

Stanovení biogenních aminů v produktech živočišného původu z farmářské produkce

Bc. Kateřina Hudcová

Diplomová práce
2012



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav technologie a mikrobiologie potravin
akademický rok: 2011/2012

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Kateřina HUDCOVÁ**
Osobní číslo: **T10400**
Studijní program: **N 2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Technologie, hygiena a ekonomika výroby potravin**

Téma práce: **Stanovení biogenních aminů v produktech živočišného původu z farmářské produkce**

Zásady pro vypracování:

I. Teoretická část

1. Vlastnosti, vznik a význam biogenních aminů.
2. Výskyt biogenních aminů v potravinách a toxicita biogenních aminů.
3. Popis a výroba vybraných produktů živočišného původu.

II. Praktická část

1. Stanovení obsahu biogenních aminů ve vzorcích farmářských produktů živočišného původu.
 2. Mikrobiologické vyšetření vzorků farmářských produktů na mikroorganismy produkující biogenní aminy.
 3. Vyhodnocení výsledků a formulace závěrů.
-

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

1. SHALABY, A.R. Significance of biogenic amines to food safety and human health. Food Research International, 1997: Vol. 29, No.7, str.675-690.
2. ÖNAL, A. Current analytical methods for the determination of biogenic amines in foods. Food Chemistry, 2007: 103, p.1475-1486.
3. SILLA SANTOS, M. H. Biogenic amines: their importance in foods. International Journal of Food Microbiology. 1996: 29, p. 213-231.
4. HUTKINS, R.W. Microbiology and Technology of Fermented Foods. 1nd ed. USA: Blackwell Publishing, 2006. 475 s. ISBN 978-08138-0018-9.

Vedoucí diplomové práce:

Ing. Helena Velichová, Ph.D.

Ústav analýzy a chemie potravin

Datum zadání diplomové práce:

1. února 2012

Termín odevzdání diplomové práce:

2. května 2012

Ve Zlíně dne 10. února 2012


doc. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan




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

Příjmení a jméno: Hudcová Kateřina

Obor: Technologie, hygiena a ekonomika výroby 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 ¹⁾;
- beru na vědomí, že diplomová/bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému dostupná k nahlédnutí, že jeden výtisk diplomové/bakalářské práce bude uložen na příslušném ústavu Fakulty technologické UTB ve Zlíně a jeden výtisk bude uložen u vedoucího práce;
- byl/a jsem seznámen/a s tím, že na moji diplomovou/bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3 ²⁾;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ odst. 1 autorského zákona má UTB ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ odst. 2 a 3 mohu 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 dne 19.4. 2012

.....*Hudcová*.....

¹⁾ zákon č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, § 47 Zveřejňování závěrečných prací:

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

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

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

²⁾ zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 35 odst. 3:

(3) Do práva autorského také nezasahuje škola nebo školské či vzdělávací zařízení, užije-li nikoli za účelem přímého nebo nepřímého hospodářského nebo obchodního prospěchu k výuce nebo k vlastní potřebě dílo vytvořené žákem nebo studentem ke splnění školních nebo studijních povinností vyplývajících z jeho právního vztahu ke škole nebo školskému či vzdělávacího zařízení (školní dílo).

³⁾ zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 60 Školní dílo:

(1) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení mají za obvyklých podmínek právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla (§ 35 odst. 3). 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

Cílem diplomové práce bylo monitorovat obsah biogenních aminů ve vybraných produktech živočišného původu z farmářské produkce na území České republiky a Slovenska. Jednotlivé vzorky farmářských výrobků byly zakoupeny v obchodní síti v rámci regionálních farmářských trhů, nebo získány přímo na farmách. Celkem bylo k analýze předloženo 65 vzorků. Vzorky byly rozděleny do skupin na fermentované mléčné a fermentované masné výrobky. V teoretické části práce se uvádí základní charakteristika biogenních aminů, jejich vznik a vliv na lidský organismus. Stručně jsou popsány také technologické postupy vybraných produktů živočišného původu. Praktická část se zabývá stanovením obsahu osmi nejčastěji se vyskytujících biogenních aminů. Ke stanovení byla použita iontově-výměnná chromatografie s fotometrickou detekcí. Analýzy vzorků byly provedeny přibližně v polovině doby minimální trvanlivosti, resp. použitelnosti. Vzorky byly také kultivačně vyšetřeny na některé druhy mikroorganismů, z nichž některé mohou produkovat biogenní aminy. Analýzou byl detekován obsah biogenních aminů u 47 vzorků, to znamená, že 72 % vzorků bylo pozitivních na přítomnost těchto látek. Nejčastěji se vyskytovala kombinace tyramin, putrescin a kadaverin. U některých vzorků byla také zjištěna přítomnost sperminu a histaminu.

Klíčová slova: biogenní aminy, fermentované potraviny živočišného původu, iontově-výměnná kapalinová chromatografie

ABSTRACT

Purpose of this diploma is to monitor a content of biogenic amines in selected products of animal origin that are produced in the farms of Czech Republic and Slovakia. Individual samples of these farm products were purchased from the regional farmers' markets or straight from the farmers. Altogether 65 samples were analyzed. The samples were divided into fermented dairy product group and fermented meat product group. The theoretical part of this work presents basic characteristics of the biogenic amines, its origin and influence on human organism. Shortly it describes also technological processes of the selected products of animal origin. The practical part of this work examines content of the eight most frequent biogenic amines. To define this content the process of ion exchange

chromatography with photometric detection was used. The sample analysis were realized approximately in the half of the expiry period. The samples were examined also in the respect of some microorganisms that are able to produce biogenic amines. Analysis showed presence of the biogenic amines within 47 samples, which means 72 % of the samples have positive findings on these substances. The most frequent was a combination of tyramine, putrescine and cadaverine. Some samples were found also presence of spermine and histamine.

Keywords: biogenic amines, fermented foods of animal origin, ion-exchange liquid chromatography

Poděkování:

Ráda bych poděkovala vedoucímu mé diplomové práce Ing. Heleně Velichové, Ph.D. za ochotu, čas a odborné vedení při zpracování této diplomové práce.

Rovněž bych chtěla poděkovat doc. Ing. Františku Buňkovi, Ph.D. a doc. RNDr. Leoně Buňkové, Ph.D. za poskytnuté informace a cenné rady k praktické části práce.

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

OBSAH

ÚVOD	12
I TEORETICKÁ ČÁST	14
1 BIOGENNÍ AMINY	15
1.1 CHARAKTERISTIKA A VZNIK BIOGENNÍCH AMINŮ	15
1.2 VÝSKYT BIOGENNÍCH AMINŮ V POTRAVINÁCH	18
1.2.1 Faktory ovlivňující výskyt biogenních aminů v potravinách	19
1.2.2 Živočišné potraviny a biogenní aminy	20
1.2.2.1 Maso a masné výrobky.....	20
1.2.2.2 Ryby a rybí výrobky.....	21
1.2.2.3 Mléko a mléčné výrobky.....	22
1.2.3 Rostlinné potraviny a biogenní aminy.....	23
1.2.4 Fermentované alkoholické nápoje.....	23
1.3 MIKROORGANISMY PRODUKUJÍCÍ BIOGENNÍ AMINY.....	24
1.4 VÝZNAM BIOGENNÍCH AMINŮ A ÚČINKY NA LIDSKÝ ORGANISMUS	26
2 VYBRANÉ METODY STANOVENÍ BIOGENNÍCH AMINŮ	29
2.1 CHROMATOGRAFICKÉ STANOVENÍ.....	29
2.1.1 Derivatizace.....	30
2.1.2 Vlastní stanovení.....	31
2.1.2.1 Derivatizační činidla pro detekci v oblasti UV/VIS	31
2.1.2.2 Derivatizační činidla pro fluorimetrickou detekci	31
2.2 ELEKTROMIGRAČNÍ METODY	31
2.3 IMUNOCHEMICKÉ METODY	31
3 VYBRANÉ MLÉČNÉ PRODUKTY FARMÁŘSKÉHO PŮVODU	33
3.1 MLÉKO JAKO SUROVINA PRO VÝROBU	33
3.1.1 Mléko a jeho chemické složení	33
3.1.1.1 Bílkoviny.....	34
3.1.1.2 Mléčný tuk	34
3.1.1.3 Sacharidy.....	35
3.1.1.4 Minerální látky a vitaminy	35
3.1.1.5 Enzymy	36
3.1.2 Požadavky na mléko pro výrobu mléčných výrobků	36
3.1.3 Získávání a zpracování mléka na farmách	37
3.2 SÝRY.....	39
3.2.1 Obecná charakteristika	39
3.2.2 Technologie výroby sladkých sýrů.....	39
3.2.2.1 Tepelné ošetření mléka pro výrobu sýrů.....	40
3.2.2.2 Standardizace mléka a jeho další úpravy	40
3.2.2.3 Sýření mléka	41
3.2.2.4 Zpracování vzniklé sýřeniny	41
3.2.2.5 Tvarování a solení sýrů	42
3.2.2.6 Zrání sýrů	42

3.2.3	Dělení sýrů	43
3.3	OSTATNÍ MLÉČNÉ VÝROBKY	44
3.3.1	Jogurty	44
3.3.2	Tvaroh	44
4	OVČÍ A KOZÍ SÝRY	45
4.1	OVČÍ SÝRY	45
4.2	KOZÍ SÝRY.....	46
5	VYBRANÉ MASNÉ VÝROBKY FARMÁŘSKÉHO PŮVODU	47
5.1	CHARAKTERISTIKA A SUROVINY PRO VÝROBU MASNÝCH VÝROBKŮ.....	47
5.2	DĚLENÍ MASNÝCH VÝROBKŮ	47
5.3	FERMENTOVANÉ MASNÉ VÝROBKY	48
II	PRAKTICKÁ ČÁST	49
6	CÍLE PRÁCE	50
7	MATERIÁL A METODIKA	51
7.1	POPIS VZORKŮ POUŽITÝCH K ANALÝZE.....	51
7.2	STANOVENÍ OBSAHU BIOGENNÍCH AMINŮ.....	53
7.2.1	Přístroje a pomůcky.....	53
7.2.2	Chemikálie	53
7.2.3	Izolace a chromatografické stanovení biogenních aminů	54
7.3	MIKROBIOLOGICKÉ STANOVENÍ VÝZNAMNÝCH MIKROORGANISMŮ.....	54
7.3.1	Zařízení a pomůcky	54
7.3.2	Kultivační půdy a jiné roztoky	55
7.3.3	Příprava vzorků a metodika jednotlivých stanovení	58
7.3.4	Stanovované skupiny mikroorganismů	59
7.3.4.1	Stanovení celkového počtu mikroorganismů.....	59
7.3.4.2	Stanovení enterobakterií	59
7.3.4.3	Stanovení laktokoků	60
7.3.4.4	Stanovení laktobacilů.....	60
7.3.4.5	Stanovení enterokoků	60
7.3.4.6	Stanovení kvasinek a plísní.....	60
7.3.5	Odečítání výsledků	61
8	VÝSLEDKY A DISKUZE	62
8.1	VÝSLEDKY ANALÝZY BIOGENNÍCH AMINŮ.....	62
8.1.1	Obsah biogenních aminů ve vzorcích skupiny A	62
8.1.2	Obsah biogenních aminů ve vzorcích skupiny B	64
8.1.3	Obsah biogenních aminů ve vzorcích skupiny C	66
8.1.4	Obsah biogenních aminů ve vzorcích skupiny D	66
8.1.5	Obsah biogenních aminů ve vzorcích skupiny E	68
8.1.6	Obsah biogenních aminů ve vzorcích skupiny F.....	70
8.1.7	Obsah biogenních aminů ve vzorcích skupiny G.....	73
8.1.8	Obsah biogenních aminů ve vzorcích skupiny H.....	73

8.2	STANOVENÍ POČTU MIKROORGANISMŮ	75
8.2.1	Počty mikroorganismů ve vzorcích skupiny A	75
8.2.2	Počty mikroorganismů ve vzorcích skupiny B.....	76
8.2.3	Počty mikroorganismů ve vzorcích skupiny C.....	76
8.2.4	Počty mikroorganismů ve vzorcích skupiny D	77
8.2.5	Počty mikroorganismů ve vzorcích skupiny E.....	78
8.2.6	Počty mikroorganismů ve vzorcích skupiny F	79
8.2.7	Počty mikroorganismů ve vzorcích skupiny G	80
8.2.8	Počty mikroorganismů ve vzorcích skupiny H	80
9	SOUHRNNÁ DISKUZE	82
	ZÁVĚR	87
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	88
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	96
	SEZNAM OBRÁZKŮ	98
	SEZNAM TABULEK.....	99
	SEZNAM PŘÍLOH.....	101

ÚVOD

V současné době je v souvislosti s potravinami kladen důraz na kvalitu, bezpečnost a zdravotní nezávadnost výrobků. Do potravin se mohou nežádoucí látky dostávat z vnějšího prostředí, při zpracování či skladování, avšak v potravinách vznikají tyto látky také činností nejrůznějších mikroorganismů. Může se jednat o kontaminující mikroflórou, pokud došlo při výrobě k porušení hygienických či provozních podmínek, nebo k nevhodnému skladování. Mikroorganismy rozkládají složky potravin, způsobují jejich kažení a mohou do potravin uvolňovat zdraví škodlivé, až toxické sloučeniny.

Biogenní aminy jsou dusíkaté látky, které se v malých množstvích přirozeně vyskytují v potravinách. Mohou ale v potravinách vznikat právě činností mikroorganismů. Jejich výskyt je často spojován s fermentovanými potravinami, kde se na jejich vzniku podílí starterové a non-starterové bakterie, které se při výrobě uplatňují. Zvýšený výskyt těchto látek je pravidelně zaznamenáván u ryb, rybích výrobků, sýrů a jiných fermentovaných produktů.

Biogenní aminy se běžně podílejí na metabolických procesech v živých tkáních a vykazují různorodé biologické účinky. V metabolismu člověka jsou biogenní aminy nepostradatelné, avšak ve vysokých koncentracích mohou působit toxicky. Stanovení toxické dávky pro lidský organismus není jednoduché. Schopnost odbourávat aminy organismem závisí na celé řadě faktorů, zejména však na aktivitě enzymů aminooxidas.

Obsah biogenních aminů je v jednotlivých potravinách sledován, přestože není legislativou stanovování těchto látek u většiny potravin nařízeno. Důvodem pro zjišťování přítomnosti biogenních aminů je jejich toxicita ve vyšších koncentracích. Obsah biogenních aminů je možno využít k posuzování jakosti konkrétních potravin či surovin, neboť některé biogenní aminy patří mezi ukazatele bakteriálního kažení. Vysoké koncentrace těchto látek jsou detekovány u potravin v pokročilém stupni rozkladu. Při hodnocení obsahu biogenních aminů je nutno rozlišovat potraviny fermentované a nefermentované, neboť u fermentovaných výrobků jsou biogenní aminy pravidelnou přirozenou součástí.

Teoretická část diplomové práce se zabývá vlastnostmi biogenních aminů a podmínkami jejich vzniku v potravinách. Dále je popsán také význam aminů v metabolismu a jejich účinky na lidský organismus.

V praktické části byla provedena detekce jednotlivých biogenních aminů u 65 vzorků farmářských produktů živočišného původu, které zahrnovaly sýry, tvarohy, jogurty a zákysy z různých typů mlék a fermentované masné výrobky. Výrobky pocházejí z farmářské produkce, od maloproducentů z České republiky a Slovenska.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 BIOGENNÍ AMINY

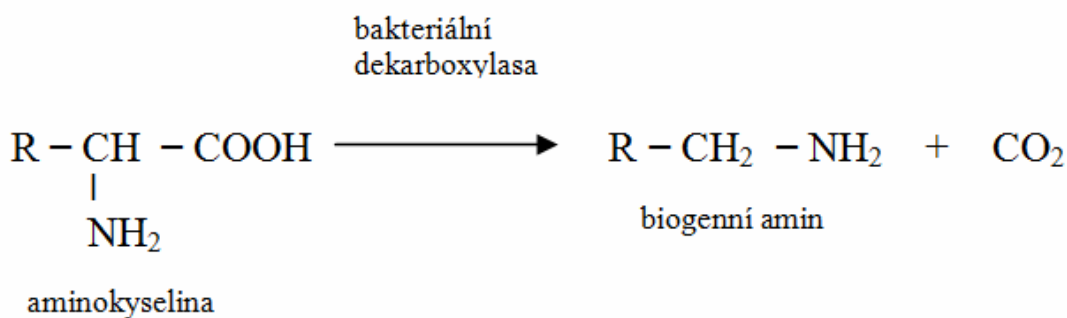
1.1 Charakteristika a vznik biogenních aminů

Aminy jsou jednoduché nízkomolekulární dusíkaté sloučeniny odvozené od amoniaku, v němž jsou jeden, dva nebo všechny tři atomy vodíku nahrazeny alkylovou či arylovou skupinou. Jedná se o alifatické, aromatické či heterocyklické bazické sloučeniny [1,2].

Přirozené aminy vznikají metabolickými procesy v živých organismech (např. spermin a spermidin). Aminy jsou přirozenou součástí rostlinných pletiv, často vázány na skořicové nebo mastné kyseliny a jejich deriváty. Kromě rostlinných buněk se biogenní aminy uplatňují také v metabolismu živočišných a mikrobiálních buněk. Vyskytují se přirozeně v malém množství ve většině potravin. [3,4].

Biogenní aminy vznikají dekarboxylací aminokyselin, nebo transaminací aldehydů a ketonů. Dekarboxylace může probíhat dvěma biochemickými mechanismy - aktivitou přirozeně se v potravinách vyskytujících endogenních enzymů dekarboxylas, nebo působením exogenních dekarboxylačních enzymů, které produkují různé mikroorganismy. Endogenní produkce biogenních aminů je ve srovnání s exogenní méně významná [11,12]. Z hlediska potravin a výživy je tedy rozhodující cestou vzniku biogenních aminů dekarboxylace přirozených aminokyselin působením enzymů dekarboxylas některých bakterií. Často se může jednat o mikroflóru kontaminující, ale také starterové a non-starterové kultury používané při výrobě fermentovaných potravin. Dekarboxylace je děj, kdy se z aminokyseliny odbourává α -karboxylová skupina za vzniku příslušného aminu a vytváří se oxid uhličitý. Schéma tohoto děje je uvedeno na obrázku 1. Enzymy, které iniciují tento proces se nazývají dekarboxylasy. Takto vznikají například histamin z aminokyseliny histidinu, tyramin z tyrosinu, 2-fenylethylamin z fenylalaninu či kadaverin z lysinu [4,5].

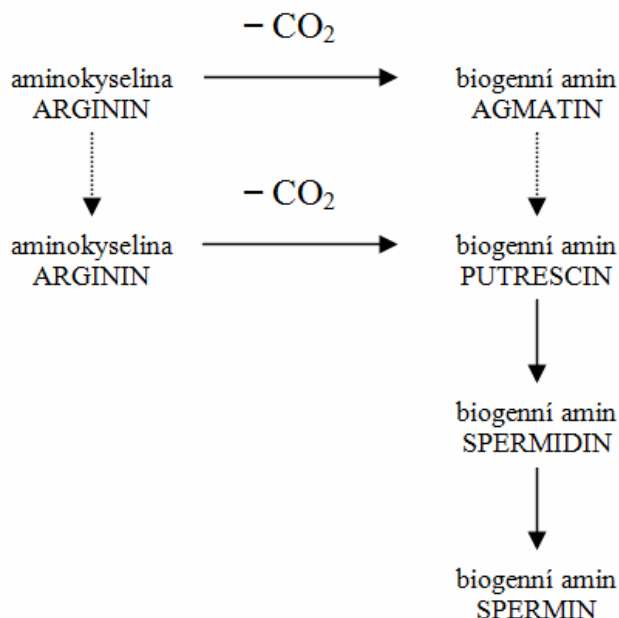
Obr. 1 Schéma vzniku biogenního aminu z aminokyseliny [5]



Biogenní aminy jsou s ohledem na jejich vznik a vlastnosti řazeny mezi endogenní přírodní toxiny, které se mohou v potravinách vyskytovat. Ve výživě jsou přirozenými antinutričními faktory a hygienickými ukazateli kvality potravin. Vysoké koncentrace biogenních aminů jsou indikátory pokročilého stupně kažení potravin. Sledování obsahu těchto látek je významné jednak z hlediska kontroly zdravotní nezávadnosti, ale také pro možnost posouzení jakosti některých druhů potravin [6,7]. V potravinách bylo objeveno více než 30 psychoaktivních a vazoaktivních aminů [8].

Mezi nejvýznamnější biogenní aminy obecně se vyskytující v potravinách patří histamin, tyramin, putrescin, kadaverin, tryptamin, 2-fenylethylamin, spermin a spermidin [9]. Putrescin, spermin a spermidin se řadí mezi polyaminy, které byly v roce 1990, díky svému biologickému významu v buňkách eukaryotních organismů, vyčleněny do samostatné skupiny. Mezi polyaminy se někdy řadí také kadaverin [5]. Putrescin byl k polyaminům zařazen, neboť je prekurzorem vzniku polyaminů sperminu a spermidinu, přestože je po chemické stránce diaminem [5,10]. Vznik polyaminů je zachycen v obrázku 2 [5].

Obr. 2 Schéma vzniku polyaminů [5]

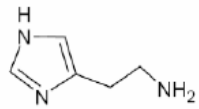
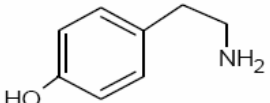
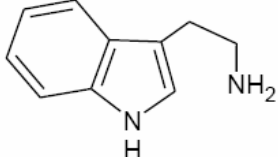
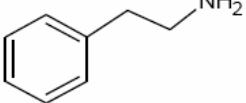
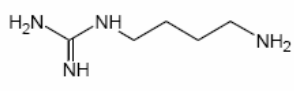
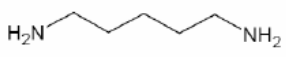
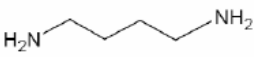
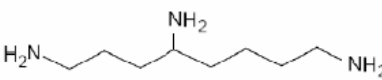
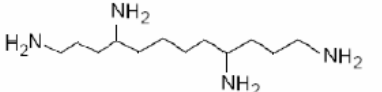


Biogenní aminy se podle chemické struktury dělí na:

1. alifatické - putrescin, kadaverin, spermin, spermidin,
2. aromatické - tyramin, 2-fenylethylamin,
3. heterocyklické - histamin, tryptamin, serotonin [3,13].

Názvy a vzorce nejvýznamnějších biogenních aminů a polyaminů uvádí tabulka 1.

Tab. 1 Názvy a vzorce jednotlivých biogenních aminů a polyaminů [21,47]

TRIVIÁLNÍ NÁZEV	SYSTEMATICKÝ NÁZEV	VZOREC
histamin	2-(1H-imidazol-5-yl)etanamin	
tyramin	4-(2-aminoethyl)fenol	
tryptamin	2-(1H-indol-3-yl)etanamin	
fenylethylamin	2-fenyletanamin	
agmatin	2-(4-aminobutyl)guanidin	
kadaverin	pentan-1,5-diamin	
putrescin	butan-1,4-diamin	
spermidin	<i>N</i> -(3-aminopropyl)butan-1,4-diamin	
spermin	<i>N,N'</i> -bis(3-aminopropyl)butan-1,4-diamin	

Podle původu je možno dělit aminy na přirozené a biogenní. Hranice mezi tímto dělením není jasně dána, protože některé aminy vznikají jak metabolismem přímo v živých organismech, tak i činností různých mikroorganismů [5].

1.2 Výskyt biogenních aminů v potravinách

Biogenní aminy (BA) se vyskytují prakticky ve všech potravinách rostlinného i živočišného původu, které obsahují bílkoviny a jejich rozkladné produkty - aminokyseliny. Přítomnost aminokyselin umožňuje jejich biochemickou či mikrobiální přeměnu. Množství těchto látek v potravinách kolísá řádově 10^{-9} až 10^{-6} mol.g⁻¹ potraviny [3,5,14]. Celkové množství a druh biogenních aminů v dané potravine však závisí na celé řadě faktorů. Významnou roli hraje samotná potravina, její složení, způsob zpracování a množství přítomných mikroorganismů [13,15]. Vznik BA je úzce spjat také s dobou skladování, teplotou, balením a s dalšími faktory [16].

U fermentovaných potravin jsou obecně uváděny vyšší obsahy biogenních aminů, protože biogenní aminy a polyaminy jsou jejich přirozenou složkou, vznikající činností mikroorganismů, které byly při výrobě použity [3]. Výskyt biogenních aminů ve vyšším množství u nefermentovaných výrobků je spojen s nežádoucím rozkladem bílkovin, způsobeným nevhodným skladováním, nebo kažením potraviny. Přesto však přítomnost biogenních aminů v potravine nemusí nutně korelovat s rostoucím množstvím mikroorganismů způsobující její kažení [3,14,17].

Přítomnost a množství biogenních aminů v různých potravinách byla široce zkoumána a zvýšené množství bylo zjištěno zejména u sýrů, fermentovaných masných výrobků, ryb a rybích výrobků [3]. Aminy s nejvyššími obsahy v potravinách jsou tyramin, histamin, putrescin a kadaverin. Zvýšený obsah putrescinu a kadaverinu bývá obvykle spojen s nežádoucím rozkladem bílkovin [13,14,15]. Biogenní aminy vznikají často působením kontaminující mikroflóry, například v rybách a mase v průběhu skladování (histamin, kadaverin, putrescin, tyramin), ale také při nevhodném skladování rostlinných surovin - ovoce, zeleniny a hub (především tyramin) [20]. V mléčných výrobcích mohou biogenní aminy produkovat i někteří zástupci bakteriálních rodů z běžně používaných kultur. Z rodu *Lactobacillus* lze zmínit například *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus casei* apod. Volbě vhodného bakteriálního rodu i druhu je nutno věnovat dostatečnou pozornost [13,14,33].

Polyaminy spermin a spermidin jsou přirozenou složkou čerstvých potravin a pochází z rostlinných pletiv použitých surovin. Jen velmi malé množství produkuje přítomná mik-

1.2.2 Živočišné potraviny a biogenní aminy

V potravinách živočišného původu, jako je maso, ryby a sýry, se vyskytují nejčastěji biogenní aminy histamin, tyramin, kadaverin a putrescin [21].

1.2.2.1 Maso a masné výrobky

Čerstvé maso obsahuje pouze malé koncentrace biogenních aminů. Přírozenou součástí čerstvého masa jsou polyaminy spermin a spermidin [35]. Ostatní aminy vznikají v maso a masných výrobcích až během skladování. V maso byla zjištěna především přítomnost tyraminu, kadaverinu, putrescinu a histaminu. Množství biogenních aminů lze využít jako indikátor čerstvosti masa. Obsahy biogenních aminů se s dobou skladování masa zvyšují, protože se při skladování uplatňuje enzymatická proteolytická aktivita přítomné mikroflóry za vzniku aminokyselin. Čerstvé maso může obsahovat 7 mg/kg kadaverinu a putrescinu, zatímco zkažené maso mnohonásobně více. Množství těchto aminů může u zkaženého masa dosáhnout až 60 mg/kg [22,23,25].

Skupina fermentovaných tepelně neopracovaných masných výrobků, vyráběná zráním za použití starterových kultur bakterií rodu *Lactobacillus*, *Pediococcus*, obsahovala vyšší množství biogenních aminů, zejména tyraminu, putrescinu a kadaverinu [32]. V tomto případě hraje významnou roli typ použité kultury a dekarboxylasová aktivita použitých bakterií mléčného kvašení. Nárůst obsahu BA je patrný zejména v počátečních fázích fermentace a je závislý na druhu přítomných mikroorganismů [21]. Vysoké obsahy biogenních aminů byly detekovány u suchých fermentovaných salámů, kde fermentace probíhala delší dobu [22,24].

Tvorba biogenních aminů závisí na velkém množství faktorů, z nichž nejvýznamnější jsou kvalita surovin, hygiena provozu a podmínky fermentace. Podmínky výroby značně ovlivňují obsah biogenních aminů u masných výrobků. Vyšší obsahy je možno očekávat u domácí výroby než výroby průmyslové, protože v domácím prostředí může snadněji dojít k odchylkám v postupu výroby, nebo nedodržení hygienických pravidel při manipulaci se surovinami či hotovými výrobky [20,22,24]. Vaření má na obsah BA relativně malý vliv, dochází pouze k jejich částečnému rozkladu [21].

1.2.2.2 Ryby a rybí výrobky

Čerstvé rybí maso obsahuje jen malé množství biogenních aminů. Například v mase tuňáka bývá 0-10 mg/kg histaminu a 0-2 mg/kg tyraminu [21]. Vzhledem ke skutečnosti, že v mase ryb je vysoký obsah bílkovin i volných aminokyselin, jako prekurzorů biogenních aminů, dají se potenciálně očekávat i vysoké koncentrace biogenních aminů v těchto produktech. O tvorbě aminů ve významných mořských rybách (tuňák, makrela aj.) je k dispozici řada údajů. U sladkovodních ryb je informací podstatně méně a tyto ryby nebyly doposud systematicky studovány na výskyt těchto látek [26]. V rybím mase se ve větších koncentracích vyskytuje především biogenní amin histamin. Svalovina ryb obsahuje vysoké množství aminokyseliny histidinu a mikroorganismy dekarboxylují tuto aminokyselinu na amin histamin. Například u tuňáka obsah histidinu dosahoval hodnot až 15 g/kg masa [27,45].

