the ripening of goat cheeses from pasteurized and raw milk. *Journal of Dairy Research*. 2004, Vol. 71, 245-252. ISSN 00220299
- [31] MANETTA, A., DI GIUSEPPE, L., TOFALO, R., MARTUSCELLI, M., SCHIRONE, M., GIAMMARCO, M. a SUZZI, G. Evaluation of biogenic amines in wine: Determination by an improved HPLC-PDA method. *Food Control*. 2016, 62, 351-356. ISSN 09567135.
- [32] ROMANO, A., KLEBANOWSKI, H., LA GUERCHE, S., BENEDUCE, L., SPANO, G., MURAT, M. a LUCAS, P. Determination of biogenic amines in wine by thin-layer chromatography/densitometry. *Food Chemistry*. 2012, 135(3), 1392-1396. ISSN 03088146.
- [33] KALACĚ, P., ŠAVEL, J., KRĚŽEK, M., PELIKÁNOVÁ, T. a PROKOPOVÁ, M. Biogenic amine formation in bottled beer. *Food Chemistry*. 2002, 79(4), 431-434. ISSN 03088146.
- [34] LÁZARO, C., CONTE-JÚNIOR, C., CANTO, A., MONTEIRO, M., COSTA-LIMA, B., CRUZ, A., MÁRSICO, E. a FRANCO, R. Biogenic amines as bacterial quality indicators in different poultry meat species. *LWT - Food Science and Technology*. 2015, 60(1), 15-21. ISSN 00236438.
- [35] HENRÍQUEZ-AEDO, K., DURÁN, D., GARCIA, A., HENGST, M. a ARANDA, M. Identification of biogenic amines-producing lactic acid bacteria isolated from spontaneous malolactic fermentation of chilean red wines. *LWT - Food Science and Technology*. 2016, 68, 183-189. ISSN 00236438.
- [36] XIE, Ch., WANG, H., DENG, S. a XU, X.. The inhibition of cell-free supernatant of *Lactobacillus plantarum* on production of putrescine and cadaverine by four amine-positive bacteria in vitro. *LWT - Food Science and Technology*. 2016, 67, 106-111. ISSN 00236438.
- [37] SCHILLING, B. a LERCH, K. Amine oxidases from *Aspergillus niger*: identification of a novel flavin-dependent enzyme. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*. 1995, 1243(3), 529-537. ISSN 03044165.

- [38] ZAMAN, M., ABU BAKAR, F., BAKAR, J. Novel starter cultures to inhibit biogenic amines accumulation during fish sauce fermentation. *International Journal of Food Microbiology*. 2011, 145(1), 84-91. ISSN 01681605.
- [39] SHUKLA, S., PARK, H., LEE, J., KIM, J. a KIM, M. Reduction of biogenic amines and aflatoxins in Doenjang samples fermented with various Meju as starter cultures. *Food Control*. 2014, 42, 181-187. ISSN 09567135.
- [40] LEUSCHNER, R., HEIDEL, M. a HAMMES, W. Histamine and tyramine degradation by food fermenting microorganisms. *International Journal of Food Microbiology*. 1998, 39(1-2), 1-10. ISSN 01681605.
- [41] MAH, J. a HWANG, H. Inhibition of biogenic amine formation in a salted and fermented anchovy by *Staphylococcus xylosus* as a protective culture. *Food Control*. 2009, 20(9), 796-801. ISSN 09567135.
- [42] NAILA, A. a FLINT, S. Histamine Degradation by Diamine Oxidase, *Lactobacillus* and *Vergibacillus halodonitrificans* Nai18. *Journal of Food Processing & Technology*. 2012, 03(06). ISSN 21577110.
- [43] BOVER CID, S., MIGUÉLEZ-ARRIZADO, M., BECKER, B., HOLZAPFEL, W. a VIDAL-CAROU, M. Amino acid decarboxylation by *Lactobacillus curvatus* CTC273 affected by the pH and glucose availability. *Food Microbiology*. 2008, 25(2), 269-277 ISSN 01681605
- [44] ARENA, M., et.al. Characterization of a *Lactobacillus plantarum* Strain Able to Produce Tyramine and Partial Cloning of a Putative Tyrosine Decarboxylase Gene. *Current Microbiology*. 2007, 55(3), 205-210. ISSN 14320991
- [45] LUCAS, P., LANDETE, J., COTON, M., COTON, E. a LONVAUD-FUNEL, A. The tyrosine decarboxylase operon of *Lactobacillus brevis* IOEB 9809: characterization and conservation in tyramine-producing bacteria. *FEMS Microbiology Letters*. 2003, 229(1), 65-71. ISSN 1574-6968
- [46] MAH, J. a HWANG, H. Inhibition of biogenic amine formation in a salted and fermented anchovy by *Staphylococcus xylosus* as a protective culture. *Food Control*. 2009 20(9), ISSN 9567135.
- [47] YOKOI, K., HARADA, Y., SHOZEN, Y., SATOMI, M., TAKETO, A. a KODAIRA, K. Characterization of the histidine decarboxylase gene of *Staphylococcus epidermidis*