Je známo, že v rybách z čeledi *Scombriadae* a *Clupeidae* bývá obsah histaminu vysoký. Tato skutečnost bývá spojena také s nevhodným skladováním, manipulací a nedostatečnou konzervací těchto produktů [27]. Během skladování ryb při mrazírenských teplotách pod 0 °C vznikají biogenní aminy v nepatrném množství. Optimální teplota pro tvorbu histaminu je v rozmezí 5-38 °C. Scombroidní ryby, jak jsou často nazývány tuňák, makrela, sledi a další, jsou často spojovány s nebezpečím histaminové intoxikace, neboť tuňák může v ojedinělých případech obsahovat až 8000 mg histaminu na kg svaloviny [21,27,28]. Toxicita histaminu může být zvýšena přítomností jiných aminů, jako kadaverinu, putrescinu a tyraminu. Synergické působení těchto aminů násobí toxické účinky histaminu tím, že vyčerpávají příslušné detoxikační enzymy podílející se na odbourávání histaminu ve střevě člověka. K dalším biogenním aminům a polyaminům, které byly zjištěny v mase makrel, tuňáků, sledů a sardinek, patří tyramin, putrescin, kadaverin, spermin a spermidin [3,9,28,30].

Z důvodu, že se biogenní aminy v čerstvém rybím mase vyskytují jen v nepatrných množstvích, lze obsah aminů považovat za indikátor kažení ryb a jejich zdravotní závadnosti. Nejvyšší přípustné obsahy biogenních aminů vyskytující se u jednotlivých potravin jsou ve státech stanoveny různými způsoby a často se týkají pouze určitých potravin [28,29,31]. V Evropské unii je nařízením EP a Rady (ES) 2073/2005 v platném znění, stanoveno přípustné množství pouze pro histamin u produktů rybolovu a to 100 mg/kg u sedmi z devíti testovaných vzorků [31,93]

V rybách a rybích výrobcích jsou také přirozeně přítomny aminy trimethylamin a dimethylamin, které se podílí na typickém rybím pachu a jejich zvýšený obsah také souvisí s čerstvostí rybího masa [3,21].

1.2.2.3 Mléko a mléčné výrobky

V čerstvém mléce je obsah biogenních aminů malý a nedosahuje zpravidla 1 mg/kg. Vyskytovat se mohou pouze nízké koncentrace polyaminů sperminu, spermidinu, popřípadě putrescinu [33,45]. Obsah histaminu bývá v čerstvě nadojeném mléce velmi nízký, avšak jeho zpracováním může stoupat. Pasterované, nebo UHT ošetřené mléko má obvykle mírně vyšší hladiny histaminu než mléko čerstvé. Také při mléčném kvašení u fermentovaných mléčných výrobků lze pozorovat značný nárůst tohoto biogenního aminu. Jeho hodnota může činit až 13 mg/kg u jogurtů a až 2500 mg/kg u sýrů (v závislosti na době a podmínkách zrání) [34].

Sýry jsou ihned po rybách nejčastěji spojovány s otravami způsobenými histaminem. Obsahují často také značná množství tyraminu. První případ otravy byl popsán v Nizozemsku ze sýru Gouda v roce 1967 [4,9]. U sýrů byla zjištěna přítomnost celé řady biogenních aminů (histamin, tyramin, putrescin, kadaverin, tryptamin), které v těchto výrobcích vznikají enzymovou dekarboxylací aminokyselin působením mikroorganismů během zrání či skladování sýrů, kdy dochází k pozvolné proteolytické degradaci bílkovin [45]. I u sýrů závisí tvorba biogenních aminů na mnoha faktorech, podobně jako u jiných fermentovaných potravin. Zásadní jsou přítomnost dekarboxylasa pozitivních mikroorganismů, pH, vodní aktivita a koncentrace soli v sýru. S rostoucí teplotou a dobou skladování či zrání množství biogenních aminů zpravidla roste. Nejvyšší obsahy byly zjištěny u sýrů zrajících a u sýrů, které byly kontaminovány nežádoucími bakteriemi při nedodržení hygienických předpisů [3,5]. Jsou-li dodržovány zásady správné výrobní a hygienické praxe obsahují i sýry zrající dlouhou dobu nízké koncentrace biogenních aminů. Ukazuje se, že v případě použití kvalitní pasterované výchozí suroviny, za použití technologií s vysokým standardem hygieny provozu, je náchylnost k tvorbě aminů nižší. Bylo zjištěno, že produkty s vyšším obsahem aminů pocházejí v řadě případů z menších výroben či farem, kde může snadněji dojít k odchylkám při výrobě či porušení hygienických pravidel [21,34,45].

U fermentovaných potravin je průběh a intenzita tvorby BA obecně hůře předvídatelná ve srovnání v potravinami nefermentovanými, neboť biogenní aminy produkuje přirozená mikroflóra a současně v některých případech i mikroorganismy kontaminující [45].

Vyšší obsahy histaminu a tyraminu bývají pravidelně nalézány v sýrech ementálského typu či typu čedar (až 1500 mg/kg). Vysoké obsahy těchto látek se vyskytují v plísňových sýrech typu camembert (až 2000 mg/kg) a roquefort (až 1100 mg/kg). Obsahy biogenních aminů v tavených sýrech jsou vesměs desetkrát nižší ve srovnání se sýry tvrdými a zrajícími [3,34,45].

1.2.3 Rostlinné potraviny a biogenní aminy

Biogenní aminy se přirozeně vyskytují v nízkých koncentracích také v rostlinných surovinách, jako například v ovoci, zelenině a výrobcích z nich [36]. v jednotlivých druzích ovoce a zeleniny se obsah biogenních aminů liší. Opět ale platí skutečnost, že se množství aminů zvyšuje se stupněm zralosti či dobou skladování. U ovoce a zeleniny byla často zjištěna přítomnost především tryptaminu, tyraminu a noradrenalinu [24,37]. Biogenní aminy se mohou nacházet také v nejrůznějších ovocných džusech, ve kterých bylo prokázáno široké spektrum aminů, přičemž nejvíce se vyskytoval putrescin [3,37,38]. Tyramin obsahovaly například brambory, rajčata a papriky [38]. Také v kečupu, rajčatovém protlaku a špenátovém pyré byly nalezeny nízké koncentrace biogenních aminů, protože jsou aminy přirozeně v rostlinných pletivech a mohou být proto detekovány v konečných výrobcích. Mléčně fermentovaná zelenina, jako kysané zelí, obsahovala histamin [3,37]. Kysané zelí se vyrábí spontánním kvašením, což je jedna z příčin výkyvů jeho jakosti a přítomnosti těchto sloučenin. Díky značnému obsahu histaminu a tyraminu, který je u kysaného zelí pravidelně detekován, lze kysané zelí řadit mezi potraviny, které mohou u citlivých jedinců se sníženou detoxikační schopností organismu, vyvolávat nežádoucí účinky. Obsahy těchto aminů je možno snížit vhodným skladováním, hygienou, ale také použitím vhodných kultur mléčných bakterií [39]. V houbách bylo nalezeno vyšší množství polyaminu spermidinu a u některých druhů hub i fenylethylaminu [3,14].

1.2.4 Fermentované alkoholické nápoje

U alkoholických nápojů, jako je pivo a víno, které byly získány alkoholovým kvašením se může pomnožit nežádoucí mikroflóra a produkovat biogenní aminy až do množství, které

může u některých vnímavých osob vyvolat intoxikaci. Možnost otravy roste v případě, jsou-li tyto nápoje konzumovány ve větším množství během krátkého časového intervalu [34,40,41]. Přítomný alkohol současně potlačuje účinek detoxikačních enzymů aminooxidasy ve střevě a snižuje detoxikační schopnosti organismu [4]. Pivo a víno jsou nápoje, do kterých biogenní aminy přešly z použitých surovin, nebo ve kterých BA vznikly působením nežádoucích mléčných bakterií, které se ve výrobcích pomnožily v důsledku kontaminace před plněním, či nevhodného skladování [40,45,55].

Pivo může obsahovat nejrozumnější biogenní aminy, jako jsou tyramin, histamin, kadaverin a další. Do piva mohou přecházet biogenní aminy ze sladu, ve kterém se tyto látky tvoří při klíčení sladovnického ječmene [3,41]. Množství aminů se zvyšuje i během kvašení mladiny. Během skladování piva může docházet ke tvorbě biogenních aminů, a to zejména, bylo-li pivo kontaminováno při výrobě nežádoucí mikroflórou a nebo nebylo-li dostatečně pasteurováno [40,41,42].

Ve víně se mohou BA tvořit v různých stádiích výroby a jejich množství v konečném víně je značně vyšší než v moštu. Obsah biogenních aminů ve víně je různý. Obecně platí skutečnost, že červená vína mívají vyšší koncentrace těchto látek než vína růžová a bílá. Podle některých autorů vznikají některé aminy činností kvasinek při alkoholovém kvašení, přičemž jsou-li použity čisté kultury kvasinek, je pozorována vyšší tvorba biogenních aminů, než při spontánní fermentaci. Během malolaktické fermentace působením bakterií mléčného kvašení vznikají ve víně biogenní aminy histamin, tyramin a putrescin. Ve víně je jedním z nejčastěji detekovaným aminem putrescin [41,42,43,44]. Zvýšené koncentrace putrescinu a kadaverinu je možno hodnotit jako znak špatné hygieny při výrobě [43,44].

1.3 Mikroorganismy produkující biogenní aminy

Schopnost různých mikroorganismů dekarboxylovat aminokyseliny (AMK) a produkovat biogenní aminy je značně odlišná, přičemž odlišnosti ve tvorbě BA byly zjištěny též mezi jednotlivými druhy v rámci jednoho rodu bakterií. Biogenní aminy vznikají dekarboxylací příslušných AMK, což je zobrazeno v tabulce 3. Putrescin se tvoří nejčastěji dekarboxylací z ornithinu, avšak může vznikat též z argininu přes agmatin. Spermin a spermidin vznikají z putrescinu [45,46]. Dekarboxylaci aminokyselin v potravinách často vyvolávají především hnilobné bakterie. Dekarboxylační schopnost vykazují celá řada bakterií mléčného kvašení, běžně používaných při výrobě potravin. V literatuře však existují nejednotné či

částečně protichůdné názory na činnost různých druhů bakterií v souvislosti z tvorbou BA. Existují značné rozdíly mezi jednotlivými druhy a nemalou úlohu sehrává samotný druh potraviny, způsob a podmínky výroby. Při studiu biogenních aminů je třeba především odlišně posuzovat potraviny fermentované a nefermentované, neboť u výrobků připravených fermentací je obsah biogenních aminů pravidelnou a přirozenou součástí [45,46,48]. Schopnost tvorby biogenních aminů, jako tyramin, histamin, putrescin a kadaverin ve fermentovaných potravinách, byla popsána u velkého počtu bakterií mléčného kvašení - rody *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Oenococcus* a *Leuconostoc*. Biogenní aminy může vytvářet také celá řada bakterií z čeledi *Enterobacteriaceae* a rodu *Pseudomonas* [3,46]. Vybrané mikroorganismy, u kterých byla zaznamenána dekarboxylasová aktivita s příslušnými typy potravin, popisuje tabulka 2.

Tab. 2 Vybrané mikroorganismy s dekarboxylasovou aktivitou [21]

DRUH POTRAVINY	DRUH MIKROORGANISMU	PRODUKOVANÉ AMINY
ryby a rybí výrobky	<i>Morganella morganii</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Hafnia alvei</i> <i>Proteus mirabilis</i> , <i>Proteus vulgaris</i> <i>Clostridium perfringens</i> <i>Enterobacter aerogenes</i> <i>Bacillus</i> sp. <i>Staphylococcus xylosus</i>	histamin, tyramin, kadaverin, putrescin, agmatin, spermin, spermidin
sýry	<i>Lactobacillus buchneri</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. bulgaricus</i> <i>Lactobacillus acidophilus</i> <i>Enterococcus faecium</i> <i>Bacillus macerans</i> <i>Propionibacterium</i> sp.	histamin, tyramin, kadaverin, putrescin, tryptamin
maso a masné výrobky	<i>Pediococcus</i> sp. <i>Lactobacillus</i> sp. <i>Pseudomonas</i> sp. <i>Streptococcus</i> sp. <i>Micrococcus</i> sp. čeleď <i>Enterobacteriaceae</i>	histamin, tyramin, kadaverin, putrescin, tryptamin, fenylethylamin
fermentovaná zelenina	<i>Lactobacillus plantarum</i> <i>Leuconostoc mesenteroides</i> <i>Pediococcus</i> sp.	histamin, tyramin, kadaverin, putrescin, tryptamin, fenylethylamin
fermentované produkty ze sóji	<i>Lactobacillus plantarum</i> <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	histamin, tyramin, kadaverin, putrescin, tryptamin

1.4 Význam biogenních aminů a účinky na lidský organismus

Biogenní aminy se vyskytují přirozeně v rostlinných pletivech i živočišných tkáních a zastávají zde celou řadu nezbytných funkcí. V malých množstvích jsou pro organismus nepostradatelné, avšak vyšší koncentrace mohou působit toxicky [21,24,48].

Kromě jejich úlohy jako zdroje dusíku, jsou významnými prekurzory pro syntézu hormonů, alkaloidů, nukleových kyselin a bílkovin [27]. Například dekarboxylací tryptofanu enzymem tryptofandekarboxylasou vzniká tryptamin, z kterého se tvoří hormon serotonin [21]. Někteří zástupci aminů dodávají surovinám, ve kterých se nachází, typickou chuť a vůni [49]. Některé biogenní aminy mají vazoaktivní účinky a působí tedy na cévní systém. Histamin působí vasodilatačně - roztahuje cévy a snižuje krevní tlak. Tyramin působí opačně a krevní tlak zvyšuje [45]. Část aminů, jako je histamin, serotonin a dopamin, je řazena k tkáňovým hormonům [54]. Další významné funkce jednotlivých aminů znázorňuje tabulka 3 [21].

Konzumace potravin obsahujících vysoké množství biogenních aminů může vyvolat zdravotní problémy, až otravu. Projevy otravy jsou: nevolnost, dýchací potíže, bušení srdce a nepravidelný tep. Často se přidává také bolest hlavy, která u vnímavých osob může přejít až k těžkým migrénovým stavům [45,50]. Dalšími příznaky intoxikace jsou kožní problémy, jako zarudnutí, kopřivky a otoky [52].

Po požití potravy s obsahem aminů dojde v organismu k jejich rychlé detoxikaci konjugací nebo pomocí enzymů aminooxidas [24,45]. Hlavní roli hrají monoaminoxidasa (MAO) a diaminoxidasa (DAO) a též enzym histamin-N-methyltransferasa. Tyto enzymy katalyzují deaminaci aminů za vzniku aldehydů, kyselin, NH_3 či peroxidu vodíku. Enzymy působí již v tenkém střevě a do krve přechází jen rozkladné produkty [21,53]. Histamin se účinkem DAO oxiduje na kyselinu 4-imidazolylactovou, která se váže na ribosu, což je nejběžnější detoxikační mechanismus. Enzym N-methyltransferasa vyžaduje kofaktor S-adenylmethionin, který je obsažen v cytoplazmě buněk dřeně nadledvin [56]. Méně běžná je přeměna histaminu na N-acetylhistamin nebo enzymatická methylace na atomech dusíku. Tyramin je MAO odbouráván na kyselinu 4-hydroxyfenylactovou, méně často na N-methyltyramin a 4-hydroxyfenyl-2-aminoethanol. [45].

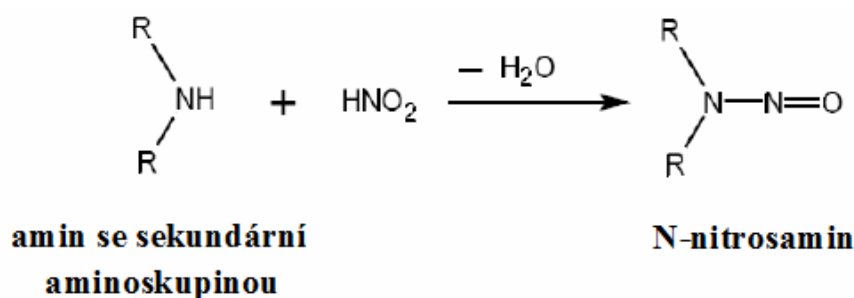
Vysoké koncentrace BA není detoxikační systém schopen odstraňovat a dochází k hromadění v těle [21,24,53]. Účinky biogenních aminů v organismu závisí na celé řadě faktorů.

Nejvýznamnější z nich je snížená aktivita enzymů MAO a DAO, způsobená buď genetikými vlohami, nebo jejich inhibitory. Mezi ně patří některá léčiva (antidepressiva Tranylcypromin, Nardil, Imipramin aj.) a alkohol. Synergický vliv může mít i káva, čaj a kouření [21,45,50]. Rozdíly v schopnosti detoxikovat biogenní aminy jsou známy také mezi pohlavím a věkovými kategoriemi [3,9,44].

V praxi nejčastěji dochází k otravám po požití makrelovitých a sledovitých ryb či některých typů sýrů [45]. Tyto otravy bývají označovány u ryb jako „skombrotoxikosa“, u sýrů jako tzv. „reakce na sýr“. Může docházet k poruchám centrálního nervového systému, krevního oběhu, bolestem hlavy, bušení srdce a zvracení [45,53]. Pravidelně dochází k tachykardii, vzácně i k arytmií [59].

Polyaminy jsou podstatně méně toxické. Jejich negativní vliv při intoxikaci spočívá především v odčerpání detoxikační kapacity zmíněných enzymů a v následném synergickém zesílení účinku ostatních toxickejších aminů. Aminy se sekundární aminoskupinou, jako jsou spermin a spermidin, mohou reagovat s kyselinou dusitou za vzniku N-nitrosaminů. Reakce probíhá podle schématu na obrázku 4. Jedná se především o produkty masné výroby, při jejichž výrobě byly použity dusitanové solící směsi. Někteří autoři poukazují též na nebezpečí spojené s výskytem polyaminů v tepelně opracovaných potravinách, kde může z putrescinu vznikat pyrrolidin a z kadaverinu piperidin. Tyto látky se mohou také měnit na karcinogenní N-nitrosaminy [32,33,45].

Obr. 4 Vznik N-nitrosaminů reakcí s HNO_2 [32]



V posledních letech je poukazováno na příznivé účinky polyaminů putrescinu, sperminu a spermidinu, neboť podporují růst, regeneraci a diferenciaci buněk. Polyaminy jsou studovány také v souvislosti s nádorovými onemocněními, protože se hromadí v nádorových

buňkách. Jsou tedy nezbytnou součástí všech živých buněk a uplatňují se v imunitním systému a funkci střev [13,33,45,54].

Tab. 3 Biogenní aminy, jejich prekurzory a biologický význam [21]

BIOGENNÍ AMIN	PŮVODNÍ AMINOKYSELINA	BIOLOGICKÝ VÝZNAM
histamin	histidin	lokální tkáňový hormon vliv na krevní tlak účast při anafylaktickém šoku a alergických reakcích
kadaverin	lysin	stabilizace nukleových kyselin stabilizace subcelulárních struktur (ribosomů) stimulace diferenciacce buněk rostlinný hormon
putrescin	arginin ornithin citrulin	stabilizace nukleových kyselin stabilizace subcelulárních struktur (ribosomů) stimulace diferenciacce buněk rostlinný hormon
agmatin	arginin	stabilizace nukleových kyselin stabilizace subcelulárních struktur (ribosomů) stimulace diferenciacce buněk rostlinný hormon
fenylethylamin	fenylalanin	prekurzor tyraminu, dopaminu, adrenalinu a noradrenalinu
tyramin	tyrosin	prekurzor dopaminu, adrenalinu a noradrenalinu lokální tkáňový hormon vliv na krevní tlak vliv na kontrakce hladkých svalů
dopamin	DOPA	mediátory sympatických nervů prekurzor adrenalinu a noradrenalinu
tryptamin	tryptofan	lokální tkáňový a rostlinný hormon vliv na krevní tlak vliv na peristaltiku střev vliv na psychiku

2 VYBRANÉ METODY STANOVENÍ BIOGENNÍCH AMINŮ

Biogenní aminy jsou organické sloučeniny odvozené od aminokyselin, které se běžně podílejí na metabolických procesech v živých tkáních a vykazují různé biologické účinky. Důvody pro sledování obsahu biogenních aminů jsou v zásadě dva. Prvním je toxicita těchto látek ve vyšších koncentracích, druhým je možnost využít obsahy BA k posuzování jakosti potravin i surovin [45].

Vznik některých biogenních aminů v potravinách není vždy provázen významnými senzoryckými změnami potravin nebo suroviny. To znamená, že takovéto poživatiny nelze na základě pouze senzoryckého posouzení bez analytického průkazu biogenních aminů, vyloučit z konzumace, což může mít za následek, v případě přítomnosti vyšší koncentrace těchto látek, potenciální ohrožení zdraví konzumentů. [51].

Ke stanovení biogenních aminů byla navržena řada analytických postupů a ty jsou obvykle vyvinuty přímo pro určitý typ materiálu, v němž mají být aminy sledovány. Díky heterogenitě vzorků a přítomnosti rušivých látek neexistuje jednotná analytická metoda vhodná pro jejich stanovení ve všech potravinách [9,57]. Vzorky potravin obsahují často směs BA, které je nutno nejprve rozdělit a poté teprve kvalifikovat [57]. Pro potravinářské účely se využívají, kromě metod selektivně vypracovaných pro aromatické aminy, postupy stanovující biogenní aminy jako celek. V minulosti často používaná tenkovrstevná chromatografie (TLC) je dnes spíše využívána k orientačním analýzám. Je jednoduchá, rychlá a nevyžaduje drahé technické vybavení [27,45,61]. Plynová chromatografie (GC) se při stanovení biogenních aminů výrazně neuplatnila, přestože lze některé techniky GC využít. V současnosti je nejpoužívanější technikou vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) s různou detekcí. Vybrané aminy lze v potravinách stanovovat také elektromigračními metodami, jako je kapilární elektroforéza (CE), či metodami enzymatickými a imunochemickými [2,51,57,58].

2.1 Chromatografické stanovení

Za jednu z nejvhodnějších metod pro stanovení biogenních aminů se považuje vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC). Výhodami této metody jsou citlivost, vysoké rozlišení a značná reprodukovatelnost [3,61]. Kromě této metody je používána ionexová

chromatografie (IEC), která využívá automatický analyzátor aminokyselin (AAA). Kromě aminů lze pak stanovit ve vzorcích současně i aminokyseliny [45,57].

Metoda HPLC se může různě modifikovat, např. na HPLC s reverzními fázemi (RP HPLC), kdy jsou fáze obráceny tak, že stacionární fáze je nepolární a mobilní fáze polární [61]. V posledních letech se začíná uplatňovat i ultra vysokoučinná kapalinová chromatografie (UHPLC) [62].

2.1.1 Derivatizace

Chromatografické metody se skládají ze dvou kroků. Nejprve je nutno aminy extrahovat z materiálu a extrakt přečistit. Poté následuje vlastní stanovení. Předúprava vzorku hraje rozhodující roli. Vzhledem k zásadité povaze aminů se často jejich extrakce ze vzorku provádí zředěnou kyselinou chloristou (HClO_4) nebo trichloroctovou ($\text{CCl}_3\text{-COOH}$). Velmi podrobný přehled úprav různých vzorků potravin a způsobů jejich extrakce popsali Moret a Conte (1996) [45,47,48].

Jelikož aminokyseliny a aminy, vzhledem k jejich struktuře a nepřítomnosti vhodného chromoforu v molekule, neabsorbují záření v UV/VIS oblasti spektra, není možné jejich stanovení bez derivatizace [45,60].

Derivatizace může probíhat před kolonou, na koloně, nebo za kolonou. Všechny možnosti mají vliv na eluční charakteristiky separovaných látek. U předkolonové derivatizace musí být derivát dostatečně stabilní. Reakce musí probíhat za mírných reakčních podmínek, kvantitativně, selektivně a bez vedlejších produktů. Případný přebytek derivatizačního činidla musí být odstraněn od produktů na koloně, protože má jiné fyzikálně-chemické vlastnosti. Nejrozšířenějším činidlem pro derivatizaci před kolonou je například dansylchlorid (5-dimethylaminonaftalen-1-sulfonylchlorid). Dansylaci lze s úspěchem použít takřka pro všechny typy materiálů [Nakazato, et al. 1994]. Z dalších činidel je možno jmenovat benzyolchlorid, isothiokyanát, fluorescein a další [45,60,62].

Postkolonové derivatizace nemusí probíhat kvantitativně, mohou být neselektivní a mohou u nich vznikat vedlejší produkty. Reakce ale musí probíhat rychle. Lze použít i vyšší hodnoty teploty a pH. [45,60,61]. U postkolonové derivatizace se využívá ninhydrin či o-phthalaldehyd [45,62]. Tento postup našel uplatnění např. u vzorků piva [Izquierdo-Pulido, et al. 1993], vína [Busto, et al. 1995] a masa [Hernandez-Jover, et al. 1996] [45].

2.1.2 Vlastní stanovení

Dansylderiváty lze po HPLC detekovat jak UV/VIS detektorem, tak v případě požadavku vyšší citlivosti také fluorimetricky [45].

2.1.2.1 Derivatizační činidla pro detekci v oblasti UV/VIS

V automatických analyzátoch aminokyselin se často používá činidlo ninhydrin, který poskytuje deriváty vhodné pro detekci v oblasti ultrafialového záření a viditelné oblasti spektra. Ninhydrin reaguje se dvěma molekulami aminu a vzniká tzv. Ruhemanův purpur s maximem absorpance při 570 nm. Reakce trvá 1-2 minuty při teplotě 100-130 °C za kolonou [63].

2.1.2.2 Derivatizační činidla pro fluorimetrickou detekci

Deriváty vhodné pro fluorimetrickou detekci musí mít fluorescenční vlastnosti. Nejběžnějším je dansylchlorid a jeho analogy. Dále je možno využít karbonylchloridů, isothiokyanátů, fluorescaminu a Schiffovy báze. Dansylchlorid (Dns-Cl) je derivatizační činidlo, vhodné pro předkolonovou derivatizaci. Reaguje v slabě alkalickém prostředí za vzniku barevných derivátů, které fluoreskují při 470-530 nm a lze detekovat spektrofotometricky při 254 nm. Ze Schiffových bází je to již dříve zmiňovaný o-phthalaldehyd [62,63,64].

2.2 Elektromigrační metody

V posledních letech se intenzivně rozvíjí elektromigrační technika - kapilární elektroforéza (CE) a její modifikace – kapilární zónová elektroforéza (CZE). Tyto metody jsou rychlé a vhodné pro separaci aminů ze složitějších vzorků. Analýza má vysokou citlivost při minimální spotřebě vzorku a činidel, protože k dělení látek dochází v úzké křemenné kapiláře [45,65] .

2.3 Imunochemické metody

Vybrané biogenní aminy lze v potravinách stanovovat také imuno-enzymatickými metodami. Nejznámější z nich je ELISA (Enzyme linked Immunosorbent Assay), která využívá imunochemické reakce antigenu a protilátky. Využívána je například při stanovení histaminu v sýrech. Všechny dříve uvedené metody spojuje zásadní problém. Jsou velmi

instrumentálně náročné a vyžadují kvalifikovanou obsluhu. V tomto směru mají velkou příležitost právě imuno-enzymatické metody, které se zatím zdají být nejlépe využitelné v praxi s využitím jednoduché selektivní elektrody či detekčního papírku. Detekce bude prováděna vizuálně srovnáním s referenčními barvami, nebo pomocí počítače [45,63,64].

3 VYBRANÉ MLÉČNÉ PRODUKTY FARMÁŘSKÉHO PŮVODU

3.1 Mléko jako surovina pro výrobu

3.1.1 Mléko a jeho chemické složení

Mléko je tekutina, která je produkována mléčnou žlázou samic všech savců. Mléko není určeno jen pro výživu mláďat, ale surové mléko (kravské, ovčí, kozí, buvolí, aj.) a mléčné výrobky tvoří už několik tisíciletí hlavní složku potravin člověka. Obsahuje hodnotné bílkoviny, lehce stravitelný tuk a celou řadu významných minerálních látek. Nachází se v něm esenciální aminokyseliny, vitaminy a stopové prvky nezbytné pro výživu, vývoj lidského organismu a normální funkci látkové výměny člověka. V současnosti je známo přes 200 druhů různých složek mléka [66,69].

Mléko je polydisperzní systém, tvořený vodou a pevnými složkami, jako jsou dusíkaté látky, tuk, sacharidy. Mléčný tuk je v mléce obsažen ve formě emulze, bílkoviny v koloidní disperzi. Sacharidy a většina minerálních látek, s výjimkou fosforečnanu vápenatého, tvoří pravý roztok [67].

Kravské mléko se skládá z:

- vody (obsah průměrně 87-88 %)
- sušiny (obsah průměrně 12-13 %), sušinu tvoří:
 - dusíkaté látky (2,8-3,6 %),
 - tuk (3,2-6 %),
 - sacharidy (4,5-5 %),
 - minerální látky, vitaminy, enzymy, hormony, plyny (stopově) [67].

Méně vody obsahuje ovčí mléko (79-82 %). Kozí mléko je tvořeno vodou průměrně z 86 %, čímž ho lze přirovnat k mléku kravskému [67,70].

Jednotlivé druhy mléka se mírně liší svým chemickým složením, což je znázorněno v tabulce 4 [68].

3.1.1.1 *Bílkoviny*

Bílkoviny mléka jsou z nutričního hlediska nejvýznamnější složkou mléka a dávají mu významnou biologickou hodnotu. Podmiňují také technologické vlastnosti mléka. Bílkoviny kravského mléka tvoří 95 % celkových dusíkatých látek v mléce. Zbývajících 5 % jsou nebílkovinné dusíkaté látky (močovina, volné AMK, amoniak, kreatin, aj.). Bílkoviny jsou složeny z kaseinu (α_{S1} , α_{S2} , β , κ -kasein) a syrovátkových bílkovin, mezi které patří α -laktalbumin, β -laktoglobulin, imunoglobuliny a bovinní sérový albumin. Vzhledem k tomu, že mléko skotu, ovcí a koz obsahuje více než 75 % kaseinů, jsou tato mléka nazývána kaseinová. Kaseiny jsou heterogenní skupina fosfoproteinů, které v mléce agregují do kaseinových micel o průměru 0,05-0,3 μm . Obsah micel v 1 ml mléka je přibližně 10^{12} . Kasein má význam při výrobě jogurtů, tvarohů a sýrů, kdy dochází k jeho srážení. Existují dva typy srážení. Kyselé srážení pomocí kyseliny mléčné, produkované BMK nebo přidané do mléka, při pH 4,6 a 20 °C (tzv. izoelektrický bod kaseinu). Nízká odolnost vůči záhřevu u syrovátkových bílkovin, které denaturují při 60-70 °C, způsobuje zvýšení viskozity a flokulace, díky vazbě denaturovaného β -laktoglobulinu s κ -kaseinem. Vysokomolekulární glykoproteiny imunoglobuliny mají význam zejména v mlezivu a slouží k podpoře imunity mláďate po porodu [67,68,70].

Bílkoviny kozího mléka se zastoupením jednotlivých kaseinových frakcí velmi podobají kravskému mléku. Podstatné rozdíly mezi kozím a kravským mlékem jsou v aminokyselinovém složení. V kozím mléce je vyšší obsah glycinu, kyseliny glutamové, threoninu, naopak méně argininu a sirných aminokyselin. Obsahuje též vyšší množství rozpustné formy kaseinu [67].

Celkové hrubé bílkoviny v ovčím mléce kolísají od 5,5-6,2 % a spolu s vysokým obsahem tuku a laktosy dávají ovčímu mléku vysoký obsah sušiny. Nejvíce jsou zastoupeny aminokyseliny kyselina glutamová, alanin, arginin, valin a serin [67].

3.1.1.2 *Mléčný tuk*

V syrovém mléce je tuk velmi kvalitativně a kvantitativně variabilní složkou [67]. Obsah tuku, který udává do značné míry energetickou hodnotu mléka, se pohybuje u kozího mléka okolo 4 %. U mléka ovčího je obsah tuku vyšší, pohybuje se mezi 7-10 %, což představuje přibližně dvojnásobek obsahu mléčného tuku v kravském mléce [71]. Z větší části je v mléce rozptýlen, emulgován ve formě kapiček o velikosti 0,1-12 μm . Z hlediska výživy

je mléčný tuk velmi dobře stravitelný. Složení mléčného tuku závisí na obsahu a zastoupení jednotlivých mastných kyselin. Nasycené MK v mléce převažují. Z nenasycených mastných kyselin jsou v malém množství zastoupeny také esenciální kyselina linolová a α -linolenová. Tuk je též nositelem chuti a ovlivňuje aroma mléka a mléčných výrobků [68,69]. Vyšší obsah mastných kyselin s nižším počtem uhlíků (kapronová, kaprylová, kaprinová) dává kozímu mléku specifickou vůni a chuť [67,68]. Také specifická vůně ovčího mléka je vyvolána kyselinou kaprylovou a kaprinovou [70].

3.1.1.3 *Sacharidy*

Laktosa, neboli mléčný cukr, je hlavním sacharidem přítomným v mléce. Koncentrace je v kozím mléce mírně nižší (4,3 g ve 100 g mléka) a v ovčím mírně vyšší (4,8 g ve 100 g mléka) než u mléka kravského (4,6 g ve 100 g) [69,72]. Laktosa má význam jako zdroj energie pro bakterie mléčného kvašení, které při fermentaci přeměňují laktosu na kyselinu mléčnou a další produkty závislé na druhu kvašení a použitých kulturách. Při tepelném ošetření mléka může laktosa reagovat s volnými aminoskupinami bílkovin a AMK za vzniku tzv. Maillardovy reakce, kdy dochází k změnám barvy a chuti [68]. Laktosa je v mléce rozpuštěna a podílí se na vytváření osmotického tlaku. Vyznačuje se nízkou sladivostí (ve srovnání se sacharózą odpovídá asi poměru 1:3,7) a dobrou stravitelností. Enzymem β -galaktosidasou se štěpí v tenkém střevě na glukosu a galaktosu [73].

Za pomoci chromatografických metod byly v mléce nalezeny i další sacharidy, často s navázanými aminoskupinami. Může se jednat se například N-acetyl-D-galaktosamin nebo N-acetyl-D-glukosamin, který je pravděpodobně významným růstovým faktorem pro bakterie rodu *Bifidobacterium* [68].

3.1.1.4 *Minerální látky a vitamíny*

Minerální látky jsou v mléce přítomny v různé formě. Jsou buď rozpuštěny, nebo se vyskytují koloidně vázané na organické složky mléka. Epitelové buňky mléčné žlázy jsou schopné minerální látky shromažďovat, avšak rozpustné soli přechází do mléka pravděpodobně přímo z krve. Obsah minerálních látek je významný nejen z nutričního hlediska, ale hraje roli i při regulaci acidobazické rovnováhy a udržování pH mléka. Mléko obsahuje vápník, hořčík, fosfor, draslík, sodík a mnoho dalších stopových prvků (zinek, křemík, železo, mangan, aj.) [67,72]. Celkový obsah minerálních látek v kravském mléce se pohybuje od

0,6 až 0,8 g na 100 ml mléka. V kozím mléce od 0,75 g až 0,83 g na 100 ml mléka. Ovčí mléko má obsah minerálních látek mírně vyšší [67,73].

Mléko je bohaté na vitaminy. Jedná se o exogenní esenciální biokatalyzátory. Jejich obsah je značně závislý na ročním období a výživě dojnice. Z vitaminů rozpustných ve vodě obsahuje vitaminy skupiny B, vitamín C. Z lipofilních vitaminů, vitaminy A, D, E, K [67,69,72].

Kozí mléko je bohatým zdrojem vitamínu A, obsahuje ho až o 47 % více než mléko kravské. Vitamin A ale existuje v kozím mléce výlučně jako vitamin A, nikoliv jako karoteny. Karotenové pigmenty, jako prekurzory vitamínu A, udělují mléku v různé intenzitě žluté zbarvení. Z tohoto důvodu je kozí mléko, sýr i máslo křídově bílé a podstatně bělejší než mléko kravské. Nejlepším zdrojem vitaminů je mléko ovčí [66,67,69].

3.1.1.5 Enzymy

Enzymy jsou bílkovinné makromolekuly plnící funkci biokatalyzátorů. Mléko obsahuje nativní enzymy z leukocytů a z mléčné žlázy. Čerstvé mléko obsahuje enzymů málo. Kromě nativních enzymů se v mléce mohou vyskytovat enzymy produkované mikroorganismy. Záhřevem mléka dochází k inaktivaci přítomných enzymů. Z nejvýznamnějších enzymů lze zmínit laktoperoxidasu, lipasy a proteasy. V mléce jsou v malém množství obsaženy také amylasy, katalasa a lysozym [67].

Tab.4 Chemické složení různých druhů mlék [68]

DRUH MLÉKA	VODA [%]	SUŠINA [%]	Z CELKOVÉ SUŠINY [%]			
			BÍLKOVINY	TUK	LAKTOSA	MINER. LÁTKY
kravské	86,5 - 87,5	12,5 - 13,5	2,8 - 3,6	3,2 - 6,0	4,5 - 5,0	0,8 - 1,1
kozí	84,8 - 88,8	11,2 - 15,2	3,6 - 3,8	3,8 - 4,2	4,2 - 4,6	0,7 - 0,9
ovčí	77,8 - 81,8	18,2 - 22,2	5,4 - 7,1	7,2 - 10,6	3,5 - 4,5	0,7 - 0,9
buvolí	70,1 - 77,1	22,9 - 29,9	14,6 - 16,3	7,7 - 8,1	4,5 - 4,9	0,7 - 0,9

3.1.2 Požadavky na mléko pro výrobu mléčných výrobků

Základem kvalitních mléčných výrobků je kvalitní surovina – mléko [71]. Mléko musí pocházet od zdravých, dobře krmených dojnic. Musí mít příznivé fyzikální, chemické a mikrobiologické vlastnosti, ale i specifické vlastnosti technologické. Jakost mléka není dána jen chemickým složením, jeho vlastnostmi, ale především mikrobiologickou a hygie-

nickou kvalitou mléka, danou celkovým počtem mikroorganismů, počtem somatických buněk a obsahem reziduí inhibičních látek [68].

Pro výrobu fermentovaných mléčných výrobků je vhodné pouze mléko výběrové jakosti. Nejvýznamnějším technologickým parametrem je dobrá kysací schopnost mléka, která je podmíněna nepřítomností reziduí inhibičních látek (ATB, dezinfekčních a čistících prostředků), které by mohly inhibovat činnost bakterií mléčného kvašení. Dobrá mikrobiologická jakost a nízký počet kontaminujících mikroorganismů (zejména psychrotrofních) jsou též rozhodující, neboť kontaminující mikroflóra může potlačit činnost citlivých BMK [67,74].

Při výrobě sýrů musí mléko kromě všeobecných požadavků splňovat také další technologické vlastnosti. Předpokladem pro výrobu je opět výborná mikrobiologická jakost surového mléka. Pro výrobu sýrů je zvláště důležité, aby mléko obsahovalo co nejmenší celkový počet mikroorganismů, dále minimum sporulujících, psychrotrofních lipolytických a proteolytických bakterií. Vyskytují-li se v syrovém mléce ve zvýšeném množství plynotvorné bakterie (čeledi *Enterobacteriaceae*), mohou v polotvrdých mladých sýrech fermentací laktosy na CO₂ a H₂ způsobovat časné duření. Sporulující bakterie, jako například *Clostridium tyrobutyricum*, způsobují u vysokodohříváných sýrů, s dobou zrání déle než 1 měsíc, pozdní duření. Pro eliminaci tohoto rizika se do mléka přidává maximálně 30 g dusičnanu draselného na 100 l mléka. [68,71,74,75].

Z dalších technologických vlastností pro výrobu sýrů lze uvést dobrou kysací schopnost a syřitelnost mléka. Jde o schopnost mléka srážet se syřidlem a vytvářet sýřeninu požadovaných vlastností. Tato vlastnost závisí na celé řadě faktorů, jako je pH mléka, obsah vápníku a jeho formy, obsah kaseinu a jeho frakce, stadium laktace a výživa dojnice. Syřitelnost ovlivňuje také chlazení a pasterace mléka [67,68,71,75]. Mléko by mělo mít také příznivý obsah bílkovin k obsahu tuku. Množství bílkovin v mléku má vliv na spotřebu mléka pro výrobu sýra, neboť čím více bílkovin mléko obsahuje, tím je spotřeba mléka na výrobu 1 kg sýra menší [75].

3.1.3 Získávání a zpracování mléka na farmách

Mléko se získává dojením, které probíhá nejčastěji dvakrát denně, a to ručně do konví nebo strojově dle chovatele. Není-li mléko zpracováno do 2 hodin po nadojení, je nutno ho vychladit na 4-8 °C při každodenním svozu, 4-6 °C při obdenním svozu. Zpracování mléka

na farmách je možností, jak dále zhodnotit svou produkci. Mléko a mléčné výrobky lze prodávat přímo konečnému spotřebiteli nebo v rámci vlastní maloobchodní činnosti. Přísné veterinární a hygienické předpisy mohou chovatele od faremního mléka odrazovat, a to i přes možnost čerpat na tuto činnost dotace [68,69]. Finalizace vlastní produkce je možná třemi způsoby:

1. Prodejem zpracovatelské mlékárně po předchozím schválení a registraci potravinářského podniku orgány veterinární správy;
2. Ošetřením mléka, jeho zpracováním na mléčné výrobky a následným prodejem výrobků přímo na statku nebo dodáním do tržní sítě za stanovených podmínek (například v rámci farmářských trhů);
3. Přímým prodejem syrového mléka (s výjimkou ovčího a kobyliho) v hospodářství konečnému spotřebiteli v malých množstvích (odpovídající denní spotřebě domácnosti spotřebitele). Podej je možný pouze se souhlasem KVS a splňuje-li mléko požadavky stanovené nařízeními EP a Rady (ES) č. 852/2004 a 853/2004 [68].

Farmy produkují buď syrové nebo tepelně ošetřené kravské, kozí nebo ovčí mléko, přičemž ovčí a kozí mléko určené k obchodování s členskými státy EU musí být v produkčním hospodářství tepelně ošetřeno. V ČR, respektive v Československu, byl prodej nepasterovaného mléka zakázán na počátku padesátých let. Důvodem bylo značné rozšíření tuberkulózy (TBC) a brucelózy, které se mlékem poměrně snadno přenáší, avšak správně provedená pasterace jejich původce spolehlivě ničí. Od roku 1999 je možné prodávat mléko přímo v místě získávání konečnému spotřebiteli za podmínek daných vyhláškou č. 289/2007 Sb., o veterinárních a hygienických požadavcích na živočišné produkty, které nejsou upraveny přímo použitelnými předpisy ES, v platném znění [68,76,77].

Nejčastěji vyráběnými mléčnými výrobky jsou kysané mléčné výrobky, tvarohy, máslo a sýry [68].

3.2 Sýry

3.2.1 Obecná charakteristika

Sýry jsou tradiční mléčné výrobky, vyrobené srážením mléčné bílkoviny z mléka působením syřidla nebo jiných koagulačních činidel, prokysáním a následným oddělením syrovátky. Člověk poznal sýry již před 8000 lety a staly se pro něj nepostradatelnou složkou potravy [74,78]. První písemné zmínky o výrobě sýrů v Čechách spadají do 10. století [79]. Velmi ceněný je nejen vysoký podíl bílkovin, ale i značný podíl vápníku, jehož množství se značně liší podle typu výrobku. Nelze opomenout i další stopové prvky a vitaminy, které sýry obsahují. Sýrařství dobře zhodnocuje mléko jako surovinu, bohatě rozšiřuje sortiment mléčných výrobků a chuťově obohacuje jídelníček člověka [72,74,78].

Důvodem proč se mléko začalo zpracovávat na sýry, je delší udržitelnost sýrů oproti mléku. Jako pozitivní lze brát i to, že jsou v nich zkoncentrovány nutričně významné složky mléka [74].

3.2.2 Technologie výroby sladkých sýrů

Sladké sýry se vyrábí z mléka srážením pomocí enzymů syřidla. Jde o tzv. sýření a vzniká sýřenina. Charakter sýřeniny je dán jakostí zpracovávaného mléka, jeho úpravou před sýřením, způsobem sýření a dalšími úpravami po sýření. Způsob výroby sýrů se často značně odlišuje v závislosti na zemi, oblasti i tradici. Pro výrobu je nezbytný správný výběr mléka, neboť jeho jakost ovlivňuje kvalitu a výtěžnost vyrobeného sýra [68,69,82].

3.2.2.1 *Tepelné ošetření mléka pro výrobu sýrů*

V současné době se k výrobě sýrů používá ve většině případů tepelně ošetřené mléko. Za určitých podmínek (daných vyhláškou č. 289/2007, Sb. a vyhláškou č. 128/2009, Sb.) lze mléko a z něj vyrobené výrobky prodávat konečnému spotřebiteli v místě výroby. Veterinární předpisy povolují vyrábět sýry ze syrového mléka, budou-li tyto sýry zrát déle než 2 měsíce. Výrobu mléčného výrobku z mlékárensky neošetřeného mléka je možno povolit v případě, že je tento technologický postup vyžadován v souvislosti s tvorbou charakteristických vlastností daného výrobku. V mlékárensky vyspělých zemích, např. ve Francii, je výroba sýrů z tepelně neošetřeného mléka více rozšířena [68,69,80].

Tepelné ošetření mléka musí zajistit jeho zdravotní nezávadnost (zničit podstatnou část technologicky nežádoucí mikroflóry mléka, včetně nativních a mikrobiálních enzymů). Současně nesmí způsobit minimální změny sérových bílkovin a rozpustných forem vápníku. Pro většinu sýrů se používá šetrná (krátkodobá) pasterace s pasterační teplotou 72 °C po dobu 15-20 s. Vyšší pasterační teploty se u mléka pro výrobu sýrů nepoužívají, neboť způsobují rozsáhlou denaturaci sérových bílkovin, které neodchází do syrovátky a naopak zůstávají v sýřenině. Tímto dochází ke zvyšování výtěžnosti, zvyšování vazby vody a současně ke snižování sušiny finálního produktu a jeho jakosti [68,79,82].

Vzhledem ke snaze o co nejšetrnější záhřev mléka, se například při výrobě ementálů v zahraničí zavádí krátkodobé tepelné ošetření na teplotu 68-70 °C. Nejlepších výsledků se z hlediska mikrobiologického dosahuje spojením termizace nebo šetrné pasterace s baktofugací mléka, při níž se ve speciální odstředivce zbavuje mléko převážné části mikroorganismů, včetně jejich spor [70,79].

3.2.2.2 *Standardizace mléka a jeho další úpravy*

Standardizací se upraví v mléce obsah tuku a tukuprosté sušiny na předepsané hodnoty. Pro snížení tučnosti se přidává odstředěné mléko, pro zvýšení tučnosti se naopak přidává vypočítané množství smetany. Zvýšení tukuprosté sušiny se provádí přidávkem sušeného odstředěného mléka [68,71].

Vlivem denního a sezónního kolísání obsahu rozpustného vápníku v mléce a jeho částečné přeměny při pasteračním záhřevu na vápník nerozpustný, je nutný přírůstek chloridu vápenatého. Technologická dávka CaCl_2 je závislá na způsobu tepelného ošetření mléka

a druhu vyráběného sýra a činí 10-40 ml nasyceného roztoku CaCl_2 /100 l zpracovávaného mléka. Vápenaté ionty ovlivňují průběh sekundární fáze srážení, kdy dochází při synerezi k propojování kaseinu „vápníkovými můstky“ s následným smršťováním sýřeniny za současného oddělování syrovátky. Nedostatek Ca^{2+} iontů se projevuje špatnými reologickými vlastnostmi sýřeniny a následně i problémy s uvolňováním syrovátky v dalších fázích výroby [79,80].

U některých druhů zrajících sýrů je nutno vyloučit případné duření přidavkem malého množství dusičnanu draselného. Kromě KNO_3 je možno použít i enzym lysozym, popř. baktofugační metody [72,76,79].

Do mléka jsou přidány čisté mlékárenské kultury bakterií mléčného kvašení ve formě zákysů. U tvrdých sýrů se uplatňují také sekundární kultury - bakterie *Lactobacillus helveticus* a *Lactobacillus casei*. Sýry ementálského typu jsou navíc zaočkovány bakteriemi propionového kvašení (*Propionibacterium freudereichii*), které vytváří kyselinu propionovou a vznikající oxid uhličitý vytváří typická oka. U plísňových sýrů se přidávají ušlechtilé plísňové kultury dle druhu sýra, např. *Penicillium camemberti* u sýrů s bílou plísní na povrchu a *Penicillium roqueforti* u sýrů s modrou plísní v těstě [69,79].

3.2.2.3 *Sýření mléka*

Mléko se upraví na požadovanou teplotu sýření a přidá se vypočtená dávka syřidla. Vločkování má nastat do 15 minut a celé sýření trvá 30 – 90 minut. Doba sýření a množství syřidla závisí na druhu vyráběného sýra [68]. Syřidla jsou proteolytické enzymy, které se vyznačují substrátovou specifitou vůči kaseinu. Klasické syřidlo je enzym chymosin získaný z žaludků sajících telat. Podle původu se syřidla dělí na živočišná (telecí chymosin, vepřový nebo kuřecí pepsin), rostlinná (výtažky ze šťáv některých rostlin - moruše, fíkovník) a mikrobiální, která se vyrábějí izolací enzymů z bakterií nebo plísní [80].

3.2.2.4 *Zpracování vzniklé sýřeniny*

Dalším krokem je zpracování sýřeniny zahrnující několik operací, jejichž cílem je podpořit synerezi, tj. smršťování a uvolňování syrovátky ze sýřeniny a vyrobit tak sýřeninu o požadované velikosti sýrového zrna, obsahu vody a vlastnostech. Dochází ke krájení sýřeniny haframi, míchání za vzniku sýrového zrna požadované velikosti. Velikost závisí na druhu sýra. Čerstvé sýry mají zrno největší, naopak tvrdé sýry velikosti hrášku i menší [68,76].

Polotvrdé a tvrdé sýry se zpracovávají na menší zrno a dohřívají se. Teplota se liší podle typu sýra. U nízkodohříváných sýrů, jako je Eidam, je teplota dohřívání 36-40 °C. Vysokodohřívané sýry, jako jsou Ementál a Parmezán, se dohřívají na vyšší teploty 48-56 °C. Dohřívání sýřeniny a současné praní zrna se provádí například u Eidamu, kdy dochází ke snížení obsahu laktosy a tím k regulaci dalšího prokysávání [68,76].

3.2.2.5 *Tvarování a solení sýrů*

Tvarování je proces, při kterém sýr dostává typický tvar a velikost. Vliv zde má jednak tradice, regionální zvyky, ale také podmínky technologie. Tyto operace zásadním způsobem ovlivňují konečné vlastnosti sýrů. Během tvarování dochází k uvolňování syrovátky, slepování zrn, vytváření pokožky. Pokračuje i prokysávání a přeměny biochemického charakteru. K tvarování se používají tvořítka s perforovaným pláštěm, vyrobená převážně z plastů nebo kovu. Pro rychlejší odtok syrovátky je možno využít lisování, které se využívá především u polotvrdých a tvrdých sýrů. Syrovátka u měkkých sýrů odkapává samovolně [67,80,83].

Solení sýrů má vliv na výslednou chuť sýra. Reguluje obsah vody v sýru a tím se podílí na osmoticko-difúzních procesech při odtoku syrovátky a zpevňuje povrch sýra. Sůl přispívá ke zlepšení stravitelnosti sýra. Sůl brzdí rozvoj nežádoucí mikroflóry v sýru a podílí se na jeho konzervaci. Obsah soli v sýrech je různý, pohybuje se od 0,5-8 %. Vysoký obsah soli mají sýry s plísní v těstě a sýry zrající v solném nálevu obsahují více než 6 % NaCl. U sýrů existují různé způsoby solení dle druhu sýra [68,76,80].

3.2.2.6 *Zrání sýrů*

Zrání představuje komplex změn, při kterých sýr získává výsledný vzhled, konzistenci, složení a osobitou chuť a vůni. Při zrání se uplatňují mikrobiální enzymy i enzymy použitého syřidla. Probíhá ve zracích sklepech či místnostech s odpovídajícími podmínkami, jako je teplota, vlhkost a cirkulace vzduchu. Doba a podmínky zrání velmi závisí na typu vyráběného sýra a jeho velikosti. Nejkratší dobu zrají čerstvé a měkké sýry. U tvrdých sýrů je doba zrání řádově několik týdnů až měsíců, u extra tvrdých sýrů až několik let [68,72,76,80].

3.2.3 Dělení sýrů

Sýry lze dělit podle celé řady nejrůznějších kritérií. Podle druhu mléka se sýry dělí na kravské, kozí, ovčí a sýry z mlék ostatních savců (buvolí, kobyli, apod.) [80].

Podle suroviny je možno sýry dělit na sýry přírodní, které jsou vyrobené z mléka, sýry tavené, které jsou vyrobené ze sýrů přírodních. Surovinou pro výrobu syrovátkových sýrů je syrovátka. Existují i výrobky nazývané analogy sýrů, ve kterých je mléčný tuk či mléčná bílkovina nahrazena rostlinným zdrojem. Pojem analogy sýrů však česká legislativa zatím neobsahuje [78,80].

Sýry lze dělit podle obsahu vody v tukuprosté sušině (resp. podle konzistence) na sýry měkké (více než 68,0 %), poloměkké (62,0-68,0 %), polotvrdé (55,0-61,9 %), tvrdé (47,0-54,9 %), extra tvrdé (nejvýše 47,0 %) [78,80].

Významným kritériem pro dělení sýrů je obsah tuku v sušině (t.v.s.), podle kterého se sýry dělí na vysokotučné (více než 60,0% t.v.s.), plnotučné (45,0-60,0 % t.v.s.), polotučné (25,0-45,0 % t.v.s.), nízkotučné (10,0-25 % t.v.s.), odtučněné (méně než 10,0 % t.v.s.) [78,80].

Podle způsobu srážení na se sýry dělí na tři skupiny – sladké, kyselé a sýry smíšené. U sladkých sýrů dochází ke koagulaci mléčné bílkoviny použitím syřidla živočišného, rostlinného nebo mikrobiálního původu. Syřidlo má schopnost definovaným způsobem štěpit peptidovou vazbu mezi 105.-106. aminokyselinou, fenylalaninem a methioninem, v κ -kaseinu. U kyselých sýrů je koagulace mléčné bílkoviny docíleno snížením pH na hodnotu izoelektrického bodu kaseinu kyselinou mléčnou. Kyselina mléčná vzniká rozkladem laktosy prostřednictvím mlékárenských kultur, nebo může být přímo přidána do mléka. U sýrů se smíšeným způsobem srážení se využívá kombinace sladkého a kyselého srážení [76].

Sýry je možno dělit také podle toho, zda se při jejich výrobě uplatňuje zrání či nikoliv. Nezrající (čerstvé) sýry nezrají, nebo jen velmi krátkou dobu do 24 hodin. Zrající sýry zrají různě dlouho podle druhu sýra a dochází u nich během zrání k dalším biochemickým a fyzikálním procesům [76,78,80].

3.3 Ostatní mléčné výrobky

3.3.1 Jogurty

Jogurty jsou celosvětově nejrozšířenější fermentované mléčné výrobky, které lze obecně dělit na přírodní (bílé) a ochucené. Mají různý obsah tuku a mohou mít různorodé příchuti [67,74]. Na typické vůni jogurtů se podílí řada sensorických látek vznikajících při mléčném kvašení, jako je kyselina mléčná a acetaldehyd. Výchozí surovinou pro výrobu jogurtů je pasterované standardizované mléko s požadovanou tučností nebo pasterované selské plnotučné mléko. Mléko se homogenizuje z důvodu porušení kaseinových micel, které se poté lépe srážejí [68,69]. Směs se předeheje na kultivační teplotu a přidá se termofilní jogurtová kultura, obsahující homofermentativní bakterie *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* a *Lactobacillus delbruecki* subsp. *bulgaricus* zpravidla v poměru 1:1. Fermentace probíhá buď ve fermentačních tancích, nebo přímo v obalech v termostatu, zejména u malovýrobců. Podle toho se rozlišují jogurty s pevným koagulátem a jogurty krémovité s rozmíchaným koagulátem. Po ukončení zrání se výrobky vychladí, případně ochucují a plní do spotřebitelských obalů [68,71,78].