TYH1 coded on the staphylococcal cassette chromosome. *Gene*. 2011, 477(1-2), 32-41  
ISSN 2092-9293

[48] LEE, Y., LIN, C., LIU, F., HUANG, T. a TSAI, Y. Degradation of histamine by *Bacillus polymyxa* isolated from salted fish products. *Journal of Food and Drug Analysis*. 2015, 23(4), 836-844. ISSN 1021-9498

[49] ZAMAN, M., ABU BAKAR, F., BAKAR, J. Novel starter cultures to inhibit biogenic amines accumulation during fish sauce fermentation. *International Journal of Food Microbiology*. 2011, 145(1), 84-91. ISSN 0168-1605

[50] SHUKLA, S., PARK, H., LEE, J., KIM, J. a KIM, M.. Reduction of biogenic amines and aflatoxins in Doenjang samples fermented with various Meju as starter cultures. *Food Control*. 2014, **42**, 181-187. ISSN 09567135

[51] ARCOS, M., R. OLIVERA, E., ARIAS, S., NAHARRO, G. a LUENGO, J. The 3,4-dihydroxyphenylacetic acid catabolon, a catabolic unit for degradation of biogenic amines tyramine and dopamine in *Pseudomonas putida* U. *Environmental Microbiology*. 2010. ISSN 1462-2920

[52] BANDOUNAS, L., BALLERSTEDT, H., DE WINDE, J. a RUIJSSENAARS, H. Redundancy in putrescine catabolism in solvent tolerant *Pseudomonas putida* S12. *Journal of Biotechnology*. 2011. ISSN 0168-1656

[53] DÜSTERHÖFT, E.M., W. ENGELS a G. VAN DEN BERG. Cheese: Dutch-Type Cheeses. *Reference Module in Food Science*. 2016, 721-757. ISBN 9780081005965.

[54] OLSON, N. CHEESES: Types of Cheese. *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*. 2003, 1045-1051. ISBN 9780122270550.

[55] BENNETT, R. a JOHNSTON, K. Cheese: Mechanization of Cheesemaking. *Encyclopedia of Dairy Sciences*. 2011, 607-617. ISBN 9780123744074.

[56] DÜSTERHÖFT, E.M., ENGELS, W., a VAN DEN BERG, G. Dutch Type Cheeses. *Encyclopedia of Dairy Sciences*. 2011, 721-727. ISBN 9780123744074.

[57] DÜSTERHÖFT, E.M., Dutch-type cheeses. *Cheese Problems Solved*. 2007, 230-245. ISBN 9781845690601.

[58] FLASAROVÁ, R., PACHLOVÁ, V., BUŇKOVÁ, L., MENŠÍKOVÁ, A., GEORGOVÁ, N., DRÁB, V. a BUŇKA, F. Biogenic amine production by *Lactococcus*

lactis subsp. cremoris strains in the model system of Dutch-type cheese. *Food Chemistry*. 2016, 194, 68-75. ISSN 03088146.

[59] JO, Y., BENOIST, D.M., AMEERALLY, A., a DRAKE, M.A. Sensory and chemical properties of Gouda cheese. *Journal of Dairy Science*. 2018, 101(3), 1967-1989. ISSN 00220302.

[60] VAN DEN BERG, G. CHEESES: Dutch-type Cheeses. *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*. 2003, 2003, s. 1129-1135. ISBN 9780122270550.

[61] HAYALOGLU, A. Cheese: Microbiology of Cheese. *Reference Module in Food Science*. 2016, 2016. ISBN 9780081005965.