3.3.2 Tvaroh

Tvarohy patří do skupiny „kyselých sýrů“, u nichž je podstatou srážení mléčných bílkovin změna pH způsobená rozkladem laktosy na kyselinu mléčnou. I když se při výrobě používá přídavek malého množství syřidla, je jeho význam při koagulaci jiný, než při výrobě sladkých sýrů [80]. Vyrábí se nejen z kravského, ale i z kozího či ovčího mléka. Tvaroh je, podobně jako i jiné mléčné výrobky, zdrojem kvalitních bílkovin, vápníku a dalších nutričně významných látek [82]. Podle výroby se rozlišují dvě základní skupiny tvarohů - měkké a tvrdé. Výroba zahrnuje tepelné ošetření mléka, úpravu tučnosti a kyselosti. Následuje přídavek smetanového zákysu, popřípadě vápenatých iontů ve formě CaCl_2 . Po předkysání se zasýří syřidlem. Srážení probíhá do druhého dne, tvarohovina se pokrájí, opatrně promíchá a přepustí do tvarožníků pro odkapání syrovátky. Poté se tvaroh vychladí a balí. Toto je tradiční výroba měkkého tvarohu [67,69,70]. Měkký tvaroh je možno vyrábět také odstředováním [67]. U výroby tvrdého a průmyslového tvarohu (suroviny pro další zpracování) se používá buď jednotepelný nebo dvoutepelný způsob výroby [80].

4 OVČÍ A KOZÍ SÝRY

Sýry lze vyrábět z nejrůznějších druhů mlék, jako je kravské, kozí, ovčí, velbloudí, buvolí, sobí, aj. V našich podmínkách se jedná výhradně o mléko kravské, které zpracovávají mlékárny velkoobjemově. Zejména v rámci faremního chovu koz a ovcí se stále více rozšiřuje i zpracování kozího a ovčího mléka. Výrobky jsou pak získávány a často i prodávány přímo na farmách nebo maloprodejnách. Produkce ovčího, kozího mléka a výrobků z nich je v rámci EU koncentrována do určitých produkčních zón v Řecku, Španělsku, Francii a Itálii [85,86]. V ČR má chov ovcí a koz tradici. Dnes je chov těchto zvířat na mléko velmi nízký a tím rovněž produkce těchto sýrů. Lze říci že je zaznamenáván mírný vzrůstající trend chovu těchto zvířat. Chovy jsou často součástí ekologického zemědělství a stáda těchto zvířat je možno vidět nejčastěji v horských oblastech [68]. Zcela jiná situace je na Slovensku, kde je chov ovcí značně rozšířen a ovčí sýry se vyrábějí nejen na farmách, ale i v mlékárenských závodech. Výroba sýrů, z jiného než kravského mléka, je více rozšířena v ostatních zemích Evropy i světa. Z mlék lze vyrábět i další mléčné výrobky, jako jsou jogurty, kefíry a máslo [86,72].

4.1 Ovčí sýry

Nejčastějšími výrobky z ovčího mléka jsou ovčí sýry, které se od sebe výrazně liší v závislosti na jednotlivých oblastech výroby. Z dalších výrobků se nejčastěji vyrábí ovčí smetana, šlehačka, máslo (speciální, farmaceutické), jogurt, kefír, žinčice, aj. Z nepasterovaného ovčího mléka se např. na Slovensku vyrábí tradiční Slovenská bryzna. Významné jsou také slovenské oštiepky, parenice a korbáčiky. V České republice se prodávají v rámci farmářských trhů zejména sýry čerstvé a sýry v solných nálevech či oleji a koření. Ovčí mléko je vhodné především pro výrobu plísňových sýrů, ale i pařených sýrů a fermentovaných jogurtových výrobků. Ve Francii se vyrábí tradiční Roquefort s ochrannou známkou AOC (Appellation d'Origine Controlée). V ČR se ovčí hrudkový sýr z nepasterovaného mléka může použít jen pro další zpracování. Řada ovčích sýrů se vyrábí z pasterovaného mléka. V Řecku se ovčí mléko s přídavkem kozího používá při výrobě sýra feta a jiných tradičních řeckých sýrů [85,86,72].

Nejznámější portugalský Serra da Estrela je vyráběn ze syrového ovčího mléka. Sýr je pojmenovaný podle nejvyšší portugalské hory Serra da Estrela a může být vyráběn pouze na farmách v oblasti Serra da Estrela za použití výtažku artyčoku ke srážení mléka [87].

4.2 Kozí sýry

Kozí mléko se využívá obdobně jako mléko ovčí, na výrobu tvarohu, jogurtů, másla a sýrů. Existují dva základní typy kozích sýrů, čerstvé a zrající [85]. Čerstvý sýr je krémový, roztíratelný, různě ochucený, např. bylinkami nebo zeleninou, lišící se podle země, ze které pochází. Největším producentem kozích sýrů je Francie, kde se vyrábí přibližně 400 druhů, dále jsou to Španělsko, Itálie, Švýcarsko nebo Nizozemsko [72,84]. Nejlepší mléko pro výrobu kozího sýru je jarní a letní, kdy součástí jídelníčku koz je tráva s horskými bylinami. Oblíbené jsou čerstvé sýry s bylinami, česnekem, pažitkou nebo jiným kořením, jako je pepř a paprika. Sýry se také mohou nakládat do směsi oleje, octa a česneku [83,84,86].

5 VYBRANÉ MASNÉ VÝROBKY FARMÁŘSKÉHO PŮVODU

5.1 Charakteristika a suroviny pro výrobu masných výrobků

Masná výroba zpracovává maso na masné výrobky žádoucích organoleptických vlastností a potřebné údržnosti. Složení masných výrobků je velmi různorodé a liší se v závislosti na druhu výrobku, jeho kvalitě, ceně a trvanlivosti [88]. Masný výrobek je technologicky opracovaný výrobek, který obsahuje jako převažující složku maso různého původu. Dalšími přísadami jsou koření, pitná voda, sůl, škrob a mouka. Často jsou přidávány také různé aditivní látky, jako jsou konzervační činidla, aromatické látky a dusitanové solící směsi pro stabilizaci typické růžové barvy. Obsah vody 26-70 %, obsah bílkovin 13-23 % a obsah tuku 9-57 % se liší podle druhu masného výrobku [32]. Sůl se přidává v množství 1,5-7 %. U výrobků s obsahem NaCl vyšším než 2,5 % musí být obsah vyznačen na obale. Sortiment masných výrobků se v ČR i ostatních zemích Evropy vyvíjel celá staletí v závislosti na surovinových zdrojích, vývoji technologických postupů, ale i oblíbenosti spotřebitelů a rozvoji mezinárodního obchodu [89,90].

5.2 Dělení masných výrobků

Masné výrobky se dělí na:

- drobné masné výrobky - párky, klobásy,
- měkké salámy - tyčové (např. šunkový salám) a točené (např. kabanos),
- kusové masné výrobky - uzená masa a šunky,
- trvanlivé masné výrobky - tepelně opracované (působením teploty 70 °C po dobu minimálně 10 minut ve všech částech, např. salám Vysočina), nebo tepelně neopracované fermentované (salám Poličan, Herkules),
- vařené masné výrobky - tlačanky, jitrnice,
- pečené masné výrobky - sekaná pečeně,
- masné konzervy a polokonzervy,
- masné polotovary,
- krajové masné výrobky typické pro danou oblast [88].

5.3 Fermentované masné výrobky

Trvanlivé fermentované masné výrobky jsou tepelně neopracované určené k přímé spotřebě. Zrají za použití starterových kultur, které vytváří kyselinu mléčnou a tím dochází v průběhu fermentace ke snižování pH [88,32]. Současně vznikají další produkty, které udělují výrobkům charakteristický vzhled, chuť a vůni. Starterovými mikroorganismy mohou být jak bakterie (*Lactobacillus plantarum*, *Pediococcus pentosaceus*, *Staphylococcus carnosus*), tak i kvasinky (*Kocuria varians*) či plísně (*Penicillium chrysogenum*). Druhy mikroorganismů, které jsou nejčastěji využívány pro výrobu masných výrobků, znázorňuje tabulka 5. Po zrání následuje proces sušení za definovaných podmínek, popřípadě i uzení, čímž dochází ke snížení obsahu vody na hodnoty vodní aktivity $a_w = 0,93$. Nejznámějšími fermentovanými masnými výrobky jsou salámy (Poličan, Herkules, Paprikáš, Dunajská klobása a Lovecký salám) [32,48].

Tab. 5 Mikroorganismy využívané pro výrobu masných výrobků [89]

DRUH MIKROORGANISMU	FUNKCE VE VÝROBKU	VLIV NA MASNÝ VÝROBEK
<i>Lactobacillus plantarum</i> <i>Pediococcus pentosaceus</i>	tvorba kyselin	konzervace, zpevnění, urychlení vybarvení
<i>Pediococcus acidilactici</i>	tvorba kyselin, tvorba bakteriocinu	konzervace, tvorba aroma
<i>Kocuria varians</i>	redukce NO_3^- , rozklad H_2O_2	konzervace, tvorba aroma, vybarvení
<i>Staphylococcus carnosus</i>	snížení redoxního potenciálu	stabilizace barvy a chuti
<i>Staphylococcus xylosus</i>	rozklad tuku	inhibice nežádoucí mikroflóry
<i>Debaryomyces hansenii</i>	rozklad tuku, snížení redoxního potenciálu	tvorba aroma, stabilizace barvy
<i>Candida famata</i>	iniciace redukce NO_3^-	tvorba aroma, stabilizace barvy
<i>Streptococcus griseus</i>	tvorba aroma	tvorba aroma
<i>Penicillium nalgiovense</i> <i>Penicillium chrysogenum</i>	růst na povrchu jako ochrana proti nežádoucím plísním, rozklad tuku	potlačení vlivu O_2 a nežádoucí mikroflóry, tvorba aroma

II. PRAKTICKÁ ČÁST

6 CÍLE PRÁCE

Cílem diplomové práce bylo stanovení obsahu biogenních aminů ve vybraných produktech živočišného původu, které byly získány z farmářské produkce na území České republiky a Slovenska. Současně provést mikrobiologické vyšetření vzorků fermentovaných farmářských výrobků na mikroorganismy, které mohou poskytnout informace o kvalitě výsledného produktu, hygienických standardech při výrobě, ale mohou být také potenciálními producenty biogenních aminů v těchto výrobcích.

V teoretické části bylo nutno pro dosažení vytýčených cílů:

- zpracovat problematiku týkající se biogenních aminů, jejich vlastností, vzniku a možností jejich stanovení v potravinách,
- charakterizovat tvorbu biogenních aminů a přehled mikroorganismů, u kterých je předpoklad produkce biogenních aminů,
- popsat stručně technologii výroby vybraných fermentovaných mléčných a masných výrobků.

Cílem praktické části práce bylo:

- získat vzorky farmářských produktů živočišného původu,
- detekovat množství vyprodukovaných biogenních aminů v jednotlivých vzorcích,
- vzorky mikrobiologicky vyšetřit,
- na základě teoretické části a vyhodnocených výsledků praktické části formulovat závěry a doporučení.

7 MATERIÁL A METODIKA

7.1 Popis vzorků použitých k analýze

V praktické části diplomové práce bylo provedeno stanovení obsahu biogenních aminů ve vybraných fermentovaných farmářských produktech živočišného původu. Následně byly mikrobiologickou kultivací stanoveny počty vybraných mikroorganismů v jednotlivých vzorcích. Vzorky byly získány od maloproducentů farmářského charakteru z České republiky a Slovenska. Často se jedná o krajové výrobky, které byly zakoupeny na farmářských trzích, maloprodejnách a nebo přímo v místě výroby na jednotlivých farmách. Ke stanovení bylo celkem použito 65 vzorků fermentovaných mléčných a fermentovaných masných výrobků. Mléčné výrobky zahrnovaly 57 vzorků a fermentované masné výrobky 8 vzorků. Vzorky byly rozděleny do 8 skupin A až H, které jsou uvedeny v tabulce 6. Výrobky byly uchovávány při chladírenských teplotách 4-8 °C a použity k analýze přibližně v polovině doby minimální trvanlivosti, resp. doby použitelnosti.

Tab. 6 Rozdělení vzorků do skupin A-H

SKUPINA FARMÁŘSKÝCH VÝROBKŮ	NÁZEV SKUPINY	POČET VZORKŮ	OZNAČENÍ VZORKŮ	PŮVOD VZORKŮ
A	Brynzy a sýry z nepasterovaného ovčího mléka	9	A1	SK
			A2	SK
			A3	SK
			A4	SK
			A5	SK
			A6	SK
			A7	ČR
			A8	ČR
			A9	ČR
B	Sýry a tvarohy z pasterovaného ovčího mléka	9	B1	SK
			B2	SK
			B3	SK
			B4	SK
			B5	SK
			B6	ČR
			B7	ČR
			B8	ČR
			B9	SK
C	Sýry z nepaster. kozího mléka	1	C1	ČR

Tab. 6 Rozdělení vzorků do skupin A-H (pokračování)

SKUPINA FARMÁŘSKÝCH VÝROBKŮ	NÁZEV SKUPINY	POČET VZORKŮ	OZNAČENÍ VZORKŮ	PŮVOD VZORKŮ
D	Sýry z pasterovaného koziho mléka	12	D1	SK
			D2	SK
			D3	SK
			D4	ČR
			D5	ČR
			D6	ČR
			D7	ČR
			D8	ČR
			D9	ČR
			D10	ČR
			D11	ČR
			D12	ČR
E	Čerstvé sýry a tvarohy z pasterovaného kravského mléka	9	E1	ČR
			E2	ČR
			E3	ČR
			E4	ČR
			E5	ČR
			E6	ČR
			E7	ČR
			E8	ČR
			E9	ČR
F	Zrající sýry z pasterovaného kravského mléka	15	F1	SK
			F2	SK
			F3	SK
			F4	SK
			F5	ČR
			F6	SK
			F7	SK
			F8	SK
			F9	SK
			F10	SK
			F11	SK
			F12	SK
			F13	ČR
			F14	ČR
			F15	ČR

Tab. 6 Rozdělení vzorků do skupin A-H (pokračování)

SKUPINA FARMÁŘSKÝCH VÝROBKŮ	NÁZEV SKUPINY	POČET VZORKŮ	OZNAČENÍ VZORKŮ	PŮVOD VZORKŮ
G	Jogurty a zákysy z pasterovaného kravského mléka	2	G1	ČR
			G2	ČR
H	Trvanlivé fermentované masné výrobky	8	H1	ČR
			H2	ČR
			H3	ČR
			H4	ČR
			H5	ČR
			H6	ČR
			H7	ČR
			H8	ČR

7.2 Stanovení obsahu biogenních aminů

7.2.1 Přístroje a pomůcky

Lyofilizátor ALPHA 1-4 LSC, Christ

Hlubokomrazicí box MDF-U3286S Sanyo

Automatické mikropipety Biohit

Analytické váhy A&D GH-200 EC

Odstředivka EBA 21 (Hettich Zentrifugen, Německo)

Laboratorní třepačka LT2

Vortex Heidolph Reax

Laboratorní sklo (odměrné baňky 25 ml, derivatizační nádoby, filtrační nálevky) a plasty

Zařízení pro deionizaci vody

7.2.2 Chemikálie

kyselina chloristá ($c = 0,6 \text{ mol.l}^{-1}$)

1,7-heptandiamin ($c = 500 \text{ mg.l}^{-1}$)

roztok dansylchloridu v acetonu ($c = 5 \text{ g.l}^{-1}$)

7.2.3 Izolace a chromatografické stanovení biogenních aminů

Všechny odebrané vzorky byly po odběru lyofilizovány (Christ Alpha 1–4) a lyofilizovaná hmota udržována do okamžiku analýzy při $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$. Trojnásobná extrakce BA byla provedena použitím $0.6\text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ kyseliny chloristé. Každý vzorek byl extrahován dvakrát. Obsah 8 biogenních aminů (tryptaminu, fenylethylaminu, putrescinu, kadaverinu, histaminu, tyraminu, spermidinu a sperminu) byl stanoven metodou kapalinové chromatografie (LabAlliance a Agilent Technologies) po předchozí derivatizaci dansylchloridem. Dansylchlorid a standardy biogenních aminů byly získány ze Sigma-Aldrich, USA. Okyselená směs filtrována a filtrát podroben derivatizaci podle Dadáková et al. (2009). Každý extrakt byl třikrát derivatizován. Derivatizované vzorky byly filtrovány ($0,22\mu\text{m}$) a aplikovány na sloupec (Cogent column HPS C18, $150 \times 4,6\text{ mm}$, $5\ \mu\text{m}$, Cogent, Eatontown, USA) chromatografického systému (pumpa a autosampler LabAlliance, State College, USA); degasser, UV/VIS-DAD detektor ($\lambda = 254\text{ nm}$) a sloupcový termostat (Agilent Technologies, Agilent, Paolo Alto, USA). Podmínky pro separaci a detekci BA jsou popsány Smělá et al. (2004). Jako vnitřní standard byl použit 1,7-heptandiamin (Sigma-Aldrich, St Louis, USA). Výsledky byly přepočteny na čerstvou hmotu a vyjádřeny pomocí jako průměr \pm směrodatná odchylka.

7.3 Mikrobiologické stanovení významných mikroorganismů

7.3.1 Zařízení a pomůcky

Autokláv Varioklav

Laboratorní předvážky Kern

Homogenizátor Stomacher

Automatické mikropipety Biohit (různého objemu)

Vortex Heidolph Reax

Termostat (teplota $30\text{ }^{\circ}\text{C}$, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$)

Chladnička Electrolux

Termostat s atmosférou CO_2 (10 %)

Laboratorní sklo, plasty a základní laboratorní pomůcky

7.3.2 Kultivační půdy a jiné roztoky

Na mikrobiologické stanovení vybraných mikroorganismů (MO) ve vzorcích byly použity kultivační půdy uvedené v tabulce 7 - Plate Count Agar (PCA), Endův agar (EA), agar M17, MRS agar, Slanetz-Bartley agar a CHYGA. Příslušné navážky jednotlivých půd byly rozpuštěny v daném množství destilované vody a po sterilizaci v autoklávu při 121 °C po dobu 15 minut rozlity na Petriho misky (objem cca 20 ml na miskou).

Tab. 7 Kultivační půdy a typ stanovovaného mikroorganismu

TYP KULTIVAČNÍ PŮDY	STANOVOVANÝ MIKROORGANISMUS
PCA (Plate Count Agar)	celkový počet MO (CPM)
Endův agar (EA)	čeleď <i>Enterobacteriaceae</i>
M17 agar	laktokoky
MRS agar (dle DeMana, Rogosiho a Sharpeho)	laktobacily
Slanetz-Bartley agar (SB)	enterokoky
CHYGA (CH)	kvasinky a plísně

Složení kultivačních půd

PCA

Enzymatický hydrolyzát kaseinu	5,00 g
Kvasničný extrakt	2,50 g
Glukosa	1,00 g
Agar	15,00 g
Voda	1000,00 ml

Navážka půdy 23,50 g rozpuštěna ve 1000 ml destilované vody. Půda byla sterilizována v autoklávu při teplotě 121 °C po dobu 30 minut. Odpipetované množství inokula na Petriho miskách bylo přelito půdou.

Endův agar

Peptic digest of animal tissue	10,00 g
Lactosa	10,00 g
Dipotassium phosphate	3,50 g
Sodium sulphite	2,50 g

Basic fuchsin0,50 g

Agar 15,00 g

Voda 1000,00 ml

Navážka půdy 41,50 g rozpuštěna ve 1000 ml destilované vody. Půda byla sterilizována v autoklávu při teplotě 121 °C po dobu 30 minut. Odpipetované množství inokula na Petriho miskách bylo přelito půdou.

M17 agar

Tryptosa..... 5,00 g

Soya peptone 5,00 g

Meat digest5,00 g

Magnesium sulphate 0,25 g

Di-sodium-glycerophosphate 19,00 g

Agar 15,00 g

Lactosa 5,00 g

Voda1000,00 ml

Navážka půdy 34,25 g, 15 g agaru a 5 g laktosy rozpuštěno ve 1000 ml destilované vody. Půda byla sterilizována v autoklávu při teplotě 121 °C po dobu 30 minut. Půda byla rozlita na Petriho misky.

MRS agar (dle DeMana, Rogosiho a Sharpeho)

Masový pepton 10,00 g

Hovězí extrakt 10,00 g

Kvasničný extrakt 5,00 g

Dextrosa 20,00 g

Polysorbát 80 1,00 g

Citran amonný 2,00 g

Octan sodný 5,00 g

Heptahydrát síranu hořečnatého	0,10 g
Tetrahydrát síranu manganatého	0,05 g
Hydrogenfosforečnan (di)draselný	2,00 g
Agar	15,00 g
Voda	1000,00 ml

Navážka půdy 70,15 g rozpuštěna ve 1000 ml destilované vody. Půda byla sterilizována v autoklávu při teplotě 121 °C po dobu 30 minut. Půda byla rozlita na Petriho misky.

Slanetz-Bartley agar

Tryptosa	20,00 g
Kvasničný extrakt	5,00 g
Dextrosa	2,00 g
Hydrogenuhlíčan (di)draselný	4,00 g
Azid sodný	0,40 g
Trifenyltetraazolium chlorid	0,10 g
Agar	15,00 g
Voda	1000,00 ml

Navážka půdy 46,50 g rozpuštěna ve 1000 ml destilované vody. Půda byla sterilizována v autoklávu při teplotě 121 °C po dobu 30 minut. Půda byla rozlita na Petriho misky.

CHYGA

Dextrosa	20,00 g
Kvasničný extrakt	5,00 g
Chloramfenikol	0,10 g
Agar	14,90 g
Voda	1000,00 ml

Navážka půdy 40,00 g rozpuštěna ve 1000 ml destilované vody. Půda byla sterilizována v autoklávu při teplotě 121 °C po dobu 30 minut. Půda byla rozlita na Petriho misky.

Fyziologický roztok (0,85 % vodný roztok NaCl)

Chlorid sodný (NaCl) 8,50 g

Voda 1000,00 ml

Navážka chloridu sodného 8,50 g rozpuštěna ve 1000 ml destilované vody a fyziologický roztok sterilizován v autoklávu při teplotě 121 °C po dobu 30 minut.

7.3.3 Příprava vzorků a metodika jednotlivých stanovení

Odběry vzorků jednotlivých farmářských výrobků byly prováděny za použití sterilních nástrojů. Z každého vzorku bylo naváženo do polyethylenového sáčku množství v rozmezí 3 až 4 g. K navážce byl přidán 9 násobek sterilního fyziologického roztoku. Obsah sáčku byl důkladně homogenizován ve Stomacheru a označen jako ředění 10^{-1} . Ze suspenze byla vytvořena řada desítkového ředění až do ředění 10^{-5} . Stejným způsobem byly naředěny všechny vzorky. Podmínky úpravy vzorků a přípravy výchozí suspenze a desítkového ředění jsou dány normou ČSN EN ISO 6887-1, která je českou verzí evropské normy EN ISO 6887-1:1999. Počet misek pro jednotlivé vzorky, půdy a ředění je znázorněn v tabulce 8.

Tab. 8 Počet misek jednotlivých ředění pro konkrétní vzorky

TYP PŮDY	PCA		EA		M17		MRS		SB		CH	
POUŽITÉ ŘEDĚNÍ / POČET MISEK			10^{-1}	1x					10^{-1}	1x	10^{-1}	2x
			10^{-2}	1x	10^{-2}	1x			10^{-2}	2x	10^{-2}	1x
	10^{-3}	1x	10^{-3}	1x	10^{-3}	1x	10^{-3}	1x	10^{-3}	1x	10^{-3}	1x
	10^{-4}	2x	10^{-4}	1x	10^{-4}	2x	10^{-4}	1x	10^{-4}	1x	10^{-4}	1x
	10^{-5}	1x			10^{-5}	1x	10^{-5}	2x				
	10^{-6}	1x					10^{-6}	1x				

Do Petriho misky s příslušnou půdou bylo asepticky naočkováno mikropipetou 0,1 ml vzorku příslušného ředění. Inokulát byl rozetřen sterilní hokejkou po celém povrchu půdy. Naočkované plotny byly vloženy do termostatu dnem vzhůru, aby se zabránilo případnému stékání zkondenzované vody na povrch živné půdy. Kultivace v termostatu trvala 48 hodin při teplotě vhodné podle druhu mikroorganismu (viz. tabulka 9).

Tab.9 Inkubační podmínky pro jednotlivé kultivační půdy

TYP PŮDY	TEPLOTA, POPŘ. JINÉ RŮSTOVÉ PODMÍNKY
PCA	30 °C
EA	30 °C
M17	30 °C
MRS	37 °C, atmosféra s 10 % CO ₂
SB	37 °C
CH	20 °C

7.3.4 Stanovované skupiny mikroorganismů

7.3.4.1 Stanovení celkového počtu mikroorganismů

Celkový počet mikroorganismů jsou aerobní a fakultativně anaerobní mikroorganismy (bakterie, kvasinky a plísně) tvořící počitatelné kolonie, které vyrostly za podmínek metody (v termostatu při teplotě 30 °C). Tato skupina se nejvíce přibližuje absolutnímu celkovému počtu a nejlépe vystihuje stupeň mikrobiálního znečištění daného substrátu. Rozborem se nestanoví termofilní MO, psychrotrofní MO, striktní anaeroby, kultivačně náročné druhy a některé kvasinky a plísně. CPM poskytuje základní informace o stupni mikrobiální kontaminace. Z výsledků lze usuzovat na úroveň technologie a dodržování hygienických pravidel při výrobě, přepravě a skladování. Metoda stanovení nezachycuje počet všech aktivních buněk, ale pouze počet buněk tzv. kolonie tvořící jednotky. Celkový počet mikroorganismů byl stanoven kultivací na živné půdě Plate Count agar v termostatu při teplotě 30 °C ± 1 °C 72 hodin.

7.3.4.2 Stanovení enterobakterií

Rodově i druhově početná čeleď *Enterobacteriaceae* zahrnuje gramnegativní, fakultativně anaerobní bakterie tvaru tyčinek. Do čeledi *Enterobacteriaceae* patří bakterie, které tvoří na selektivně diagnostických půdách (např. Endův agar, Violet Red Bile Agar) charakteristické kolonie. Fermentují glukosu, mají negativní oxidázovou reakci a jsou kultivačně poměrně nenáročné. Laktosapozitivní zástupci enterobakterií (*Escherichia*) fermentují laktosu a tvoří na půdě červené kolonie, popř. s kovovým leskem. Neštěpí-li bakterie laktosu (*Proteus*, *Salmonella*), zůstávají kolonie světlé s nezměněným odstínem půdy. Kultivace pro stanovení enterobakterií byla provedena při 37 °C ± 1 °C na Endově půdě, která obsa-

huje laktosu a červené barvivo fuchsin, které slouží k potlačení grampozitivních bakterií a které funguje pro důkaz aldehydů vznikajících štěpením laktosy. Průkaz a počty bakterií čeledi *Enterobacteriaceae* se stanovuje na základě ISO 21528-1 a ISO 21528-2.

7.3.4.3 Stanovení laktokoků

Pro stanovení počtu mléčných laktokoků použitých při výrobě fermentovaných výrobků k mléčnému kvašení byla použita půda M17. Kultivace byla provedena v termostatu při 30 °C ± 1 °C.

7.3.4.4 Stanovení laktobacilů

Pro stanovení laktobacilů byla použita půda MRS (podle DeMana, Rogosiho a Sharpeho). Kultivace byla provedena v termostatu při 37 °C ± 1 °C a v atmosféře obsahující 10 % CO₂. Stanovení bakterií rodu *Lactobacillus* v potravinách se řídí ČSN ISO 15 211:2000.

7.3.4.5 Stanovení enterokoků

Zástupci rodu *Enterococcus* sp. jsou grampozitivní koky vyskytující se jednotlivě, v párech nebo krátkých řetězcích, fakultativně anaerobní. Rostou i v prostředí s koncentrací 6,5 % soli či 40 % žluči. Hydrolyzují eskulin. Stanovení bakterií bylo provedeno na selektivně diagnostické půdě Slanetz-Bartley agar, která potlačuje růst jiných mikroorganismů a na které rostou enterokoky v charakteristicky zbarvených koloniích typické morfologie. Kultivace byla provedena v termostatu při 37 °C ± 1 °C. Enterokoky vytvářejí na půdě podle Slanetz-Bartleyové kolonie 1 až 2 mm v průměru, hnědočerveně až růžově zbarvené, zpravidla okrouhlé, hladké a lesklé. SB médium se používá ke stanovení intestinálních enterokoků podle ČSN EN ISO 7899-2.

7.3.4.6 Stanovení kvasinek a plísní

Pro stanovení kvasinek a plísní byla použita selektivní půda CHYGA (Chloramphenicol Yeast Glucose Agar) obsahující širokospektré bakteriostatické antibiotikum chloramfenikol. Kultivace byla provedena při 20 °C (běžné laboratorní teplotě). Při stanovení počtu kvasinek a plísní se postupuje na základě ČSN ISO 6611.

7.3.5 Odečítání výsledků

Po příslušné době kultivace byly spočítány kolonie, které na miskách vyrostly. Pro výpočet byly použity plotny obsahující 30 až 300 CFU ve dvou po sobě jdoucích ředěních. Počty mikroorganismů byly vypočítány z následujících vztahů:

$$N = \frac{c}{V \cdot d}$$

kde: N počet mikroorganismů [CFU.ml⁻¹; CFU.g⁻¹]

c počet kolonií na misce použitých pro výpočet

V objem inokula (pipetovaného vzorku) očkovaného na každou plotnu [ml]

d ředící faktor odpovídající ředění prvnímu použitému pro výpočet

$$N = \frac{\sum c}{V \cdot (n_1 + 0,1n_2) \cdot d}$$

kde: N počet mikroorganismů [CFU.ml⁻¹; CFU.g⁻¹]

$\sum c$ součet všech kolonií na všech plotnách použitých pro výpočet

V objem inokula (pipetovaného vzorku) očkovaného na každou plotnu [ml]

n₁ počet ploten prvního ředění použitého pro výpočet

n₂ počet ploten druhého ředění použitého pro výpočet

d ředící faktor odpovídající ředění prvnímu použitému pro výpočet

8 VÝSLEDKY A DISKUZE

8.1 Výsledky analýzy biogenních aminů

V následujícím textu budou popsány zjištěné obsahy biogenních aminů dle naměřených údajů v jednotlivých vzorcích farmářských produktů živočišného původu. Vzorky byly rozděleny a hodnoceny v 8 skupinách (A - H). Naměřené hodnoty obsahu biogenních aminů jsou uvedeny v $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ v jednotlivých tabulkách. Ve vzorcích bylo stanovováno 8 biogenních aminů - tryptamin, fenylethylamin, putrescin, kadaverin, histamin, tyramin, spermidin a spermin. Každá tabulka uvádí průměrné hodnoty naměřených obsahů biogenních aminů a jejich směrodatnou odchylku v zápisu průměr \pm směrodatná odchylka. Průměr hodnot je vypočten u každého vzorku z 6 naměřených hodnot. Tabulky celkového obsahu biogenních aminů u vzorků jsou získány součtem jednotlivých biogenních aminů, které byly u vzorků detekovány. Údaj ND znamená, že daný biogenní amin nebyl u vzorku detekován.

8.1.1 Obsah biogenních aminů ve vzorcích skupiny A

První skupina vzorků s označením A obsahovala 9 vzorků (A1 - A9) fermentovaných mléčných výrobků z nepasterovaného ovčího mléka. Z toho 4 vzorky brynz (A1, A2, A6, A7) z nepasterovaného ovčího mléka a 5 vzorků sýrů (A3, A4, A5, A8, A9) z nepasterovaného ovčího mléka. 6 vzorků (A1 - A6) z celkových 9 vzorků byly slovenského původu (Žilinský a Trenčinský kraj) a 3 vzorky (A7 - A9) získány od českého malo-producenta z Olomouckého kraje.

Obsah jednotlivých biogenních aminů u vzorků skupiny A je uveden v tabulkách 10 a 11. Celkový obsah biogenních aminů je shrnut v tabulce 12.

Tab.10 Obsah tryptaminu, fenylethylaminu, putrescinu a kadaverinu ve fermentovaných mléčných výrobcích z nepasterovaného ovčího mléka (skupina A, vzorky A1 - A9)

Vzorky skupiny A	Množství jednotlivých biogenních aminů [mg.kg ⁻¹]			
	Tryptamin	Fenylethylamin	Putrescin	Kadaverin
A1	ND*	ND*	ND*	42,59±3,64
A2	ND*	ND*	ND*	ND*
A3	ND*	ND*	41,55±3,47	80,67±6,70
A4	ND*	ND*	ND*	ND*
A5	ND*	ND*	99,87±7,97	62,58±2,65
A6	ND*	ND*	60,88±2,33	25,02±1,54
A7	ND*	ND*	22,11±1,22	16,52±0,16
A8	ND*	ND*	20,71±1,31	19,58±1,40
A9	ND*	ND*	ND*	16,22±1,03

*ND ... nebyl detekován

Tab.11 Obsah histaminu, tyraminu, spermidinu a sperminu ve fermentovaných mléčných výrobcích z nepasterovaného ovčího mléka (skupina A, vzorky A1 - A9)

Vzorky skupiny A	Množství jednotlivých biogenních aminů [mg.kg ⁻¹]			
	Histamin	Tyramin	Spermidin	Spermin
A1	ND*	107,36±6,51	ND*	ND*
A2	ND*	74,59±5,73	ND*	ND*
A3	ND*	38,26±2,34	ND*	ND*
A4	ND*	ND*	ND*	ND*
A5	ND*	14,62±1,24	ND*	ND*
A6	24,23±1,09	102,40±7,24	ND*	9,70±0,78
A7	ND*	34,60±0,77	ND*	ND*
A8	ND*	ND*	ND*	ND*
A9	ND*	8,87±0,67	ND*	ND*

*ND ... nebyl detekován

Biogenní amin tryptamin, fenylethylamin a spermidin nebyl stanoven v žádném vzorku této skupiny. Putrescin byl detekován u vzorků A3, A5, A6, A7 a A8, přičemž nejvyšší koncentrace putrescinu 99,87±7,97 mg.kg⁻¹ byla zjištěna u vzorku uzeného ovčího sýra (A5). Kadaverin byl detekován u všech vzorků s výjimkou vzorku brynzy A2 a vzorku sýra A4. Vysoké koncentrace kadaverinu byly zjištěny u vzorku A3 80,67±6,70 mg.kg⁻¹ a vzorku A5 62,58±2,65 mg.kg⁻¹. Vzorek ovčího sýra A4 neobsahoval žádné biogenní aminy, které byly stanovovány. U vzorku A6 byl stanoven biogenní amin histamin v koncentraci 24,23±1,09 mg.kg⁻¹. Tyramin byl detekován u všech vzorků s výjimkou vzorků sýrů A4 a A8. Vysoká koncentrace tyraminu 107,36±6,51 mg.kg⁻¹ byla zjištěna u vzorku ovčí bryn-

zy (A1), což je nejvyšší detekované množství tyraminu u vzorků skupiny A. Vysoký obsah tyraminu byl zjištěn u dalšího vzorku ovčí brynzý (A6), a to množství $102,40 \pm 7,24$ mg.kg^{-1} . Spermidin nebyl detekován v žádném vzorku této skupiny. Spermin byl stanoven pouze ve vzorku ovčí brynzý A6 a jeho obsah činil $9,70 \pm 0,78$ mg.kg^{-1} . Vzorek ovčí brynzý (A6) obsahoval 5 různých biogenních aminů – putrescin, kadaverin, histamin, tyramin a spermin.

Tab. 12 Celkový obsah biogenních aminů ve vzorcích skupiny A

Vzorky skupiny A	Celkový obsah biogenních aminů ve vzorku [mg.kg^{-1}]
A1	149,95
A2	74,59
A3	160,48
A4	ND*
A5	177,07
A6	222,23
A7	73,23
A8	40,29
A9	25,09

*ND ... nebyl detekován

V tabulce 12 je uveden celkový obsah biogenních aminů u jednotlivých vzorků skupiny A. Celkový obsah BA nad 100 mg.kg^{-1} byl detekován u vzorků A1, A3, A5 a A6, přičemž nejvyšší množství biogenních aminů, $222,23 \text{ mg.kg}^{-1}$, bylo stanoveno u vzorku ovčí brynzý pocházející ze Slovenska.

8.1.2 Obsah biogenních aminů ve vzorcích skupiny B

Druhá skupina vzorků s označením B obsahovala 9 vzorků (B1 - B9) fermentovaných mléčných výrobků z pasterovaného ovčího mléka. Z toho 8 vzorků sýrů (B1, B2, B3, B4, B5, B7, B8, B9) z pasterovaného ovčího mléka a 1 vzorek tvarohu (B6) z pasterovaného ovčího mléka. 6 vzorků sýrů (B1, B2, B3, B4, B5, B9) z celkových 8 vzorků sýrů byly slovenského původu (Žilinský a Trenčinský kraj). Tři vzorky (B6, B7, B8) pocházely z České republiky. Jednalo se o vzorek tvarohu (B5) z Olomouckého kraje a 2 vzorky sýrů (B7, B8) také z Olomouckého kraje.

Obsah jednotlivých biogenních aminů u vzorků skupiny B je uveden v tabulkách 13 a 14.

Tab.13 Obsah tryptaminu, fenylethylaminu, putrescinu a kadaverinu ve fermentovaných mléčných výrobcích z pasterovaného ovčího mléka (skupina B, vzorky B1 - B9)

Vzorky skupiny B	Množství jednotlivých biogenních aminů [mg.kg ⁻¹]			
	Tryptamin	Fenylethylamin	Putrescin	Kadaverin
B1	ND*	ND*	55,32±4,38	35,75±2,99
B2	ND*	ND*	ND*	ND*
B3	ND*	ND*	ND*	ND*
B4	ND*	ND*	229,48±20,01	125,64±2,97
B5	ND*	ND*	ND*	ND*
B6	ND*	ND*	ND*	ND*
B7	ND*	ND*	118,21±10,14	11,37±0,86
B8	ND*	ND*	ND*	108,83±6,99
B9	ND*	ND*	ND*	ND*

*ND ... nebyl detekován

Tab.14 Obsah histaminu, tyraminu, spermidinu a sperminu ve fermentovaných mléčných výrobcích z pasterovaného ovčího mléka (skupina B, vzorky B1 - B9)

Vzorky skupiny B	Množství jednotlivých biogenních aminů [mg.kg ⁻¹]			
	Histamin	Tyramin	Spermidin	Spermin
B1	ND*	10,25±1,15	ND*	ND*
B2	ND*	ND*	ND*	ND*
B3	ND*	ND*	ND*	13,16±1,10
B4	37,78±0,81	174,64±3,27	ND*	ND*
B5	ND*	23,15±2,35	ND*	14,01±1,11
B6	ND*	ND*	ND*	ND*
B7	ND*	11,13±0,27	ND*	ND*
B8	ND*	114,70±8,00	ND*	ND*
B9	ND*	ND*	ND*	ND*

*ND ... nebyl detekován

Biogenní amin tryptamin, fenylethylamin nebyl stanoven v žádném vzorku této skupiny. Putrescin byl detekován u vzorků B1, B4 a B7. Velmi vysoká koncentrace 229,48±20,01 mg.kg⁻¹ u vzorku sýra B4 a 118,21±10,14 mg.kg⁻¹ u vzorku sýra B7. Biogenní amin kadaverin byl detekován u čtyř vzorků sýrů B1, B4, B7 a B8. Vysoký obsah kadaverinu 125,64±2,97 mg.kg⁻¹ byl zjištěn u vzorku sýra B4 a 108,83±6,99 mg.kg⁻¹ kadaverinu u vzorku sýra B8. Histamin byl detekován pouze u vzorku sýra B4 a to v množství 37,78±0,81 mg.kg⁻¹. Tyramin byl stanoven u vzorků B1, B4, B5, B7 a B8, přičemž vysokou koncentraci tyraminu 174,64±3,27 mg.kg⁻¹ obsahoval vzorek sýra B4 a 114,70±8,00 mg.kg⁻¹ vzorek sýra B8. Spermidin nebyl detekován v žádném vzorku této skupiny.

Spermin byl stanoven u dvou vzorků B3 a B5 v nízkých koncentracích. U vzorků sýrů B2, B9 a ani u vzorku tvarohu B6 nebyl detekován žádný ze stanovovaných biogenních aminů.

Tab.15 Celkový obsah biogenních aminů ve vzorcích skupiny B

Vzorky skupiny B	Celkový obsah biogenních aminů ve vzorku [mg.kg ⁻¹]
B1	101,32
B2	ND*
B3	13,16
B4	567,54
B5	37,16
B6	ND*
B7	140,71
B8	223,53
B9	ND*

*ND ... nebyl detekován

Celkový obsah biogenních aminů ve vzorcích skupiny B je uveden v tabulce 15. Celkový obsah BA nad 100 mg.kg⁻¹ byl zjištěn u vzorků B1, B4, B7 a B8. U vzorku sýra B4 byl zjištěn celkový obsah biogenních aminů 567,54 mg.kg⁻¹, což lze považovat za obsah velmi vysoký.

8.1.3 Obsah biogenních aminů ve vzorcích skupiny C

Třetí skupina vzorků označení C obsahovala 1 vzorek sýra (C1) z nepasterovaného kozího mléka. Jednalo se o sýr zrající na dubovém dřevě, který byl získán od českého maloproducenta ze Zlínského kraje.

U vzorku zrajícího sýra C1 z nepasterovaného kozího mléka byly detekovány biogenní aminy kadaverin (149,03±7,26 mg.kg⁻¹) a tyramin (207,09±7,53 mg.kg⁻¹), přičemž koncentrace obou aminů byly vysoké. Obsah kadaverinu a obsah tyraminu. Biogenní aminy tryptamin, fenylethylamin, putrescin, histamin, spermidin a spermin nebyly detekovány.

Celkový obsah biogenních aminů u C1 činí 356,12 mg.kg⁻¹.

8.1.4 Obsah biogenních aminů ve vzorcích skupiny D

Čtvrtá skupina vzorků pod označením D obsahovala 12 vzorků (D1 - D12) sýrů z pasterovaného kozího mléka. 9 vzorků sýrů (D4 - D12) z celkových 12 vzorků sýrů byly českého původu. Z toho 6 vzorků sýrů (D7 - D12) od maloproducenta z kraje Vysočina,

2 vzorky sýrů (D4, D5) od maloproducenta z Olomouckého a 1 vzorek sýra (D6) od maloproducenta z kraje Zlínského. Tři vzorky (D1 - D3) pocházely ze Slovenska od dvou maloproducentů z Žilinského kraje. Vzorky D1 a D3 byly uzené výrobky.

Obsah biogenních aminů u vzorků skupiny D je uveden v tabulkách 16 a 17.

Tab. 16 Obsah tryptaminu, fenylethylaminu, putrescinu a kadaverinu v sýrech z pasterovaného kozího mléka (skupina D, vzorek D1 - D12)

Vzorky skupiny D	Množství jednotlivých biogenních aminů [mg.kg ⁻¹]			
	Tryptamin	Fenylethylamin	Putrescin	Kadaverin
D1	ND*	ND*	ND*	ND*
D2	ND*	ND*	41,13±3,27	40,29±2,47
D3	ND*	ND*	ND*	ND*
D4	ND*	ND*	ND*	ND*
D5	ND*	ND*	ND*	ND*
D6	ND*	ND*	ND*	ND*
D7	ND*	ND*	ND*	ND*
D8	ND*	ND*	ND*	ND*
D9	ND*	ND*	ND*	ND*
D10	ND*	ND*	ND*	ND*
D11	ND*	ND*	ND*	ND*
D12	ND*	ND*	ND*	ND*

*ND ... nebyl detekován

Tab. 17 Obsah histaminu, tyraminu, spermidinu a sperminu v sýrech z pasterovaného kozího mléka (skupina D, vzorek D1 - D12)

Vzorky skupiny D	Množství jednotlivých biogenních aminů [mg.kg ⁻¹]			
	Histamin	Tyramin	Spermidin	Spermin
D1	ND*	ND*	ND*	ND*
D2	ND*	8,48±0,55	ND*	ND*
D3	ND*	ND*	ND*	ND*
D4	ND*	11,29±1,03	ND*	ND*
D5	ND*	10,66±0,53	ND*	ND*
D6	ND*	ND*	ND*	ND*
D7	ND*	ND*	ND*	ND*
D8	ND*	ND*	ND*	ND*
D9	ND*	ND*	ND*	ND*
D10	ND*	ND*	ND*	ND*
D11	ND*	ND*	ND*	ND*
D12	ND*	ND*	32,73±2,86	ND*

*ND ... nebyl detekován

Biogenní aminy tryptamin, fenylethylamin, histamin nebyly stanoveny v žádném vzorku této skupiny. Putrescin byl detekován pouze u vzorku sýra D2 v koncentraci $41,13 \pm 3,27 \text{ mg.kg}^{-1}$. Ve vzorku D2 byl současně stanoven i kadaverin v koncentraci $40,29 \pm 2,47 \text{ mg.kg}^{-1}$ a tyramin, jehož obsah činil $8,48 \pm 0,55 \text{ mg.kg}^{-1}$. Nízké koncentrace tyraminu byly zaznamenány též u vzorků čerstvých sýrů D4 a D5. Spermidin byl stanoven pouze u vzorku sýru D12 a to v množství $32,73 \pm 2,86 \text{ mg.kg}^{-1}$. Spermin nebyl detekován v žádném vzorku této skupiny.

Tab.18 Celkový obsah biogenních aminů ve vzorcích skupiny D

Vzorky skupiny D	Celkový obsah biogenních aminů ve vzorku [mg.kg^{-1}]
D1	ND*
D2	89,90
D3	ND*
D4	11,29
D5	10,66
D6	ND*
D7	ND*
D8	ND*
D9	ND*
D10	ND*
D11	ND*
D12	32,73

*ND ... nebyl detekován

Celkový obsah biogenních aminů ve vzorcích skupiny D je uveden v tabulce 18. Vzorky sýrů obsahovaly celkově nízké koncentrace biogenních aminů. U vzorku sýra D2 byl zjištěn celkový obsah BA $89,90 \text{ mg.kg}^{-1}$. Vzorky D1, D3, D6, D7, D8, D9, D10 a D11 byly bez přítomnosti biogenních aminů, které byly stanovovány.

8.1.5 Obsah biogenních aminů ve vzorcích skupiny E

Pátá skupina vzorků s označením E obsahovala 9 vzorků (E1 - E9) fermentovaných mléčných výrobků z pasterovaného kravského mléka, z toho 8 vzorků čerstvých sýrů (E1 - E8) a 1 vzorek tvarohu (E9). Všechny vzorky byly českého původu. Šest vzorků bylo získáno od jednoho maloproducenta z Olomouckého kraje. Jednalo se o 5 vzorků sýrů (E1 - E5) a 1 vzorek tvarohu (E9). Tři vzorky (E6 - E8) byly zakoupeny od jiného maloproducenta také z Olomouckého kraje.

Obsah biogenních aminů u vzorků skupiny E je uveden v tabulkách 19 a 20.

Tab.19 Obsah tryptaminu, fenylethylaminu, putrescinu a kadaverinu ve fermentovaných mléčných výrobcích z pasterovaného kravského mléka (skupina E, vzorek E1 - E9)

Vzorky skupiny E	Množství jednotlivých biogenních aminů [mg.kg ⁻¹]			
	Tryptamin	Fenylethylamin	Putrescin	Kadaverin
E1	ND*	ND*	ND*	ND*
E2	ND*	ND*	ND*	ND*
E3	ND*	ND*	ND*	ND*
E4	ND*	ND*	111,37±8,59	21,73±1,94
E5	ND*	ND*	ND*	22,38±2,09
E6	ND*	ND*	ND*	8,90±0,57
E7	ND*	ND*	ND*	6,97±0,32
E8	ND*	ND*	ND*	19,54±0,76
E9	ND*	ND*	ND*	ND*

*ND ... nebyl detekován

Tab.20 Obsah histaminu, tyraminu, spermidinu a sperminu ve fermentovaných mléčných výrobcích z pasterovaného kravského mléka (skupina E, vzorek E1 - E9)

Vzorky skupiny E	Množství jednotlivých biogenních aminů [mg.kg ⁻¹]			
	Histamin	Tyramin	Spermidin	Spermin
E1	ND*	8,32±0,46	ND*	17,93±1,08
E2	ND*	7,20±0,45	ND*	15,46±1,18
E3	ND*	7,97±0,35	ND*	11,85±0,41
E4	ND*	15,20±0,51	ND*	13,59±0,61
E5	ND*	22,72±1,90	ND*	ND*
E6	ND*	ND*	ND*	11,38±0,71
E7	ND*	ND*	ND*	12,46±0,77
E8	ND*	ND*	ND*	19,44±1,96
E9	ND*	ND*	ND*	ND*

*ND ... nebyl detekován

Biogenní amin tryptamin, fenylethylamin nebyl stanoven v žádném vzorku této skupiny. Putrescin byl detekován pouze u jednoho vzorku čerstvého sýra E4 v koncentraci 111,37±8,59 mg.kg⁻¹. Vzorky E4, E5, E6 E7 a E8 obsahovaly nízké množství kadaverinu. Histamin neobsahoval žádný vzorek v této skupině. Biogenní amin tyramin byl stanoven u vzorků E1 až E5, přičemž nejvyšší detekované množství tyraminu bylo 22,72±1,90 mg.kg⁻¹ u vzorku E5. Spermidin nebyl stanoven v žádném vzorku této skupiny. Spermin obsahovaly všechny vzorky s výjimkou vzorků E5 a E9. Jediný vzorek tvarohu E9 neobsahoval žádný z detekovaných biogenních aminů.

Tab. 21 Celkový obsah biogenních aminů ve vzorcích skupiny E

Vzorky skupiny E	Celkový obsah biogenních aminů ve vzorku [mg.kg ⁻¹]
E1	26,25
E2	22,66
E3	19,82
E4	161,89
E5	45,10
E6	20,28
E7	19,43
E8	38,98
E9	ND*

*ND ... nebyl detekován

V tabulce 21 je uveden celkový obsah biogenních aminů u jednotlivých vzorků skupiny E. Celkový obsah BA nad 100 mg.kg⁻¹ byl detekován pouze u vzorku čerstvého sýra E4, a to 161,89 mg.kg⁻¹. Vzorek tvarohu E9 byl bez přítomnosti biogenních aminů, které byly sledovány.

8.1.6 Obsah biogenních aminů ve vzorcích skupiny F

Šestá skupina vzorků s označení F obsahovala 15 vzorků (F1 - F15) zrajících sýrů z pasterovaného kravského mléka. Vzorky F1 - F11 byly sýry pařené, z toho vzorky F2, F4 a F7 byly po paření navíc uzeny. Vzorky F1 - F11 kromě vzorku F5 pocházely ze Slovenska (Žilinský a Trenčínský kraj), vzorek F5 byl získán od maloproducenta z Olomouckého kraje. Vzorek F12 byl tvrdý sýr ementálského typu od slovenské maloproducenta z Trenčínského kraje. Vzorky F13 - F14 byly polotvrdé sýry od českého maloproducenta z Olomouckého kraje. Vzorek F13 byl zrající sýr a vzorek F14 byl sýr uzený. Vzorek F15 byl polotvrdom bio sýr od českého maloproducenta ze Zlínského kraje.

Obsah biogenních aminů u vzorků skupiny F je uveden v tabulkách 22 a 23.

Tab. 22 Obsah tryptaminu, fenylethylaminu, putrescinu a kadaverinu ve zrajících sýrech z pasterovaného kravského mléka (skupina F, vzorek F1 - F15)

Vzorky skupiny F	Množství jednotlivých biogenních aminů [mg.kg ⁻¹]			
	Tryptamin	Fenylethylamin	Putrescin	Kadaverin
F1	ND*	ND*	ND*	ND*
F2	ND*	ND*	ND*	ND*
F3	ND*	ND*	ND*	ND*
F4	ND*	ND*	ND*	ND*
F5	ND*	ND*	ND*	ND*
F6	ND*	ND*	37,25±1,05	ND*
F7	ND*	ND*	ND*	10,74±0,92
F8	ND*	ND*	ND*	ND*
F9	ND*	ND*	ND*	ND*
F10	ND*	ND*	12,21±0,83	ND*
F11	ND*	ND*	14,66±1,29	ND*
F12	ND*	ND*	ND*	11,76±0,81
F13	ND*	ND*	70,08±3,43	25,67±2,34
F14	ND*	ND*	48,80±4,52	72,59±4,41
F15	ND*	ND*	ND*	ND*

*ND ... nebyl detekován

Tab. 23 Obsah histaminu, tyraminu, spermidinu a sperminu ve zrajících sýrech z pasterovaného kravského mléka (skupina F, vzorek F1 - F15)

Vzorky skupiny F	Množství jednotlivých biogenních aminů [mg.kg ⁻¹]			
	Histamin	Tyramin	Spermidin	Spermin
F1	19,27±0,56	ND*	ND*	ND*
F2	18,31±0,57	ND*	ND*	ND*
F3	ND*	ND*	ND*	ND*
F4	ND*	ND*	ND*	9,24±0,42
F5	ND*	25,80±1,45	ND*	ND*
F6	ND*	ND*	ND*	12,69±0,83
F7	18,75±1,55	ND*	ND*	9,79±0,83
F8	ND*	ND*	ND*	7,08±0,37
F9	ND*	ND*	ND*	12,03±0,88
F10	ND*	ND*	ND*	10,92±0,56
F11	ND*	ND*	ND*	10,98±0,26
F12	ND*	63,75±4,48	ND*	97,90±8,62
F13	ND*	104,43±4,95	ND*	11,52±1,00
F14	ND*	ND*	ND*	16,55±1,55
F15	ND*	ND*	ND*	ND*

*ND ... nebyl detekován

Biogenní amin tryptamin, fenylethylamin nebyl stanoven v žádném vzorku této skupiny. Putrescin byl stanoven u vzorku F6, F10, F11, F13 a F14. Nejvyšší koncentrace putrescinu byla zjištěna u vzorku polotvrdého uzeného sýra F13 a činila $70,08 \pm 3,43 \text{ mg.kg}^{-1}$. Přítomnost kadaverinu byla zjištěna u vzorků sýrů F7, F12, F13 a F14. Nejvyšší detekované množství kadaverinu bylo $72,59 \pm 4,41 \text{ mg.kg}^{-1}$ u vzorku sýra F14. Vzorky F1, F2 a F7 obsahovaly histamin. U vzorků sýrů F1 a F2 byl histamin jediným stanoveným biogenním aminem. Tyramin byl detekován u vzorků F5, F12 a F13, přičemž u vzorku F13 byl obsah tyraminu $104,43 \pm 4,95 \text{ mg.kg}^{-1}$. Spermidin nebyl detekován z žádného vzorku této skupiny. Spermin byl stanoven v nízkých koncentracích u vzorků F4, F6, F7, F8, F9, F10, F11, F13, F14. Nejvyšší detekované množství sperminu u vzorků skupiny F bylo $97,90 \pm 8,62 \text{ mg.kg}^{-1}$. Vzorky sýrů F3 a F15 byly bez přítomnosti biogenních aminů, které byly sledovány.

Tab. 24 Celkový obsah biogenních aminů ve vzorcích skupiny F

Vzorky skupiny F	Celkový obsah biogenních aminů ve vzorku [mg.kg^{-1}]
F1	19,27
F2	18,31
F3	ND*
F4	9,24
F5	25,80
F6	74,50
F7	39,28
F8	7,08
F9	12,03
F10	23,13
F11	25,64
F12	173,41
F13	211,70
F14	137,94
F15	ND*

*ND ... nebyl detekován

V tabulce 24 je uveden celkový obsah biogenních aminů u jednotlivých vzorků skupiny F. Celkový obsah BA nad 100 mg.kg^{-1} byl detekován u vzorků F12, F13 a F14. Nejvyšší celkový obsah biogenních aminů byl stanoven u vzorku polotvrdého zrajícího sýra F13, který činil $211,70 \text{ mg.kg}^{-1}$. Vyšší obsah biogenních aminů byl zaznamenán též u vzorku tvrdého sýra ementálského typu, a to $173,41 \text{ mg.kg}^{-1}$ a u vzorku polotvrdého uzeného sýra F14 v množství $137,94 \text{ mg.kg}^{-1}$.

8.1.7 Obsah biogenních aminů ve vzorcích skupiny G

Sedmá skupina vzorků s označení G obsahovala 2 vzorky (G1 - G2) českého původu. Vzorek G1 byl bílý smetanový jogurt z farmy ležící ve Zlínském kraji. Vzorek G2 byl zákys získaný od maloproducenta z Olomouckého kraje.

U vzorku zákysu G2 skupiny G byla stanovena pouze nízká koncentrace sperminu $4,03 \pm 0,08 \text{ mg.kg}^{-1}$. U vzorku jogurtu G1 nebyl zjištěn spermin, ani žádný jiný biogenní amin. Biogenní aminy tryptamin, fenylethylamin, putrescin, kadaverin, histamin, tyramin a spermidin nebyly detekovány u žádného vzorku této skupiny.

8.1.8 Obsah biogenních aminů ve vzorcích skupiny H

Osmá skupina vzorků s označení H obsahovala 8 vzorků (H1 - H8) fermentovaných masných výrobků. Všechny vzorky pocházely z České republiky. Vzorky H1, H2 a H7 pocházely od maloproducenta ze Zlínského kraje, H3 a H4 od maloproducenta z Olomouckého kraje. Vzorky H5 a H6 byly získány od maloproducenta z Prahy. Vzorek H8 od maloproducenta z Jihomoravského kraje. Vzorky H1, H2 obsahovaly vepřové a skopové maso. Vzorek H5 byl fermentovaný masný výrobek z kančího masa a vzorek H6 fermentovaný masný výrobek z bažantího masa. Ostatní vzorky skupiny byly masné výrobky vyrobené z vepřového masa.

Obsah biogenních aminů u vzorků skupiny H je uveden v tabulkách 25 a 26.