[62] DÜSTERHÖFT, E., ENGELS, W. a HUPPERTZ, T. Gouda and Related Cheeses. *Cheese*. 2017, 865-888. ISBN 9780124170124.

[63] TEDESCHI, T., GALAVERNA, G., DOSSENA, A. a SFORZA, S. Cheeses. Food Protected Designation of Origin - Methodologies and Applications. *Comprehensive Analytical Chemistry*. 2013, 2013, 479-509. ISBN 9780444595621.

[64] VAN LEUVEN, I., VAN CAELENBERG, T. a DIRINCK, T. Aroma characterisation of Gouda-type cheeses. *International Dairy Journal*. 2008, 18(8), 790-800. ISSN 09586946.

[65] FARKYE, N.Y. CHEESE. Microbiology of Cheesemaking and Maturation. *Encyclopedia of Food Microbiology*. 2014, 395-401. ISBN 9780123847331.

[66] FOX, P.F. CHEESE. Overview. *Encyclopedia of Dairy Sciences.*, 2011, 533-543. ISBN 9780123744074.

[67] GUINEE, P. a FOX, P. Salt in Cheese: Physical, Chemical and Biological Aspects. *Cheese*. 2017, 317-375. ISBN 9780124170124.

[68] BROOME, M.C., I.B. POWELL a LIMSOWTIN, G. Cheese: Starter Cultures: Specific Properties. *Encyclopedia of Dairy Science*. 2011, 559-566. ISBN 9780123744074.

[69] BENNETT, R. a JOHNSTON, K. Cheese: Mechanization of Cheesemaking. *Encyclopedia of Dairy Sciences*. 2011, 607-617. ISBN 9780123744074.

[70] DUSTERHOFT, E., ENGELS W. a HUPPERTZ, T. Cheese Ripening: Technological Aspects. *Reference Module in Food Science*. 2017. ISBN 9780081005965.

- [71] THIERRY, A., COLLINS, F., ABEIJÓN MUKDSI, M., MCSWEENEY, P., WILKINSON M., a SPINLER, H. Lipolysis and Metabolism of Fatty Acids in Cheese. *Cheese*. 2017, 423-444. ISBN 9780124170124.
- [72] MCSWEENEY, P. Cheese: Biochemistry of Cheese Ripening. *Encyclopedia of Dairy Sciences*. 2011, 667-674. ISBN 9780123744074.
- [73] MCSWEENEY, P., FOX, P. a CIOCIA, F. Metabolism of Residual Lactose and of Lactate and Citrate. *Cheese*. 2017, 411-421. ISBN 9780124170124.
- [74] McSweeney, M. The microbiology of cheese ripening. *Cheese Problems Solved*. 2007, 117-132. ISBN 9781845690601
- [75] GEORGALA, A., MOSCHOPOULOU, E., AKTYPIS, A., MASSOURAS, T., ZOIDOU, E., KANDARAKIS, I. a ANIFANTAKIS, E. Evolution of lipolysis during the ripening of traditional Feta cheese. *Food Chemistry*. 2005, 93(1), 73-80. ISSN 03088146.
- [76] RUGGIRELLO, M., COCOLIN, L. a DOLCI, P. Fate of *Lactococcus lactis* starter cultures during late ripening in cheese models. *Food Microbiology*. 2016, 59, 112-118. ISSN 07400020.
- [77] LEUSCHNER, R. a HAMMES, W. Tyramine degradation by micrococci during ripening of fermented sausage. *Meat Science*. 1998, 49(3), 289. ISSN 03091740.
- [78] LEUSCHNER, R., HEIDEL, M. a HAMMES, W. Histamine and tyramine degradation by food fermenting microorganisms. *International Journal of Food Microbiology*. 1998, 39(1-2), 1-10. ISSN 01681605.
- [78] FOX, P., MCSWEENEY, P., COGAN, T. a GUINEE, T. Cheese: Chemistry, *Physics and Microbiology, Third edition - Volume 1: General Aspects*. Amsterdam: London Elsevier, 2004a. 617s. ISBN 0-1226-3651-1.
- [79] SOUHRN PŘEDNÁŠKY O ZRÁNÍ PŘÍRODNÍCH SÝRŮ přednesený dne 5. září 2013 na Fakultě technologické Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, *Mlékařské listy* č. 141
- [80] BERTOLA, N. C., CALIFANO, A. N., BEVILACQUA, A. E., ZARITZKY, N. E. 2000. Effect of ripening conditions on the texture of Gouda cheese. *In International Journal of Food Science and Technology*, roč. 35, 2000, s. 207-214. ISSN 1365-2621