Tab.25 Obsah tryptaminu, fenylethylaminu, putrescinu a kadaverinu ve fermentovaných masných výrobcích (skupina H, vzorek H1 - H8)

Vzorky skupiny H	Množství jednotlivých biogenních aminů [mg.kg^{-1}]			
	Tryptamin	Fenylethylamin	Putrescin	Kadaverin
H1	ND*	ND*	ND*	ND*
H2	ND*	ND*	ND*	ND*
H3	ND*	ND*	ND*	ND*
H4	ND*	ND*	ND*	ND*
H5	ND*	ND*	$402,38 \pm 11,55$	$97,21 \pm 6,31$
H6	ND*	ND*	$306,86 \pm 20,59$	$279,32 \pm 16,56$
H7	ND*	ND*	$329,25 \pm 23,92$	$129,39 \pm 10,99$
H8	ND*	ND*	$115,60 \pm 5,81$	ND*

*ND ... nebyl detekován

Tab. 26 Obsah histaminu, tyraminu, spermidinu a sperminu ve fermentovaných masných výrobcích (skupina H, vzorek H1 - H8)

Vzorky skupiny H	Množství jednotlivých biogenních aminů [mg.kg ⁻¹]			
	Histamin	Tyramin	Spermidin	Spermin
H1	ND*	84,06±4,21	ND*	ND*
H2	ND*	113,13±3,90	ND*	ND*
H3	ND*	ND*	ND*	ND*
H4	ND*	ND*	ND*	ND*
H5	ND*	190,87±4,01	ND*	ND*
H6	ND*	174,52±15,23	ND*	ND*
H7	131,61±5,27	140,47±5,98	ND*	ND*
H8	39,94±1,62	81,35±2,13	ND*	ND*

*ND ... nebyl detekován

Biogenní amin tryptamin, fenylethylamin nebyl stanoven v žádném vzorku této skupiny. Vzorky H5 až H8 obsahovaly putrescin v koncentracích nad 100 mg.kg⁻¹. Nejvyšší detekované množství putrescinu 402,38±11,55 mg.kg⁻¹ bylo stanoveno u vzorku H5. U vzorků H5 až H7 byl současně detekován také kadaverin, přičemž nejvyšší koncentrace byla zjištěna u vzorku H6 a činila 279,32±16,56 mg.kg⁻¹. Histamin byl stanoven u vzorků H7 a H8. Vzorek H7 obsahoval histaminu 131,61±5,27 mg.kg⁻¹. Tyramin byl detekován u všech vzorků s výjimkou vzorku H3 a H4. Spermidin a spermin nebyly detekovány u žádného vzorku této skupiny.

Tab.27 Celkový obsah biogenních aminů ve vzorcích skupiny H

Vzorky skupiny H	Celkový obsah biogenních aminů ve vzorku [mg.kg ⁻¹]
H1	84,06
H2	113,13
H3	ND*
H4	ND*
H5	690,46
H6	760,70
H7	730,72
H8	236,89

*ND ... nebyl detekován

Celkový obsah biogenních aminů ve vzorcích skupiny H je uveden v tabulce 27. U vzorků skupiny H byly celkově detekovány nejvyšší koncentrace biogenních aminů. Velmi vysoké obsahy BA byly zjištěny u vzorků H5, H6, H7. Nejvíce biogenních aminů obsahoval

vzorek H6 a to 760,70 mg.kg⁻¹. U vzorků H3 a H4 nebyly detekovány žádné biogenní aminy, které byly sledovány.

8.2 Stanovení počtu mikroorganismů

V této části práce budou vyhodnoceny počty mikroorganismů přítomných v jednotlivých vzorcích. Vzorky byly rozděleny do skupin A – H, a tak i vyhodnocovány. Výsledky počtu mikroorganismů jsou vypočítány podle vzorců uvedených v podkapitole 7.2.5 a zpracovány do tabulek. Hodnoty jsou v tabulkách uvedeny v CFU.g⁻¹. Ve vzorcích byly stanovovány na příslušných živných půdách celkové počty mikroorganismů (CPM), počty bakterií čeledi *Enterobacteriaceae* a počty laktokoků a laktobacilů. Dále byla zjišťována přítomnost enterokoků, kvasinek a plísní. Mezi bakterie, které mohou potenciálně produkovat biogenní aminy patří enterobakterie, některé kmeny rodů *Lactococcus*, *Lactobacillus* a *Enterococcus*. Kvasinky a plísně biogenní aminy pravděpodobně neprodukují. Podle počtu mikroorganismů odečtených u jednotlivých vzorků, lze též posuzovat kvalitu použité suroviny, zařazení či nezařazení procesu pasterace mléka či úroveň hygieny výroby.

8.2.1 Počty mikroorganismů ve vzorcích skupiny A

Výsledky počtu mikroorganismů u vzorků skupiny A jsou uvedeny v tabulce 28.

Tab.28 Výsledky počtu mikroorganismů ve vzorcích skupiny A

Vzorky skupiny A	Počty mikroorganismů (CFU/g)					
	CPM*	enterobakterie	laktokoky	laktobacily	enterokoky	kvasinky a plísně
A1	1,5. 10 ⁸	1,6. 10 ⁶	1,2. 10 ⁷	2,0. 10 ⁸	1,1. 10 ⁶	1,4. 10 ⁵
A2	1,3. 10 ⁷	1,2. 10 ⁶	9,0. 10 ⁷	2,0. 10 ⁶	1,4. 10 ⁴	6,4. 10 ⁴
A3	1,3. 10 ⁸	1,3. 10 ⁶	1,6. 10 ⁶	5,8. 10 ⁷	6,0. 10 ⁵	9,5. 10 ²
A4	3,3. 10 ⁸	8,0. 10 ⁶	8,3. 10 ⁷	2,8. 10 ⁷	2,4. 10 ⁶	1,1. 10 ⁴
A5	2,7. 10 ⁸	7,6. 10 ⁶	4,9. 10 ⁷	3,1. 10 ⁷	3,4. 10 ⁵	4,3. 10 ³
A6	6,2. 10 ⁷	7,4. 10 ⁶	3,8. 10 ⁷	2,1. 10 ⁷	4,6. 10 ⁵	6,7. 10 ⁶
A7	3,4. 10 ⁷	2,2. 10 ⁶	2,9. 10 ⁷	3,8. 10 ⁶	4,1. 10 ⁵	3,9. 10 ⁶
A8	8,1. 10 ⁸	6,2. 10 ⁶	7,0. 10 ⁷	3,2. 10 ⁸	4,6. 10 ⁶	1,1. 10 ⁴
A9	7,6. 10 ⁸	5,9. 10 ⁶	6,6. 10 ⁷	2,4. 10 ⁸	4,6. 10 ⁶	9,7. 10 ³

Skupina A zahrnovala 9 vzorků sýrů z nepasterovaného ovčího mléka. Celkové počty mikroorganismů u vzorků skupiny A se pohybovaly v řádech 10⁷-10⁸ CFU/g. Počet enterobakterií byl u všech vzorků řádově 10⁶ CFU/g. Počty bakterií mléčného kvašení rodu

Lactococcus a *Lactobacillus* byly zjištěny řádově 10^6 - 10^8 CFU/g. Množství enterokoků se pohybovalo v řádech 10^4 - 10^6 CFU/g a počty kvasinek a plísní v řádech 10^2 - 10^6 CFU/g.

8.2.2 Počty mikroorganismů ve vzorcích skupiny B

Výsledky počtu mikroorganismů u vzorků skupiny B jsou uvedeny v tabulce 29.

Tab.29 Výsledky počtu mikroorganismů ve vzorcích skupiny B

Vzorky skupiny B	Počty mikroorganismů (CFU/g)					
	CPM*	enterobakterie	laktokoky	laktobacily	enterokoky	kvasinky a plísně
B1	$5,2 \cdot 10^7$	$2,1 \cdot 10^6$	$1,0 \cdot 10^6$	$9,0 \cdot 10^7$	$6,7 \cdot 10^5$	$1,8 \cdot 10^4$
B2	$8,5 \cdot 10^5$	$5,2 \cdot 10^4$	$3,5 \cdot 10^7$	$1,3 \cdot 10^5$	$1,0 \cdot 10^3$	$3,1 \cdot 10^4$
B3	$4,8 \cdot 10^5$	0	$1,3 \cdot 10^4$	$7,3 \cdot 10^4$	0	$1,0 \cdot 10^2$
B4	$1,3 \cdot 10^5$	0	$1,8 \cdot 10^4$	$1,4 \cdot 10^5$	0	0
B5	$3,1 \cdot 10^6$	0	$3,3 \cdot 10^7$	$1,3 \cdot 10^6$	$6,0 \cdot 10^4$	$1,7 \cdot 10^3$
B6	$4,3 \cdot 10^7$	$2,8 \cdot 10^6$	$2,5 \cdot 10^7$	$6,1 \cdot 10^5$	$8,4 \cdot 10^3$	$4,3 \cdot 10^4$
B7	$2,1 \cdot 10^7$	$3,0 \cdot 10^4$	$3,5 \cdot 10^7$	$7,3 \cdot 10^4$	$7,0 \cdot 10^6$	$2,2 \cdot 10^4$
B8	$5,6 \cdot 10^7$	$2,1 \cdot 10^5$	$3,1 \cdot 10^6$	$3,0 \cdot 10^6$	$2,3 \cdot 10^6$	$8,6 \cdot 10^4$
B9	$1,1 \cdot 10^6$	$2,0 \cdot 10^5$	$2,3 \cdot 10^6$	$3,0 \cdot 10^5$	$2,7 \cdot 10^3$	$3,4 \cdot 10^6$

Skupina B zahrnovala 9 vzorků sýrů z pasterovaného ovčího mléka. Celkové počty mikroorganismů u vzorků skupiny B byly nižší a pohybovaly se v řádech 10^5 - 10^7 CFU/g. Také počet enterobakterií byl u většiny vzorků o jeden až dva řády nižší. U vzorků B3, B4 a B5 nebyly enterobakterie stanoveny. Počty bakterií mléčného kvašení rodu *Lactococcus* a rodu *Lactobacillus* byly zjištěny v řádech 10^4 - 10^7 CFU/g. Množství enterokoků se pohybovalo v řádech 10^3 - 10^6 CFU/g. U vzorků B3 a B4 nebyly enterokoky stanoveny. Počty kvasinek a plísní byly v řádech 10^2 - 10^4 CFU/g, pouze vzorek B9 obsahoval vyšší množství kvasinek a plísní, řádově 10^6 CFU/g.

Obecně lze konstatovat, že vzorky skupiny A z nepasterovaného ovčího mléka obsahovaly celkově vyšší množství mikroorganismů, které byly v této práci sledovány, než vzorky skupiny B z ovčího mléka, které bylo pasterováno. Tepelný účinek pasterace se významně podílel na redukci počtu mikroorganismů v mléce a následně ve výrobcích.

8.2.3 Počty mikroorganismů ve vzorcích skupiny C

Výsledky počtu mikroorganismů u vzorků skupiny C jsou uvedeny v tabulce 30.

Tab.30 Výsledky počtu mikroorganismů ve vzorcích skupiny C

Vzorky skupiny C	Počty mikroorganismů (CFU/g)					
	CPM*	enterobakterie	laktokoky	laktobacily	enterokoky	kvasinky a plísně
C1	$4,0 \cdot 10^6$	$4,9 \cdot 10^6$	$6,3 \cdot 10^7$	$3,7 \cdot 10^6$	$5,8 \cdot 10^6$	$8,3 \cdot 10^6$

Skupina C zahrnovala 1 vzorek zrajícího sýra z nepasterovaného kozího mléka. Celkový počet mikroorganismů u vzorku C1 byl 10^6 CFU/g. Počet bakterií čeledi *Enterobacteriaceae* byl 10^6 CFU/g, což je počet řádově stejný se vzorky z nepasterovaného ovčího mléka skupiny A. Počet bakterií mléčného kvašení rodu *Lactococcus* byl zjištěn 10^7 CFU/g a rodu *Lactobacillus* o řád nižší 10^6 CFU/g. Množství enterokoků bylo vysoké, řádově 10^6 CFU/g. Výskyt kvasinek a plísní byl též v řádu 10^6 CFU/g.

8.2.4 Počty mikroorganismů ve vzorcích skupiny D

Výsledky počtu mikroorganismů u vzorků skupiny D jsou uvedeny v tabulce 31.

Tab.31 Výsledky počtu mikroorganismů ve vzorcích skupiny D

Vzorky skupiny D	Počty mikroorganismů (CFU/g)					
	CPM*	enterobakterie	laktokoky	laktobacily	enterokoky	kvasinky a plísně
D1	$4,9 \cdot 10^7$	$2,1 \cdot 10^4$	$7,7 \cdot 10^7$	$1,0 \cdot 10^6$	$3,2 \cdot 10^5$	$1,2 \cdot 10^3$
D2	$5,5 \cdot 10^6$	$4,3 \cdot 10^3$	$6,1 \cdot 10^4$	$8,2 \cdot 10^4$	$3,6 \cdot 10^2$	$7,0 \cdot 10^3$
D3	$3,4 \cdot 10^6$	$1,8 \cdot 10^3$	$8,2 \cdot 10^3$	$5,5 \cdot 10^4$	$1,1 \cdot 10^3$	$4,1 \cdot 10^2$
D4	$4,4 \cdot 10^8$	$7,2 \cdot 10^6$	$5,4 \cdot 10^7$	$7,1 \cdot 10^5$	$3,0 \cdot 10^5$	$3,8 \cdot 10^4$
D5	$5,3 \cdot 10^7$	$8,5 \cdot 10^6$	$5,6 \cdot 10^7$	$4,8 \cdot 10^5$	$4,5 \cdot 10^2$	$2,5 \cdot 10^4$
D6	$3,1 \cdot 10^6$	$2,9 \cdot 10^5$	$4,7 \cdot 10^7$	$5,3 \cdot 10^5$	$2,7 \cdot 10^5$	$2,1 \cdot 10^4$
D7	$3,4 \cdot 10^6$	$1,9 \cdot 10^3$	$2,4 \cdot 10^6$	$1,9 \cdot 10^5$	$1,0 \cdot 10^3$	$3,9 \cdot 10^5$
D8	$7,6 \cdot 10^5$	$1,7 \cdot 10^3$	$2,6 \cdot 10^5$	$3,2 \cdot 10^5$	$6,8 \cdot 10^2$	$2,3 \cdot 10^5$
D9	$1,7 \cdot 10^6$	$1,4 \cdot 10^3$	$3,2 \cdot 10^5$	$2,3 \cdot 10^5$	$3,6 \cdot 10^2$	$4,3 \cdot 10^5$
D10	$2,1 \cdot 10^6$	0	$3,0 \cdot 10^6$	$4,5 \cdot 10^4$	$1,4 \cdot 10^5$	$2,8 \cdot 10^5$
D11	$3,1 \cdot 10^7$	$1,2 \cdot 10^4$	$3,5 \cdot 10^6$	$7,5 \cdot 10^5$	$3,4 \cdot 10^5$	$3,6 \cdot 10^6$
D12	$2,6 \cdot 10^7$	$1,5 \cdot 10^4$	$4,2 \cdot 10^6$	$1,3 \cdot 10^6$	$4,2 \cdot 10^5$	$1,7 \cdot 10^4$

Skupina D zahrnovala 12 vzorků sýrů z pasterovaného kozího mléka. Celkové počty mikroorganismů se u vzorků skupiny D pohybovaly v řádech 10^5 - 10^8 CFU/g. Množství enterobakterií byl u většiny vzorků o jeden až tři řády nižší než u vzorku skupiny C. U vzorků D10 nebyly enterobakterie stanoveny. Počty bakterií mléčného kvašení rodu *Lactococcus* byly zjištěny v řádech 10^3 - 10^7 CFU/g a rodu *Lactobacillus* byly zjištěny v řádech 10^4 - 10^6 CFU/g. Množství enterokoků bylo dva až čtyři řády nižší než u vzorku

skupiny C a pohybovalo se v řádech 10^2 - 10^5 CFU/g. Počty kvasinek a plísní byly v řádech 10^2 - 10^5 CFU/g. Vzorek B11 obsahoval nejvyšší množství kvasinek a plísní, řádově 10^6 CFU/g.

Obdobně lze konstatovat, že vzorky skupiny C z nepasterovaného kozího mléka obsahovaly celkově vyšší množství mikroorganismů, které byly v této práci sledovány, než vzorky skupiny D z kozího mléka, které bylo pasterováno. Tepelný účinek pasterace se opět významně podílel na redukci počtu mikroorganismů v mléce a následně ve výrobcích.

8.2.5 Počty mikroorganismů ve vzorcích skupiny E

Výsledky počtu mikroorganismů u vzorků skupiny E jsou uvedeny v tabulce 32.

Tab.32 Výsledky počtu mikroorganismů ve vzorcích skupiny E

Vzorky skupiny E	Počty mikroorganismů (CFU/g)					
	CPM*	enterobakterie	laktokoky	laktobacily	enterokoky	kvasinky a plísně
E1	$4,2 \cdot 10^7$	$4,2 \cdot 10^5$	$4,7 \cdot 10^7$	$2,6 \cdot 10^6$	$3,2 \cdot 10^5$	$2,3 \cdot 10^4$
E2	$2,8 \cdot 10^7$	$4,8 \cdot 10^5$	$5,1 \cdot 10^7$	$3,6 \cdot 10^6$	$5,7 \cdot 10^5$	$7,3 \cdot 10^5$
E3	$7,6 \cdot 10^8$	$5,8 \cdot 10^6$	$6,1 \cdot 10^7$	$8,2 \cdot 10^4$	$2,0 \cdot 10^4$	$2,0 \cdot 10^4$
E4	$2,1 \cdot 10^7$	$3,1 \cdot 10^5$	$3,7 \cdot 10^7$	$2,3 \cdot 10^6$	$2,9 \cdot 10^6$	$1,8 \cdot 10^4$
E5	$2,0 \cdot 10^7$	$2,8 \cdot 10^5$	$2,7 \cdot 10^7$	$3,0 \cdot 10^6$	$3,4 \cdot 10^6$	$1,0 \cdot 10^4$
E6	$4,6 \cdot 10^7$	$2,2 \cdot 10^4$	$6,0 \cdot 10^7$	$1,7 \cdot 10^6$	$5,7 \cdot 10^3$	$1,9 \cdot 10^4$
E7	$3,9 \cdot 10^7$	$2,5 \cdot 10^4$	$9,0 \cdot 10^7$	$1,4 \cdot 10^6$	$9,4 \cdot 10^3$	$2,2 \cdot 10^4$
E8	$4,0 \cdot 10^7$	$4,5 \cdot 10^4$	$4,3 \cdot 10^6$	$1,5 \cdot 10^5$	$1,6 \cdot 10^5$	$5,7 \cdot 10^6$
E9	$1,0 \cdot 10^7$	$3,1 \cdot 10^5$	$3,8 \cdot 10^6$	$2,2 \cdot 10^6$	$1,5 \cdot 10^6$	$1,6 \cdot 10^6$

Skupina E zahrnovala 8 vzorků čerstvých sýrů z pasterovaného kravského mléka a jeden vzorek tvarohu (E9) z pasterovaného kravského mléka. Celkové počty mikroorganismů se u vzorků skupiny E pohybovaly v řádech 10^7 CFU/g s výjimkou vzorku E3, který obsahoval CPM o jeden řád vyšší. Množství enterobakterií bylo zjištěno v řádech 10^4 - 10^6 CFU/g, přičemž pouze jeden vzorek E3 obsahoval enterobakterie v řádu 10^6 CFU/g. Počty bakterií mléčného kvašení rodu *Lactococcus* byly zjištěny v řádech 10^6 - 10^7 CFU/g a rodu *Lactobacillus* byly zjištěny v řádech 10^4 - 10^6 CFU/g. Množství enterokoků u vzorků skupiny E se pohybovalo v řádech 10^3 - 10^6 CFU/g. Kvasinky a plísně byly zjištěny v množství řádově 10^4 - 10^6 CFU/g.

8.2.6 Počty mikroorganismů ve vzorcích skupiny F

Výsledky počtu mikroorganismů u vzorků skupiny F jsou uvedeny v tabulce 33.

Tab.33 Výsledky počtu mikroorganismů ve vzorcích skupiny F

Vzorky skupiny F	Počty mikroorganismů (CFU/g)					
	CPM*	enterobakterie	laktokoky	laktobacily	enterokoky	kvasinky a plísně
F1	$5,8 \cdot 10^5$	$2,4 \cdot 10^5$	$4,2 \cdot 10^5$	$2,5 \cdot 10^5$	$2,5 \cdot 10^3$	$1,4 \cdot 10^5$
F2	$3,5 \cdot 10^4$	$5,5 \cdot 10^2$	$1,1 \cdot 10^5$	$2,0 \cdot 10^4$	$7,0 \cdot 10^3$	$1,4 \cdot 10^2$
F3	$1,1 \cdot 10^7$	$1,1 \cdot 10^4$	$7,9 \cdot 10^5$	$1,8 \cdot 10^7$	$2,5 \cdot 10^4$	$2,7 \cdot 10^4$
F4	$1,2 \cdot 10^6$	0	$5,6 \cdot 10^7$	$6,4 \cdot 10^4$	$5,0 \cdot 10^2$	$1,8 \cdot 10^2$
F5	$1,8 \cdot 10^6$	$3,5 \cdot 10^6$	$4,0 \cdot 10^5$	$7,3 \cdot 10^5$	$2,5 \cdot 10^4$	$1,3 \cdot 10^6$
F6	$1,3 \cdot 10^5$	$1,8 \cdot 10^4$	$2,8 \cdot 10^4$	$9,1 \cdot 10^3$	$9,5 \cdot 10^2$	$2,0 \cdot 10^6$
F7	$8,2 \cdot 10^4$	0	$1,8 \cdot 10^3$	$1,8 \cdot 10^4$	$1,8 \cdot 10^2$	$2,2 \cdot 10^3$
F8	$5,0 \cdot 10^4$	$1,3 \cdot 10^3$	$4,5 \cdot 10^3$	0	0	$2,0 \cdot 10^4$
F9	$7,3 \cdot 10^4$	$4,5 \cdot 10^3$	$3,5 \cdot 10^4$	$3,2 \cdot 10^6$	$5,0 \cdot 10^3$	$9,4 \cdot 10^3$
F10	$5,0 \cdot 10^4$	$3,7 \cdot 10^3$	$2,8 \cdot 10^4$	0	$5,0 \cdot 10^3$	$2,0 \cdot 10^5$
F11	$5,0 \cdot 10^5$	$3,0 \cdot 10^5$	$2,2 \cdot 10^5$	0	$3,1 \cdot 10^3$	$2,0 \cdot 10^6$
F12	$1,1 \cdot 10^5$	0	$4,3 \cdot 10^4$	$1,2 \cdot 10^5$	$9,1 \cdot 10^2$	0
F13	$3,4 \cdot 10^7$	$9,9 \cdot 10^3$	$6,9 \cdot 10^6$	$1,8 \cdot 10^6$	$1,0 \cdot 10^4$	$3,5 \cdot 10^5$
F14	$3,2 \cdot 10^7$	$1,9 \cdot 10^6$	$5,1 \cdot 10^7$	$2,7 \cdot 10^6$	$4,4 \cdot 10^3$	$4,1 \cdot 10^2$
F15	$4,2 \cdot 10^5$	$4,7 \cdot 10^3$	$1,9 \cdot 10^5$	$8,2 \cdot 10^4$	$1,4 \cdot 10^4$	$2,8 \cdot 10^5$

Skupina F zahrnovala 15 vzorků zrajících sýrů z pasterovaného kravského mléka. Celkové počty mikroorganismů se u vzorků skupiny F pohybovaly v řádech 10^4 - 10^7 CFU/g. Počet enterobakterií byl zjištěn řádově 10^2 - 10^6 CFU/g. U vzorků F4, F7 a F12 nebyly enterobakterie stanoveny. Počty bakterií mléčného kvašení rodu *Lactococcus* a *Lactobacillus* byly zjištěny řádově 10^3 - 10^7 CFU/g. U vzorků F8, F10 a F11 nebyly bakterie rodu *Lactobacillus* stanoveny. Množství enterokoků bylo oproti vzorkům skupiny E nižší a pohybovalo se v řádech 10^2 - 10^4 CFU/g. Počty kvasinek a plísní byly v řádech 10^2 - 10^6 CFU/g.

Je možno konstatovat, že vzorky zrajících sýrů skupiny F z pasterovaného kravského mléka obsahovaly celkově nižší množství mikroorganismů, které byly v této práci sledovány, než vzorky čerstvých sýrů skupiny E z pasterovaného kravského mléka.

8.2.7 Počty mikroorganismů ve vzorcích skupiny G

Výsledky počtu mikroorganismů u vzorků skupiny G jsou uvedeny v tabulce 34.

Tab.34 Výsledky počtu mikroorganismů ve vzorcích skupiny G

Vzorky skupiny G	Počty mikroorganismů (CFU/g)					
	CPM*	enterobakterie	laktokoky	laktobacily	enterokoky	kvasinky a plísňe
G1	$1,4 \cdot 10^6$	0	$5,1 \cdot 10^4$	$4,5 \cdot 10^5$	0	0
G2	$1,1 \cdot 10^7$	$1,7 \cdot 10^4$	$2,7 \cdot 10^6$	$1,0 \cdot 10^6$	$1,8 \cdot 10^4$	$9,1 \cdot 10^2$

Skupina G zahrnovala 2 vzorky výrobků z pasterovaného kravského mléka - vzorek G1 bílý smetanový jogurt a vzorek zákysu G2. Celkové počty mikroorganismů se u vzorků skupiny G pohybovaly v řádech 10^6 - 10^7 CFU/g. U vzorku G1 nebyly stanoveny enterobakterie, u vzorku G2 byl počet enterobakterií 10^4 CFU/g. Počty bakterií mléčného kvašení rodu *Lactococcus* a *Lactobacillus* byly zjištěny řádově 10^4 - 10^6 CFU/g. U vzorku G1 nebyly stanoveny též enterokoky, kvasinky ani plísňe. Vzorek G2 obsahoval řádově 10^4 CFU/g enterokoků a 10^2 kvasinek a plísni.

8.2.8 Počty mikroorganismů ve vzorcích skupiny H

Výsledky počtu mikroorganismů u vzorků skupiny H jsou uvedeny v tabulce 35.

Tab.35 Výsledky počtu mikroorganismů ve vzorcích skupiny H

Vzorky skupiny H	Počty mikroorganismů (CFU/g)					
	CPM*	enterobakterie	laktokoky	laktobacily	enterokoky	kvasinky a plísňe
H1	$1,2 \cdot 10^6$	0	$8,0 \cdot 10^2$	$8,2 \cdot 10^4$	0	$1,8 \cdot 10^2$
H2	$5,9 \cdot 10^4$	0	$8,2 \cdot 10^3$	$1,5 \cdot 10^3$	$5,0 \cdot 10^2$	$5,7 \cdot 10^3$
H3	$2,7 \cdot 10^4$	0	$6,4 \cdot 10^3$	$2,7 \cdot 10^4$	0	0
H4	$8,6 \cdot 10^4$	$1,1 \cdot 10^3$	$2,4 \cdot 10^5$	$4,5 \cdot 10^4$	$1,0 \cdot 10^3$	$2,2 \cdot 10^3$
H5	$3,4 \cdot 10^8$	$1,1 \cdot 10^3$	$9,4 \cdot 10^6$	$2,2 \cdot 10^5$	$2,3 \cdot 10^3$	$2,8 \cdot 10^6$
H6	$3,2 \cdot 10^8$	$3,4 \cdot 10^4$	$1,9 \cdot 10^7$	$2,6 \cdot 10^5$	$4,4 \cdot 10^3$	$2,9 \cdot 10^6$
H7	$5,3 \cdot 10^5$	0	$3,5 \cdot 10^5$	$2,3 \cdot 10^5$	$2,3 \cdot 10^4$	0
H8	$2,0 \cdot 10^8$	$2,5 \cdot 10^3$	$1,1 \cdot 10^5$	$4,1 \cdot 10^6$	$5,5 \cdot 10^3$	$8,2 \cdot 10^2$

Skupina H zahrnovala 8 vzorků fermentovaných masných výrobků. Celkové počty mikroorganismů se u vzorků skupiny H pohybovaly v řádech 10^4 - 10^8 CFU/g. Počet enterobakterií byl obecně nízký a to řádově 0 - 10^4 CFU/g. Počty bakterií mléčného kvašení rodu *Lactococcus* byly zjištěny řádově 10^2 - 10^7 CFU/g a rodu *Lactobacillus* řádově 10^3 - 10^6 CFU/g. Množství enterokoků bylo obecně též nízké oproti vzorkům jiných skupin a pohybovalo se

v řádech $0-10^4$ CFU/g, přičemž vzorky H1 a H3 enterokoky neobsahovaly a jediný vzorek H7 obsahoval enterokoky v řádu 10^4 CFU/g. Počty kvasinek a plísní byly v řádech $0-10^6$ CFU/g, přičemž u vzorků H3 a H7 nebyly kvasinky a plísně stanoveny. Naopak u vzorků H5 a H6 se kvasinky a plísně vyskytovaly v řádech 10^6 CFU/g.

Tab.36 Výsledky celkového počtu mikroorganismů ve skupinách A - H

Skupina	Celkové počty mikroorganismů (CFU/g)					
	CPM	enterobakterie	laktokoky	laktobacily	enterokoky	kvasinky a plísně
A	$10^7 - 10^8$	10^6	$10^6 - 10^7$	$10^6 - 10^8$	$10^4 - 10^6$	$10^2 - 10^6$
B	$10^5 - 10^7$	$0 - 10^6$	$10^4 - 10^7$	$10^4 - 10^7$	$0 - 10^6$	$0 - 10^6$
C	10^6	10^6	10^7	10^6	10^6	10^6
D	$10^5 - 10^8$	$0 - 10^6$	$10^3 - 10^7$	$10^4 - 10^6$	$10^2 - 10^5$	$10^2 - 10^6$
E	$10^7 - 10^8$	$10^4 - 10^6$	$10^6 - 10^7$	$10^4 - 10^6$	$10^3 - 10^6$	$10^4 - 10^6$
F	$10^4 - 10^7$	$0 - 10^6$	$10^3 - 10^7$	$0 - 10^7$	$0 - 10^4$	$0 - 10^6$
G	$10^6 - 10^7$	$0 - 10^4$	$10^4 - 10^6$	$10^5 - 10^6$	$0 - 10^4$	$0 - 10^2$
H	$10^4 - 10^8$	$0 - 10^4$	$10^2 - 10^7$	$10^3 - 10^6$	$0 - 10^4$	$0 - 10^6$

Celkové počty mikroorganismů v jednotlivých skupinách A až H jsou uvedeny tabulce 36. Počty jsou uvedeny pouze v řádech, konkrétní počty zaznamenávají tabulky 34 až 41. Ze zjištěných údajů je možno konstatovat značně různorodé počty mikroorganismů u jednotlivých výrobků daných skupin, zejména u skupin enterobakterií, enterokoků, kvasinek a plísní. Z tohoto důvodu je těžké výsledky hodnotit. Lze ale říci, že u vzorků fermentovaných masných výrobků (skupina H) a současně u vzorků skupiny G byla zjištěna nejnižší přítomnost bakterií, které mohou být potencionálními producenty biogenních aminů.

9 SOUHRNNÁ DISKUZE

V diplomové práci byl proveden monitoring obsahu nejběžnějších biogenních aminů ve vybraných živočišných produktech farmářského původu. Ke stanovení bylo předloženo 65 vzorků farmářských výrobků. Analýza byla provedena pomocí iontově-výměnné chromatografie na automatickém analyzátoru aminokyselin. Stanovení bylo doplněno o mikrobiologické vyšetření vzorků na přítomnost nejběžnějších skupin mikroorganismů, z nichž některé se mohou podílet na produkci biogenních aminů.

U všech vzorků byla zjišťována přítomnost 8 biogenních aminů – tryptaminu, fenylethylaminu, kadaverinu, putrescinu, histaminu, tyraminu, spermidinu a sperminu.

Biogenní aminy se vyskytují prakticky ve všech potravinách rostlinného i živočišného původu [3,14]. Množství a druhové zastoupení biogenních aminů v dané potravine závisí na celé řadě faktorů. Významnou roli hraje samotná potravina, její složení, způsob zpracování a množství přítomných mikroorganismů [13,15]. Vysoké koncentrace těchto látek mohou na lidský organismus působit toxicky [44]. Výskyt biogenních aminů v různých potravinách byl široce zkoumán a jejich zvýšené obsahy byly zjištěny zejména u sýrů, fermentovaných masných výrobků, ryb a rybích výrobků [13,15]. Nejvíce sledovanými biogenními aminy v potravinách jsou histamin a tyramin. Autoři Ancín-Azpilicueta et al. [44] a Ōnal [57] uvádí, že množství 40-100 mg/kg již vyvolává mírné otravy a že toxickou dávkou jsou množství vyšší než 100 mg/kg potraviny. V současnosti je nařízením EP a Rady (ES) 2073/2005 v platném znění legislativně stanoveno nejvyšší přípustné množství pouze pro histamin a to 100 mg/kg u sedmi z devíti vzorků produktů rybolovu [31,92].

Z celkového počtu 65 vzorků nebyla přítomnost žádného z detekovaných biogenních aminů zjištěna pouze u 18 vzorků. U ostatních vzorků byla zjištěna přítomnost těchto látek. Nejčastěji detekovaným biogenním aminem byl tyramin, který se vyskytoval v 30 vzorcích farmářských výrobků. Biogenní amin kadaverin obsahovalo 25 vzorků výrobků. Spermin byl stanoven u 21 vzorků a putrescin u 19 vzorků. Histamin obsahovalo 7 vzorků. Pouze jediný vzorek D12 obsahoval spermidin.

Biogenní aminy tryptamin a fenylethylamin nebyly detekovány u žádného z 65 testovaných vzorků.

Koncentrace putrescinu vyšší než 100 mg.kg⁻¹ byly stanoveny u dvou vzorků B4 a B7 skupiny vzorků B, sýrů z pasterovaného ovčího mléka a také u vzorku čerstvého sýra E4.

Vysoké koncentrace putrescinu a současně i kadaverinu a tyraminu byly zjištěny u 3 vzorků H5, H6 a H7 skupiny vzorků H, fermentovaných masných výrobků, kde množství putrescinu přesáhlo 300 mg.kg^{-1} .

Vyšší obsah kadaverinu nad 100 mg.kg^{-1} byl zaznamenán u dvou vzorků sýrů (B4, B8) z pasterovaného ovčího mléka, u vzorku zrajícího sýra z nepasterovaného kozího mléka (C1) a u dvou vzorků fermentovaných masných výrobků (H6 a H7), přičemž u vzorku H6 přesáhlo množství kadaverinu 200 mg.kg^{-1} .

Nejčastějším biogenním aminem, který způsobuje otravy a jiné nežádoucí účinky, je histamin. Histamin byl detekován u 7 vzorků. Koncentrace histaminu do 40 mg.kg^{-1} byla zaznamenána u jednoho vzorku ovčí brynz (A6), u jednoho vzorku ovčího sýra (B4), u tří vzorků pařených sýrů z pasterovaného kravského mléka (F1, F2, F7) a u jednoho vzorku fermentovaného masného výrobku (H8). Ve vzorku fermentovaného masného výrobku H7 dosáhl obsah histaminu hodnoty nad 100 mg.kg^{-1} , což je množství, které lze považovat za toxické [44,57]. Konzumace těchto potravin, zejména ve vyšším množství či četnosti, může představovat zdravotní riziko.

Tyramin byl dříve druhým legislativně stanoveným biogenním aminem [77,92] s přípustným množstvím 50, 100 a 200 mg/kg pro červené víno, potraviny konzumované ve významném množství a pro sýry. V současnosti není obsah tyraminu v potravinách legislativou upraven. Někteří autoři však považují za toxické hodnoty koncentrace tyraminu nad 100 mg.kg^{-1} . Obsah tyraminu převyšující hranici 100 mg kg^{-1} byl zaznamenán celkově u 10 vzorků. Tyto koncentrace tyraminu byly zjištěny u dvou vzorků ovčích brynz (A1, A6), u dvou vzorků ovčích sýrů (B4, B8), u jednoho vzorku polotvrdého zrajícího sýra z kravského mléka (F13) a u čtyřech vzorků fermentovaných masných výrobků (H2, H5, H6 a H7). U jednoho vzorku zrajícího sýra z nepasterovaného kozího mléka (C1) přesáhla hodnota tyraminu dokonce 200 mg.kg^{-1} . Tato koncentrace může představovat ohrožení zdraví konzumentů. Přestože tyramin může vznikat činností bakterií rodu *Lactobacillus* pocházející z použitých kultur, jsou nejčastějšími producenty tyraminu kontaminující mikroorganismy [37,55].

Biogenní amin spermidin byl detekován pouze u jednoho vzorku čerstvého kozího sýra vyrobeného z pasterovaného mléka (D12). Koncentrace spermidinu činila $32,73 \text{ mg.kg}^{-1}$. Je možno se domnívat, že spermidin přešel do sýra ze suroviny, neboť v mléce se pravidel-

ně vyskytují nízké koncentrace tohoto polyaminu. Spermin a spermidin jsou přirozenou součástí rostlinných a živočišných buněk [14,18].

Často byla v mléčných výrobcích zaznamenána i přítomnost dalšího polyaminu sperminu. Spermin byl zjištěn u 21 vzorků fermentovaných mléčných výrobků. Jednalo se o jeden vzorek ovčí brynzý (A6), dva vzorky ovčích sýrů (B3, B6), 17 vzorků sýrů z pasterovaného kravského mléka (E1-E4, E6-E8, F4, F6-F14) a vzorek zákysu (G2). Koncentrace sperminu byla s výjimkou dvou vzorků sýrů (F6 a F12) velmi nízká a to do 20 mg.kg^{-1} . U vzorku sýru F6 byl obsah sperminu $37,25 \text{ mg.kg}^{-1}$. Nejvyšší koncentrace byla detekována u vzorku sýru ementálského typu (F12) a dosáhla hodnoty $97,90 \text{ mg.kg}^{-1}$. Naopak ve skupině fermentovaných masných výrobků (H) a ve skupině sýrů z kozího mléka (C, D) nebyl spermin detekován u žádného vzorku. Lze předpokládat, že spermin, podobně jako spermidin, pochází ze zpracovaného mléka.

V práci byly rovněž zhodnoceny hodnoty celkového obsahu biogenních aminů ve vzorcích jednotlivých skupin A až H pro možnost posouzení celkové dávky těchto látek při konzumaci těchto vzorků farmářských výrobků živočišného původu. Stanovení toxické hodnoty celkového množství biogenních aminů v potravinách je obtížné, neboť při stanovení sehrává význam velké množství různorodých faktorů. Jednotliví autoři uvádí hodnoty obsahu v širokém rozmezí a to $200\text{-}800 \text{ mg}$ biogenních aminů na kg potraviny. Podle Ancín-Azpilicueta et al. je toxické celkové množství biogenních aminů v potravině 900 mg.kg^{-1} [44].

Vzhledem k tomu, různé druhy sýrů často konzumují společně s alkoholickými nápoji, jako jsou víno či pivo, může být celkový příjem biogenních aminů v potravě vyšší, neboť u těchto nápojů jsou pravidelně zjišťována významná množství těchto látek. Přítomnost alkoholu navíc může snižovat aktivitu enzymů, které se podílejí na odbourávání biogenních aminů v potravě [41,43].

Analýzou byl zjištěn celkový obsah biogenních aminů nepřevyšující 100 mg.kg^{-1} u 47 vzorků farmářských výrobků živočišného původu, což lze považovat za obsah nízký. Devět vzorků obsahovalo množství biogenních aminů v rozmezí $101\text{-}200 \text{ mg.kg}^{-1}$ a 5 vzorků v rozmezí $201\text{-}400 \text{ mg.kg}^{-1}$. Pouze u čtyřech vzorků byla detekována celková koncentrace biogenních aminů $401\text{-}800 \text{ mg.kg}^{-1}$. U žádného vzorku z 65 vzorků nebylo zjištěno celkové množství biogenních aminů nad 800 mg.kg^{-1} . Nejvyšší koncentrace

biogenních aminů byly stanoveny u vzorků fermentovaných masných výrobků (skupiny H), kde hodnoty celkového množství biogenních aminů u tří vzorků (H5, H6, H7) dosahovaly hodnot 690-760 mg.kg⁻¹. U těchto tří vzorků byl celkový obsah biogenních aminů vyšší než uvádí autoři Suzzi a Gardini [23]. Nejnižší koncentrace biogenních aminů byly naopak zjištěny u skupiny sýrů z pasterovaného kozího mléka (skupiny D) a skupiny G, kde všechny vzorky obsahovaly celkovou koncentraci BA do 100 mg.kg⁻¹.

Zjištěné biogenní aminy mohou přecházet do výrobků z použitých surovin, kde jsou tyto látky přirozenou součástí. Jedná se například o polyaminy spermin, spermidin a putrescin, které jsou součástí čerstvého mléka [45,52]. Biogenní aminy mohou mít rovněž původ ze starterových či nonstarterových kultur bakterií použitých při výrobě fermentovaných výrobků. Schopnost tvorby biogenních aminů, jako tyramin, histamin, putrescin a kadaverin ve fermentovaných potravinách, byla popsána u velkého počtu bakterií mléčného kvašení - rody *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Pediococcus* a *Leuconostoc*. Biogenní aminy, například tyramin, může vytvářet kontaminující mikroflóra z čeledi *Enterobacteriaceae* [3,46].

Vzorky produktů farmářského původu byly podrobeny mikrobiologickému vyšetření na 6 vybraných skupin mikroorganismů, z nichž za možné producenty biogenních aminů byly označeny skupiny mléčných bakterií rodu *Lactococcus*, *Lactobacillus* a *Enterococcus* a skupina enterobakterií. U kvasinek a plísní je produkce biogenních aminů zanedbatelná, avšak počty těchto organismů, spolu s celkovým počtem mikroorganismů ve výrobku, poskytují informaci o celkové kvalitě dané potraviny a hygieně při jejich výrobě [27,53].

Vztah mezi obsahem biogenních aminů ve vzorcích a počtem přítomných mikroorganismů se v této práci jednoznačně nepotvrdil, neboť schopnost a intenzita produkce těchto látek je různá i mezi jednotlivými kmeny zkoumaných rodů bakterií. U velkého počtu vzorků nebyla detekována přítomnost žádného ze sledovaných biogenních aminů, přestože u vzorků byla zjištěna vysoká množství bakterií, ze skupin u nichž lze produkci biogenních aminů očekávat. Významnou roli sehrála též různorodost výrobků. Obecně lze říci, že vyšší celkové počty mikroorganismů měly vzorky výrobků, které byly vyrobeny z nepasterovaného mléka. Nejnižší celkové počty mikroorganismů byly zaznamenány ve skupině fermentovaných masných výrobků. Lze se domnívat, že se na redukcii počtu přítomných mikroorganismů podílela nízká vodní aktivita výrobků, proces uzení a přídatné látky použité při výrobě [22,89].

V práci bylo zjištěno, že značná část farmářských výrobků dostupných na českém a slovenském trhu obsahuje množství biogenních aminů, která nejsou zanedbatelná a určitým skupinám spotřebitelů, zejména dětem, těhotným ženám a starým lidem, by mohly způsobit zdravotní problémy [44]. Pro spotřebitele, užívající léky snižující aktivitu detoxikačních enzymů aminooxidas, může být podle autora Santos-Silla [3] toxická již dávka $6 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$.

Lze konstatovat, že pouze u 18 vzorků z 65 testovaných nebyla detekována přítomnost žádného ze sledovaných biogenních aminů, což lze považovat za závažné.

ZÁVĚR

Biogenní aminy jsou látky, které se běžně vyskytují v malém množství v potravinách. Přestože jsou pro živé buňky nezbytné a v živých organismech zastávají mnoho významných funkcí, mohou ve vysokých koncentracích vyvolat v lidském organismu alimentární intoxikaci. Ve výživě jsou proto hodnoceny jako přirozené antinutriční látky a slouží jako ukazatele kvality a zdravotní nezávadnosti konkrétních potravin. Mohou být indikátory nedodržování hygienických pravidel při výrobě. Přítomnost a obsah biogenních aminů v potravinách již byla zkoumána u celé řady potravin.

V práci byl monitorován obsah biogenních aminů ve vybraných vzorcích farmářských produktů živočišného původu. Na základě zjištěných výsledků je možno konstatovat že:

- přítomnost některého z 8 sledovaných biogenních aminů byla detekována u 47 vzorků z celkového počtu 65 předložených vzorků;
- u jednotlivých vzorků byly zjištěny biogenní aminy putrescin, kadaverin, histamin, tyramin, spermidin a spermin;
- biogenní aminy tryptamin a fenylethylamin nebyly detekovány u žádného z předložených vzorků;
- nejčastěji zaznamenaným biogenním aminem byl tyramin, který byl přítomen u 30 vzorků;
- nejvyšší celkové množství biogenních aminů bylo detekováno u skupiny vzorků fermentovaných masných výrobků (H), kde koncentrace dosahovala hodnoty až 760 mg.kg^{-1} ;
- nejnižší celkové množství biogenních aminů bylo detekováno u skupiny vzorků kozích sýrů z pasterovaného kozího mléka.

Sledování obsahu biogenních aminů v potravinách není v České republice, s výjimkou histaminu, ošetřeno legislativou. Každý stát si určuje vlastní pravidla pro stanovování těchto látek. Na základě zjištěných výsledků lze doporučit další výzkum přítomnosti biogenních aminů ve farmářských produktech. Lze konstatovat, že zavedení pravidelného sledování obsahu biogenních aminů v potravinách je, z hlediska zdraví spotřebitelů a možnosti vzniku otravy, významné a nezbytné.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] DUCHOŇ, J., a kol. *Lékařská chemie a biochemie*. 3. vyd. Praha: Avicenum, 1985. 716 s. ISBN 08-004-85.
- [2] SMĚLÁ, D., PECHOVÁ, P., KOMPRDA, T., KLEJDUS, B., KUBÁŇ, V. Chromatografické stanovení biogenních aminů v trvanlivých salámech během fermentace a skladování. *Chemické listy*. 2004, Vol. 98, No. 7, 432-437 s. ISSN 0009-2770.
- [3] SILLA SANTOS, M. H. Biogenic amines: their importance in foods. *International Journal of Food Microbiology*. 1996, Vol. 29, 213-231 s.
- [4] KALAČ, P., a kol. Biogenní aminy a polyaminy v potravinách. *Výživa a potraviny*. 2002, Vol. 57, No. 1. 12-13 s.
- [5] IZQUIERDO-PILIDO, M., et al. *Polymaine ned biogenic amine evolution during food processing*. In BARDÓCZ, S., WHITE, A. (ed.). *Polyamines in health and nutrition*. United States of America: Springer, 1999. ISBN 0-412-82220-2.
- [6] O, N.M., et al. Toxins in cheese. In FOX, P.F., et al. (ed.). *Cheese: chemistry, physics, and microbiology*. United Kingdom: Elsevier Academic Press, 2007. ISBN 0-12-263652-X.
- [7] KORDIOVSKÁ, P. The dynamics of biogenic amine formation in muscle tissue of carp. *Czech Journal of Animal Science*. 2006, Vol. 51, No. 6, 262-268 s.
- [8] STANDARA, S., VESELÁ, M., DRDÁK, M. Determination of biogenic amines in cheese by ion exchange chromatography. *Die Nahrung*. 2000, Vol. 44, No. 1, 28-31 s.
- [9] SHALABY, A.R.: Significance of biogenic amines to food safety and human health. *Food Research International*. 1997, Vol. 29, No.7, 675-690 s.
- [10] DRÁČKOVÁ, M., et al. Stanovení obsahu polyaminů v tvarůžcích pomocí blízké infračervené refrakční spektrometrie. *Acta fytotechnica et zootechnica*. 2009, Vol. 12, 121-126 s.
- [11] REZAEI, M., et al. Relation of biogenic amines and bacterial changes in Ice-Stored Southern Caspian Kutum (*Rutilus Frisii Kutum*). *Journal of Food Biochemistry*. 2007, Vol. 31, 541-550 s.
- [12] RUIZ-CAPILLAS, C., JIMÉNEZ-COLMENERO, F. Biogenic amines in meat and meat products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2004, Vol. 44, 489-499 s.
- [13] SHALABY, A. R. Multidetecion, semiquantitative method for determining biogenic amines in foods. *Food Chemistry*. 1995, Vol. 52, 367-371 s.

- [14] LARQUÉ, E., SABATER-MOLINA, M., ZAMORA, S. Biological significance of dietary polyamines. *Nutrition*. 2007, Vol. 23, No. 1, 88-92 s.
- [15] KALAČ, P., a kol. Biogenní aminy v kysaném zelí. *Chemické listy*. 2000. Vol. 94, No. 9, 819 s.
- [16] BARBUZZI, G., GRIMALDI, F., NOBEIL, M. A. Quality decay of fresh processed fish stored under refrigerated conditions. *Journal of Food Safety*. 2009. Vol. 29, 270-286 s.
- [17] VELÍŠEK, J. *Chemie potravin 1-2*. 2. vyd. Tábor: OSSIS, 2002. ISBN 80-8665902-8.
- [18] KALAČ, P. Recent advances in the research on biological roles of dietary polyamines in man. *Journal of Applied Biomedicine*. 2009. Vol. 7, 65-70 s.
- [19] CRAM, D. J., HAMMOND, G. S. *Organic Chemistry*. 2nd ed. Toronto: Hill Book Company, 1964. 892 s.
- [20] LATORRE-MORATALLA, M. L., VECIANA-NOGUE'S, T., et al. Biogenic amines in traditional fermented sausages produced in selected European countries. *Food Chemistry*. 2008. Vol. 107. 912-921 s.
- [21] VELÍŠEK, J. *Chemie potravin 3*. 2. uprav.vyd. Tábor: OSSIS, 2002. 368 s. ISBN 80-8668902-X.
- [22] STADNIK, J., DOLATOWSKI, Z. J. Biogenic amines in meat and fermented meat products. *Acta Scientiarum Polonorum, Technologia Alimentaria*. 2010, Vol. 9, No. 3, 251-263 s.
- [23] SUZZI, G., GARDINI, F. Biogenic amines in dry fermented sausages. *International Journal of Food Microbiology*. 2003, Vol. 88, 41-54 s.
- [24] HALÁSZ, A., BARÁTH, Á., et al. Biogenic amines and their production by microorganisms in food. *Trends in Food Science and Technology*. 1994. Vol. 5, No. 2, 42-49 s.
- [25] STRAKA, I., MALOTA, L. *Chemické vyšetření masa*. Tábor: OSSIS, 2006 104 s. ISBN 80-8665909-7.
- [26] KŘÍŽEK, M., PAVLÍČEK, T., VÁCHA, F. Biogenní aminy jako indikátory rozkladu kapřího masa. *Chemické listy*. 2000, Vol. 94, No. 9, 818-821 s.
- [27] KAROVIČOVÁ, J., KOHAJDOVÁ, Z. Biogenic amines in food. *Chemical papers*. 2003, Vol. 1, No. 59, 70-79 s.
- [28] NICOLE, R., et al. Effect of matrix on recovery of biogenic amines in fish. *Journal of AOAC International*. 2008, Vol. 4, 768-779 s.

- [29] RUIZ-CAPILLAS, C., et al. Biogenic amines in rescructured beef steaks as affected by added walnuts and cold storage. *Journal of Food Protection*. 2004, Vol. 67, No. 3, 607-609 s.
- [30] SHAHIDI, F. *Flavor of Meat, Meat Products and Seafoods*. 2nd ed. London: International Thomson Publishing. 425 s. ISBN 0-7514-0484-5.
- [31] *Příručka pro provozovatele potravinářských podniků*. [online]. [cit. 2012-01-22]. Dostupné z WWW: <http://eagri.cz/public/web/file/50727/MZe_Prirucka_potraviny_tisk.pdf>
- [32] TOLDRÁ, F. *Handbook of fermented meat and poultry*. 1nd ed. United States of America: Blackwell Publishing, 2007. 555 s. ISBN 0-8138-1477-4.
- [33] AISHATH, N., et al. Control of biogenic amines in food. Existing and Emerging Approaches. *Journal of Food Science*. 2010., Vol. 7, 139-150 s.
- [34] BODMER, S., IMARK, C., KNEUBÜHL, M. Biogenic amines in foods: histamine and food processing. *Inflammation Research*. 1999. Vol. 48, No. 6, 296-300 s.
- [35] TOLDRÁ, F. *Food microbiology and food safety*. New York: Springer, 2009. 699 s. ISBN 978-0-387-89025-8
- [36] KALAČ, P., et al. Levels of biogenic amines in typical vegetable products. *Food Chemistry*. 2002. Vol. 77, No.3, 349-351 s.
- [37] DABROWSKI, W. M., SIKORSKI, Z. E. *Toxins in foods*. 1nd ed. United States of America: CRC Press, 2007. ISBN 0-84911904-8.
- [38] MORET, S., SMĚLÁ, D., et al. A survey on biogenic amines of fresh and preseved vegetables. *Food Chemistry*. 2005, Vol.89, No. 3, 355-361 s.
- [39] KALAČ, P., ŠPIČKA J., KRÍŽEK, M., PELIKÁNOVÁ T. Biogenní aminy v kysaném zelí. *Chemické listy*. 2000. Vol. 94, No. 9, 818-821 s.
- [40] ICMSF. *Microorganisms in foods 6: Microbial Ecology of Food Commodities*. 2nd ed. New York: Kluwer Academic / Plenum Publishers, 2005. 765 s. ISBN: 0-306-48675-X.
- [41] KALAČ, P., et al. Biogenic amine formation in bottled beer. *Food Chemistry*. 2002. Vol.79, No. 7, 431-434 s.

- [42] KALAČ, P., et al. A review of biogenic amines and polyamines in beer. *Journal of the Institute of Brewing*. 2003. Vol. 109, No. 2, 123-128 s.
- [43] ZHIJUN, L., YONGNING, W., GONG Z., YUNFENG Z., CHANGHU, X. A survey of biogenic amines in chinese red wines. *Food Chemistry*. 2007. Vol. 105. 1530-1535 s.
- [44] ANCÍN-AZPILICUETA, C., GONZÁLEZ-MARCO, A., JIMÉNEZ-MORENO, N., Current knowledge about the presence of amines in wine. *Critical Review in Food Science and Nutrition*. 2008. Vol. 48, No. 3, 257-275 s.
- [45] KŘÍŽEK, M., KALAČ, P. Současný pohled na biogenní aminy v potravinách. *Kontakt*. 2002. Vol. 4, No. 2/3, 53-61 s.
- [46] BURDYCHOVÁ, R., KOMPRDA, T. Biogenic amine-forming microbial communities in cheese. *FEMS Microbiol Lett*. 2007. Vol. 276, No. 2, 149-155 s.
- [47] MURRAY, R. K., GRANNER, D. K., MAYES, P. A., RODWELL, V. W. *Harperova biochemie*. Jinočany: H&H, 1998. 872 s. ISBN 80-85787-38-5.
- [48] RIEMANN, H. P., CLIVER, D. O. *Foodborne Infections and Intoxications*. 30nd ed. California: Elsevier, 2006. 905 s. ISBN 978-0-12-588365-8.
- [49] TREVINO, E., BEIL, D., STEINHART, H. Formation of biogenic amines during the maturity process of raw meat products, for example of cervelat sausage. *Food Chemistry*, 1997. Vol. 4, 521-526 s.
- [50] DIČÁKOVÁ, Z., DUDRIKOVÁ, E. Biogénne amíny ako chemické nebezpečenstvo. In *Rizikové faktory potravinového reťazca*. Nitra: Slovenská poľnohospodárska univerzita, 2006. ISBN 80-8069-760-4.
- [51] PAVELKA, J., ŠUBRTOVÁ, Z. Využití HPLC ke stanovení rozkladných toxických produktů bílkovin. *Acta hygienica, epidemiologica et microbiologica*. 1988. Vol. 5, 246-249 s.
- [52] SANTOS, C. W., et al. Bioactive amines formation in milk by *Lactococcus* in the presence or not of rennet and NaCl at 20 and 32 °C. *Food Chemistry*. 2003. Vol 376, No. 4, 595-606 s.
- [53] JUNEJA, V. K., SOFOS, J. N. *Pathogens and toxins in food*. Washington: ASM Press, 2010. 512 s. ISBN 978-1-55581-459-5.

- [54] LUPÍNEK, Z. Biogenní aminy. *Vnitřní lékařství*. 1965. Vol. 11, No. 4, 400-402 s.
- [55] HUTKINS, R. W. *Microbiology and technology of fermented foods*. 1st ed. United States of America: IFT Press. Blackwell Publishing, 2006. 473 s. ISBN 978-0-8138-0018-9.
- [56] MISSBICHLER, A., MAYER, I., et al. Degradation of the biogenic amines in case of histamine intolerance. *Critical Nutrition Supplements*. 2010. Vol. 5, 11 s.
- [57] ÖNAL, A. Current analytical methods for the determination of biogenic amines in foods. *Food Chemistry*. 2007. Vol. 103, 1475-1486 s.
- [58] MORET, S., CONTE, L. S. High-performance liquid chromatographic evaluation of biogenic amines in food. An analysis of different methods of sample preparation in relation to food characteristic. *Journal of Chromatography A*. 1996. Vol. 729, 363-369 s.
- [59] FUCHS, M., ŠVARCOVÁ, I., MACKOVÁ, L. Histaminová intolerance a snížená aktivita diaminooxidázy. *Alergie*. 2011. Vol. 13, No. 3, 229-233 s.
- [60] PEÑA-GALLEGO, A., HERNANDEZ-ORTE, P., CACHO, J., FERREIRA, V. Biogenic amine determination in wines using solid-phase extraction. A comparative study. *Journal of Chromatography A*. 2009. Vol. 1216, 3398-3403 s.
- [61] KLOUDA, P. *Moderní analytické metody*. 2. vyd. Ostrava: nakladatelství Pavel Klouda, 2003. 132 s. ISBN 80-86369-07-2.
- [62] MAYER, H., FICHTER, G., FISCHER, E. A new ultra-pressure liquid chromatography method for determination of biogenic amines in cheese. *Journal of Chromatography A*. 2010. Vol. 1217, 3251-3257 s.
- [63] STANDARA, S., VESELÁ, M., DRDÁK, M. Determination of biogenic amines in cheese by ion exchange chromatography. *Nahrung*. 2000. Vol. 44, No. 1, 28-31 s.
- [64] KOVÁCS, A., SIMON-SARKADIA, L., GANZLERB, K. Determination of biogenic amines by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*. 1999. Vol. 836, 305-313 s.
- [65] KVASNIČKA, F., VOLDŘICH, M. Determination of biogenic amines by capillary zone electrophoresis with conductometric detection. *Journal of Chromatography A*. 2006. Vol. 1103, No.1, 145-149 s.