- [81] DEL NOBILE, M. A., CHILLO, S., FALCONE, P. M., LAVERSE, J., PATI, S., BAIANO, A. 2007. Textural changes of Canestrello Pugliese cheese measured during storage. *In Journal of Food Engineerin.*,. roč. 83, 2007, s. 621-628. ISSN 0260-8774
- [82] DICA KOVA, Z., BYSTRICKY, P., SEMJON, B., BAUER, S., VALI, S., PAULSEN, P. Contents of biogenic amines and microbiota in typical slowak cheeses, *Journal of food safety and food quality*, 4-9, 2018, ISSN 0146-9428
- [83] FLASAROVÁ, R., PACHLOVÁ, V., BUŇKOVÁ L., MENŠÍKOVÁ A., GEORGOVÁ N., DRÁB V., a BUŇKA F. Biogenic amine production by *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* strains in the model system of Dutch-type cheese. *Food Chemistry*. 2016, 194, 68-75. ISSN 03088146.
- [84] BUŇKOVÁ, L., BUŇKA F., MANTLOVÁ, G., ČABLOVÁ A., SEDLÁČEK I., ŠVEC P., PACHLOVÁ V. a KRÁČMAR S. The effect of ripening and storage conditions on the distribution of tyramine, putrescine and cadaverine in Edam-cheese. *Food Microbiology*. 2010, 27(7), 880-888. ISSN 07400020.
- [85] BURDYCHOVA, R. a KOMPRDA T. Biogenic amine-forming microbial communities in cheese. *FEMS Microbiology Letters*. 2007, 276(2), 149-155. ISSN 03781097.

## SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

BA	Biogenní aminy
CPM	Celkový počet mikroorganismů
FAA	Volné aminokyseliny
BMK	Bakterie mléčného kvašení
HPLC	Vysokoučinná kapalinová chromatografie
NSBMK	Non-startérové bakterie mléčného kvašení

## SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1. Vznik histaminu z aminokyseliny histidinu za účasti enzymu histidindekarboxylázy (HDC) .....	14
Obrázek 2. Stanovení obsahu sušiny u modelových vzorků sýrů v průběhu zrání .....	42
Obrázek 3. Stanovení obsahu tuku v sušině u modelových vzorků sýrů v průběhu zrání ..	43
Obrázek 4. Stanovení pH u modelových vzorků sýrů v průběhu zrání .....	44
Obrázek 5. Stanovení obsahu soli u modelových vzorků sýrů v průběhu zrání .....	45
Obrázek 6. Vývoj tvrdosti u modelových vzorků sýrů <v průběhu zrání sýrů .....	46
Obrázek 7. Stanovení celkového počtu mikroorganismů u modelových vzorků sýrů v průběhu zrání .....	48
Obrázek 8. Stanovení mléčných koků u modelových vzorků sýrů v průběhu zrání .....	49
Obrázek 9. Stanovení bakterií rodu <i>Lactobacillus</i> u modelových vzorků sýrů v průběhu zrání .....	50
Obrázek 10. Celkový obsah volných aminokyselin (FAA) u modelových vzorků sýrů v průběhu zrání .....	51
Obrázek 11. Koncentrace tyrozinu u modelových vzorků sýrů v průběhu zrání .....	53
Obrázek 12. Koncentrace tyraminu u modelových vzorků sýrů v průběhu zrání .....	54

**SEZNAM TABULEK**

Tabulka 1. Biogenní aminy a jejich prekurzory [7].....	13
Tabulka 2. Biogenní aminy vyskytující se v různých druzích sýrů [23].....	16
Tabulka 3. Přítomnost biogenních aminů a bakterií, které je produkují, v potravinách.....	20
Tabulka 4. Schéma prvního lisování .....	37
Tabulka 5. Schéma druhého lisování.....	37
Tabulka 6. Stanovení CPM u mléka před a po pasteraci.....	47
Tabulka 7. Obsah volných aminokyselin ve vzorcích sýrů A a B v průběhu zrání.....	52
Tabulka 8. Obsah volných aminokyselin ve vzorcích sýrů C a K v průběhu zrání.....	52