- [66] HORÁK, F. *Chov ovcí*. 1. vyd. Praha: Brázda, 1999. 168 s. ISBN 80-209-0284-8.
- [67] ZADRAŽIL, K. *Mlékařství (přednášky)*. 1. vyd. Praha: Česká zemědělská univerzita v Praze a nakladatelství ISV, 2002. 127 s. ISBN 80-86642-15-1.
- [68] SMETANA, P., HLAVÁČEK, J., SAMKOVÁ, E., ROZSYPAL, R., a kol. *Faremní zpracování mléka v ekologickém zemědělství*. Olomouc: Bioinstitut, 2009. 64 s. ISBN 978-80-904174-5-8.
- [69] BŘEZINA, P. JELÍNEK, J. *Chemie a technologie mléka*. I. část. 1. vyd. Praha: vydavatelství VŠCHT v Praze, 1990. 325 s. ISBN 80-7080-075-5.
- [70] PROKŠ, J. *Mlékařství*. 1. vyd. Praha: Státní nakladatelství technické literatury, 1969. 224 s.
- [71] FOX, P. F., McSWEENEY, P. L. H. *Dairy Chemistry and Biochemistry*. London: Thomson Science, 1998. 478 s. ISBN 0-412-72000-0.
- [72] CALLEC, CH. *Encyklopedie sýrů*. 1. přeložené vyd. Dobřejovice: Rebo Productions, 2002. 256 s. ISBN 80-7234-225-8.
- [73] BŘEZINA, P. KOMÁR, A. HRABĚ, J. *Technologie, zbožíznalství a hygiena potravin*. Technologie, zbožíznalství a hygiena potravin živočišného původu. Vyškov: 2001. 182 s. ISBN 80-7231-079-8.
- [74] KADLEC, P., a kol. *Technologie potravin II*. 1. vyd. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, vydavatelství VŠCHT v Praze, 2002 (dotisk 2007). 236 s. ISBN 80-7080-510-2.
- [75] GÖRNER, F., VALÍK, L'. *Aplikovaná mikrobiologie poživatin*. 1. vyd. Bratislava: Malé Centrum, 2004. 528 s. ISBN 80-967064-9-7.
- [76] FOX, P. F., GUINEE, T. P., COGAN, T. M., McSWEENEY, P. L. H. *Fundamentals of Cheese Science*. Maryland: Aspen Publishers, 2000. 638 s. ISBN 0-8342-1260-9.
- [77] Vyhláška č. 289/2007 Sb., o veterinárních a hygienických požadavcích na živočišné produkty, které nejsou upraveny přímo použitelnými předpisy ES. [online]. [cit. 2012-01-28]. Dostupné z WWW: http://www.sagit.cz/pages/zpravodajtxtanot.asp?zdroj=../_anotace/sb07289a&cd=166&typ=r

- [78] HRABĚ, J., BŘEZINA, P., VALÁŠEK, P. *Technologie výroby potravin živočišného původu*. 1. vyd. Zlín: Univerzita T. Bati ve Zlíně, 2006. 180 s. ISBN 80-7318-405-2.
- [79] KNĚZ, V., SEDLÁČKOVÁ, H. *Sýry a příprava sýrových pokrmů*. Praha: Státní nakladatelství technické literatury, 1991. 331 s. ISBN 80-03-00461-6.
- [80] ANONYM. *Mlékárenská technologie II*. [online]. [cit. 2012-2-29]. Dostupné z WWW: <<http://utb.cepac.cz/Screens/Default.aspx>>.
- [81] ŠUSTOVÁ, K. Mléko syrové nebo pasterované. *Výživa a potraviny*. 2011. Vol. 66, No. 2, 30-34 s.
- [82] KRATOCHVILOVÁ, P. *Tvaroh a čerstvé sýry ve zdravé kuchyni*. Čestlice: Pavla Momčilová, Medica Publishing, 1999. 127 s. ISBN 80-85936-41-0.
- [83] MARKOVÁ, M., VACHULOVÁ, K. *Sýry – velká encyklopedie*. Bratislava: Perfekt a.s., 1998, 255 s. ISBN 80-8046-101-5.
- [84] FANTOVÁ, M., a kol. *Chov koz*. Praha: Nakladatelství Brázda, s.r.o., 2000. 191 s. ISBN 80-209-0290-2.
- [85] HAVLÍN, J. *Domácí chov zvířat*. 1. vyd. Praha: Státní zemědělské nakladatelství, 1983. 408 s. ISBN 07-025-83.
- [86] ŠEBELA, F. DUŠEK, B. PAVEL, J. *Mlékařství*. 1. vyd. Praha: Státní zemědělské nakladatelství, 1964. 328 s. ISBN 07-018-64.
- [87] HRABĚ, J., BUŇKA, F., NOVÁKOVÁ, A. Technologie výroby ovčích sýrů v Portugalsku. *Mlékařské listy*. 2008. Vol. 106, 25-27 s.
- [88] INGR, I. Sortiment a kvalita masných výrobků v České republice. *Výživa a potraviny*. 2006. Vol. 61, No. 1, 21-23 s.
- [89] KAMENÍK, J. *Startovací kultury v masném průmyslu*. Praha: ÚZPI, 1994. 51 s. ISBN 80-85120-46-1.
- [90] DUBRAVICKÝ, J. Kvalita slovenských a zahraničných masových výrobkov. *Výživa a zdravie*. 1999. Vol. 44, No.3, 60-63 s.
- [91] BUŇKOVÁ, L., BUŇKA, F., HLOBILOVÁ, M., VAŇÁTKOVÁ, Z., NOVÁKOVÁ, D. Tyramine production of technological important strains of *Lactobacillus*, *Lacto-*

- coccus* nad *Streptococcus*. *European Food Research and Technology*. 2009. Vol.229, No. 3, 533-538 s.
- [92] Vyhláška č.305/2004, *kterou se stanoví druhy kontaminujících a toxikologicky významných látek a jejich přípustné množství v potravinách*. [online]. [cit. 2012-01-29]. Dostupné z WWW: <<http://www.szpi.gov.cz/docDetail.aspx?docid=1006047&docType=ART&nid=11816>>
- [93] Nařízení EP a Rady (ES) 2073/2005, *o mikrobiologických kritériích pro potraviny* [online]. [cit. 2012-01-29]. Dostupné z WWW: <<http://www.szpi.gov.cz/docDetail.aspx?docid=1006689&doctype=ART>>

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

BA	biogenní aminy
AMK	aminokyselina
ČR	Česká republika
EP	Evropský parlament
ES	Evropské společenství
MAO	monoaminoxidasa
DAO	diaminoxidasa
TLC	Thin Layer Chromatography, tenkovrstevná chromatografie
HPLC	High Performance Liquid Chromatography, vysokoúčinná kapalinová chromatografie
CE	Capillary Electrophoresis, kapilární elektroforéza
AAA	Amino Acid Analyzer, automatický analyzátor aminokyselin
UV	ultrafialové záření
VIS	záření v oblasti viditelné spektra
RP HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie s reverzními fázemi
IEC	Ion Exchange Chromatography, ionexová chromatografie
LC	Liquid Chromatography, kapalinová chromatografie
RP	reverzní fáze
Dns-Cl	dansylchlorid (5-dimethylaminonaftalen-1-sulfonylchlorid)
GC	Gas Chromatography, plynová chromatografie
CZE	Capillary Zone Electrophoresis, kapilární zónová elektroforéza
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay, imunologická metoda
BMK	bakterie mléčného kvašení
ATB	antibiotikum

KVS	krajská veterinární správa
EU	Evropská unie
TBC	tuberkulosa
t.v.s.	tuk v sušině
AOC	Appellation d'Origine Controlée (franc.), ochranná známka původu
MO	mikroorganismus
PCA	Plate Count agar
EA	Endův agar
SB	Slanetz-Bartley agar
MRS	agar dle DeMana, Rogosiho a Sharpeho
CPM	celkový počet mikroorganismů
CH	CHYGA, půda pro stanovení kvasinek a plísní
NaCl	chlorid sodný
SK	Slovenská republika
CFU	Colony Forming Unit, kolonie tvořící jednotky

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1 Schéma vzniku biogenního aminu z aminokyseliny	15
Obr. 2 Schéma vzniku polyaminů	16
Obr. 3 Vznik Schiffovy báze	19
Obr. 4 Vznik N-nitrosaminů reakcí s HNO_2	27

SEZNAM TABULEK

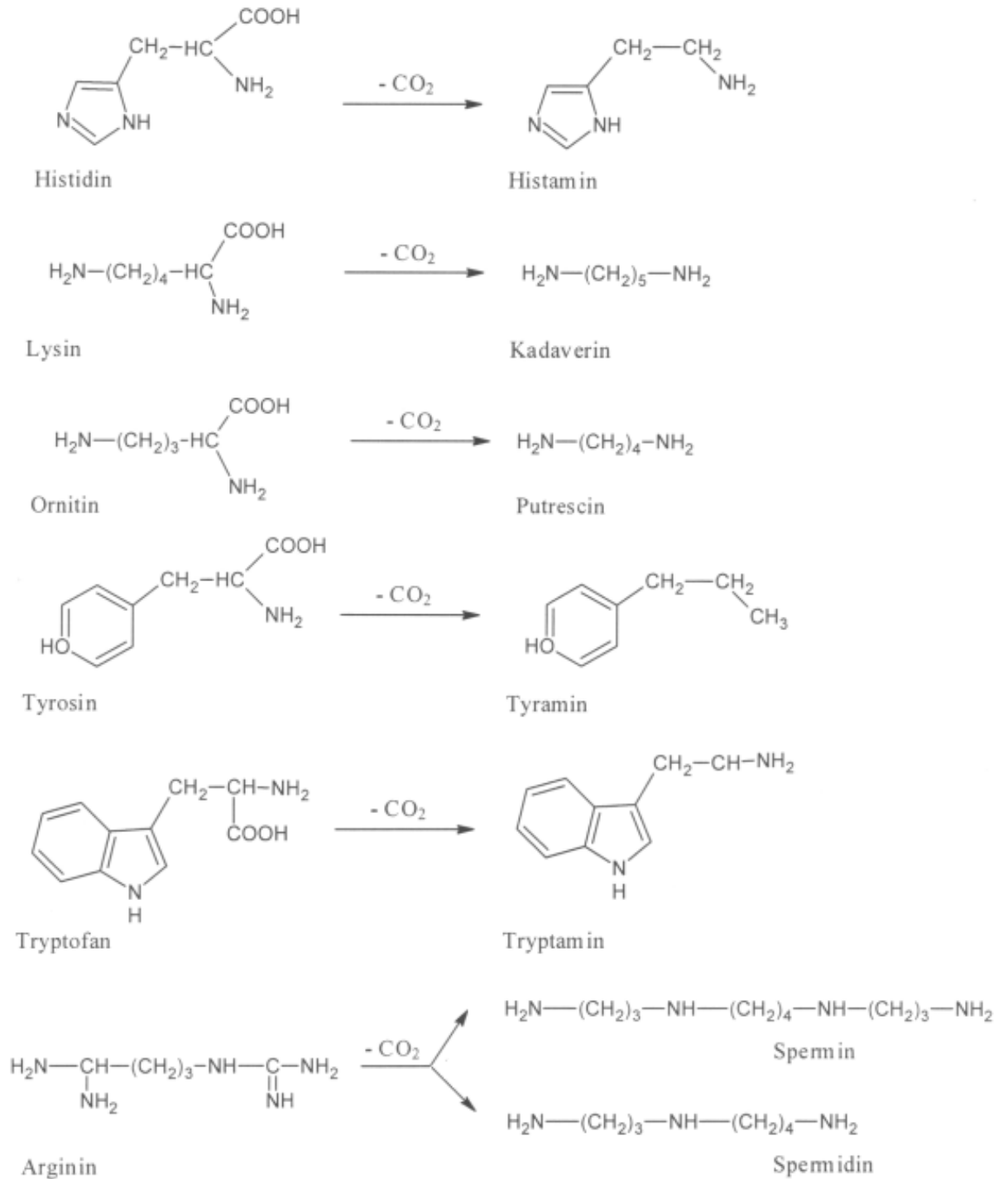
<i>Tab. 1</i> Názvy a vzorce jednotlivých biogenních aminů a polyaminů	17
<i>Tab. 2</i> Vybrané mikroorganismy s dekarboxylasovou aktivitou	25
<i>Tab. 3</i> Biogenní aminy, jejich prekurzory a biologický význam	28
<i>Tab. 4</i> Chemické složení různých druhů mlék	36
<i>Tab. 5</i> Mikroorganismy využívané pro výrobu masných výrobků	48
<i>Tab. 6</i> Rozdělení vzorků do skupin A-H	51
<i>Tab. 7</i> Kultivační půdy a typ stanovovaného mikroorganismu	55
<i>Tab. 8</i> Počet misek jednotlivých ředění pro konkrétní vzorky	58
<i>Tab. 9</i> Inkubační podmínky pro jednotlivé půdy	59
<i>Tab. 10</i> Obsah tryptaminu, fenylethylaminu, putrescinu a kadaverinu ve fermentovaných mléčných výrobcích z nepasterovaného ovčího mléka (skupina A, vzorky A1 - A9)	63
<i>Tab. 11</i> Obsah histaminu, tyraminu, spermidinu a sperminu ve fermentovaných mléčných výrobcích z nepasterovaného ovčího mléka (skupina A, vzorky A1 - A9)	63
<i>Tab. 12</i> Celkový obsah biogenních aminů ve vzorcích skupiny A	64
<i>Tab. 13</i> Obsah tryptaminu, fenylethylaminu, putrescinu a kadaverinu ve fermentovaných mléčných výrobcích z pasterovaného ovčího mléka (skupina B, vzorky B1 - B9)	65
<i>Tab. 14</i> Obsah histaminu, tyraminu, spermidinu a sperminu ve fermentovaných mléčných výrobcích z pasterovaného ovčího mléka (skupina B, vzorky B1 - B9)	65
<i>Tab. 15</i> Celkový obsah biogenních aminů ve vzorcích skupiny B	66
<i>Tab. 16</i> Obsah tryptaminu, fenylethylaminu, putrescinu a kadaverinu v sýru z pasterovaného kozího mléka (skupina D, vzorek D1 - D12)	67
<i>Tab. 17</i> Obsah histaminu, tyraminu, spermidinu a sperminu v sýru z pasterovaného kozího mléka (skupina D, vzorek D1 - D12)	67
<i>Tab. 18</i> Celkový obsah biogenních aminů ve vzorcích skupiny D	68

<i>Tab. 19 Obsah tryptaminu, fenylethylaminu, putrescinu a kadaverinu ve fermentovaných mléčných výrobcích z pasterovaného kravského mléka (skupina E, vzorek E1 - E9)</i>	<i>69</i>
<i>Tab. 20 Obsah histaminu, tyraminu, spermidinu a sperminu ve fermentovaných mléčných výrobcích z pasterovaného kravského mléka (skupina E, vzorek E1 - E9)</i>	<i>69</i>
<i>Tab. 21 Celkový obsah biogenních aminů ve vzorcích skupiny E</i>	<i>70</i>
<i>Tab. 22 Obsah tryptaminu, fenylethylaminu, putrescinu a kadaverinu ve zrajících sýrech z pasterovaného kravského mléka (skupina F, vzorek F1 - F15)</i>	<i>71</i>
<i>Tab. 23 Obsah histaminu, tyraminu, spermidinu a sperminu ve zrajících sýrech z pasterovaného kravského mléka (skupina F, vzorek F1 - F15)</i>	<i>71</i>
<i>Tab. 24 Celkový obsah biogenních aminů ve vzorcích skupiny F</i>	<i>72</i>
<i>Tab. 25 Obsah tryptaminu, fenylethylaminu, putrescinu a kadaverinu ve fermentovaných masných výrobcích (skupina H, vzorek H1 - H8)</i>	<i>73</i>
<i>Tab. 26 Obsah histaminu, tyraminu, spermidinu a sperminu ve fermentovaných masných výrobcích (skupina H, vzorek H1 - H8)</i>	<i>74</i>
<i>Tab. 27 Celkový obsah biogenních aminů ve vzorcích skupiny H</i>	<i>74</i>
<i>Tab. 28 Výsledky počtu mikroorganismů ve vzorcích skupiny A</i>	<i>75</i>
<i>Tab. 29 Výsledky počtu mikroorganismů ve vzorcích skupiny B</i>	<i>76</i>
<i>Tab. 30 Výsledky počtu mikroorganismů ve vzorcích skupiny C</i>	<i>77</i>
<i>Tab. 31 Výsledky počtu mikroorganismů ve vzorcích skupiny D</i>	<i>77</i>
<i>Tab. 32 Výsledky počtu mikroorganismů ve vzorcích skupiny E</i>	<i>78</i>
<i>Tab. 33 Výsledky počtu mikroorganismů ve vzorcích skupiny F</i>	<i>79</i>
<i>Tab. 34 Výsledky počtu mikroorganismů ve vzorcích skupiny G</i>	<i>80</i>
<i>Tab. 35 Výsledky počtu mikroorganismů ve vzorcích skupiny H</i>	<i>80</i>
<i>Tab. 36 Výsledky celkového počtu mikroorganismů ve skupinách A - H</i>	<i>81</i>

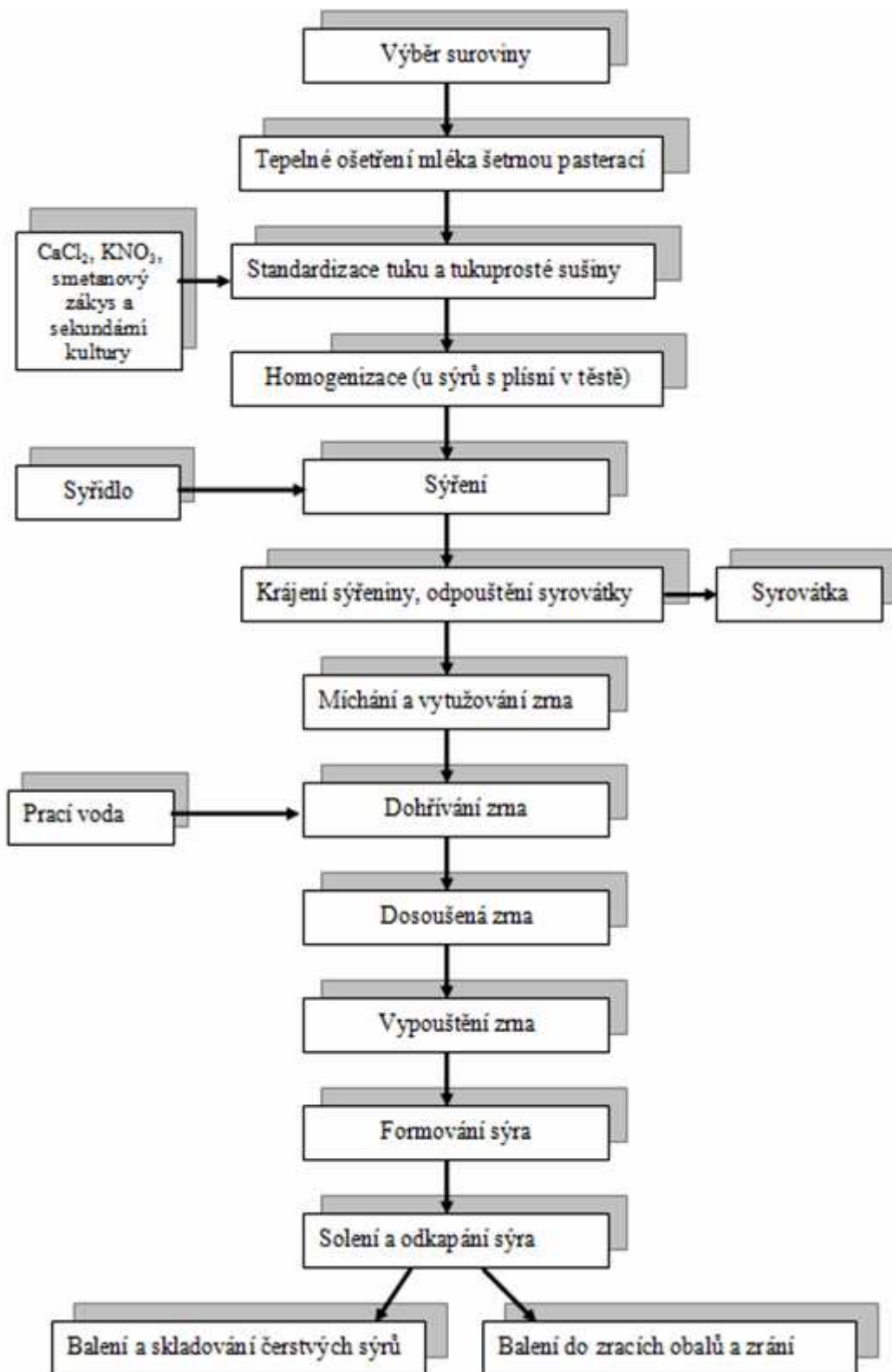
SEZNAM PŘÍLOH

- Příloha I: Vznik biogenních aminů dekarboxylací příslušných aminokyselin
- Příloha II: Schéma výroby sýrů
- Příloha III: Schéma výroby sýrů
- Příloha IV: Růst mikroorganismů na použitých kultivačních půdách

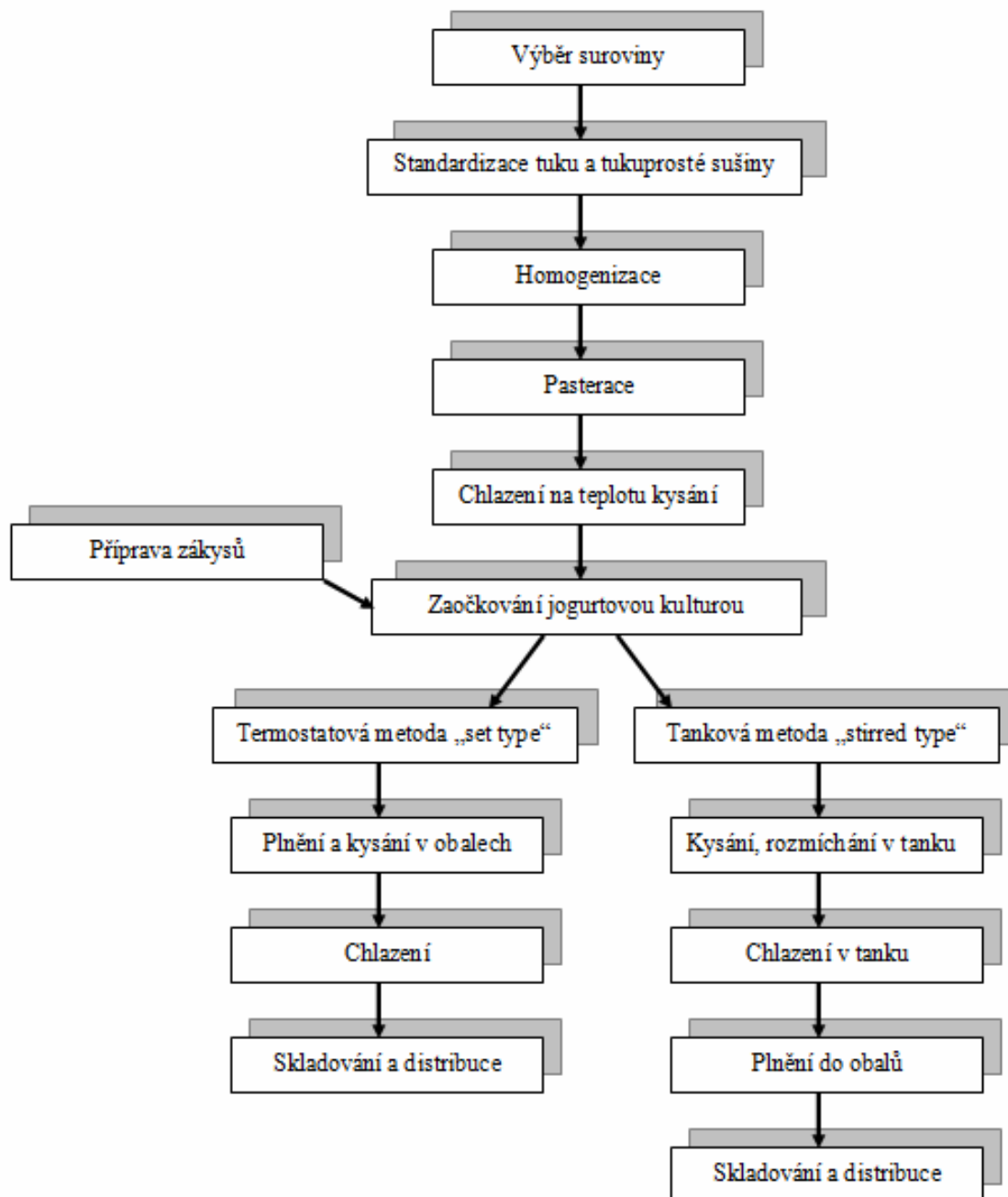
PŘÍLOHA P I: VZNIK BIOGENNÍCH AMINŮ DEKARBOXYLACÍ PŘÍSLUŠNÝCH AMINOKYSELIN



PŘÍLOHA P II: SCHÉMA VÝROBY SÝRŮ



PŘÍLOHA P III: SCHÉMA VÝROBY JOGURTŮ



PŘÍLOHA P IV: RŮST MIKROORGANISMŮ NA POUŽITÝCH KULTIVAČNÍCH PŮDÁCH



Plate Count Agar (PCA)

Stanovení celkového počtu MO



Endův agar

Stanovení počtu bakterií

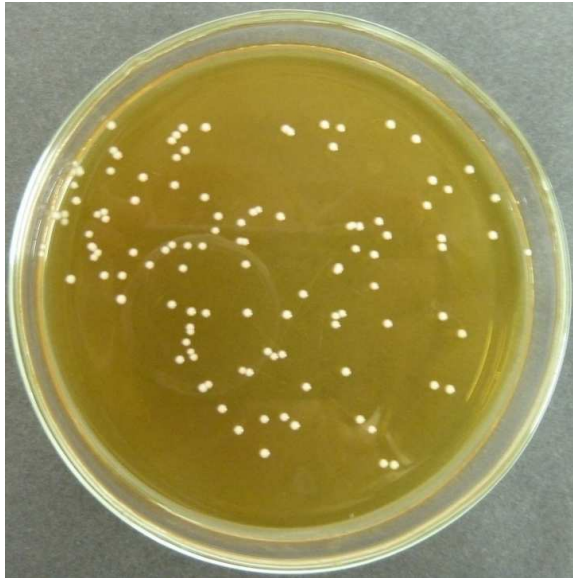
čeledi *Enterobacteriaceae*



M17 agar

Stanovení počtu bakterií

rodu *Lactococcus*



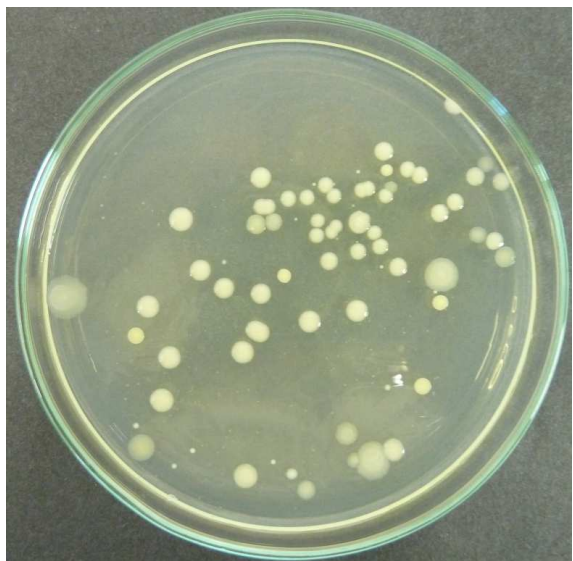
MRS agar

Stanovení počtu bakterií
rodu *Lactobacillus*



Slanetz-Bartley agar

Stanovení počtu bakterií
rodu *Enterococcus*



CHYGA agar

Stanovení počtu kvasinek a plísní