

Vliv obsahu NaCl v sýrech holandského typu na dekarboxylázovou aktivitu vybraných mikroorganismů

Bc. Kateřina Soukupová

Diplomová práce
2015



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav analýzy a chemie potravin

akademický rok: 2014/2015

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Kateřina Soukupová**
Osobní číslo: **T13594**
Studijní program: **N2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Technologie potravin**
Forma studia: **kombinovaná**

Téma práce: **Vliv obsahu NaCl v sýru holandského typu na dekarboxylázovou aktivitu vybraných mikroorganismů**

Zásady pro vypracování:

I. Teoretická část

1. Stručně charakterizujte význam rodů *Lactococcus* a *Lactobacillus* během výroby a zrání přírodních sýrů.
2. Popište význam soli v přírodních sýrech.
3. Popište faktory ovlivňující produkci biogenních aminů.

II. Praktická část

1. Založte skladovací pokus modelových vzorků sýrů s různým obsahem soli.
 2. Porovnejte změny v průběhu zrání mezi vzorky.
 3. Vyhodnoťte výsledky, diskutujte je s literaturou a vyvodte závěry.
-

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

[1] FOX, P.F., McSWEENEY, P.L.H., COGAN, T.M. GUINEE, T.P. Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology Volume 1 General Aspects. 3rd edition. London: Elsevier Academia Press. 2004. ISBN0-1226-3652-X

[2] GUINEE, T.P. (2004). Salting and the role of salt in cheese. International Journal of Dairy Technology, 57, 99-109.

[3] LAW, B. A., TAMIME, A. Y. Technology of cheesemaking. 2nd edition. Oxford: Blackwell Publishing Ltd. 2010. ISBN 978-1-4051-8298-0

[4] EFSA Journal 2011;9(10):2393

[5] DOYLE, M.P., BUCHANAN, R.L. (2013). Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers. 4th edition. Washington, DC: ASM Press. ISBN- 978-1-55581-846-3nl

Vedoucí diplomové práce:

Ing. Vendula Pachlová, Ph.D.

Ústav technologie potravin

Datum zadání diplomové práce:

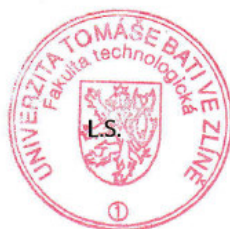
20. ledna 2015

Termín odevzdání diplomové práce:

24. dubna 2015

Ve Zlíně dne 20. ledna 2015


doc. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan




Ing. Jiří Mlček, Ph.D.
ředitel ústavu

Příjmení a jméno: SOULUPOVÁ KATEŘINA

Obor: Technologie počítačů

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 obhajoby¹⁾;
- 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. 3²⁾;
- beru na vědomí, že podle § 60³⁾ 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 § 60³⁾ 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 24.4.2016

Kateřina Souluřová

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). Odpírá-li autor takového díla udělit svolení bez vážného důvodu, mohou se tyto osoby domáhat nahrazení chybějícího projevu jeho vůle u soudu. Ustanovení § 35 odst. 3 zůstává nedotčeno.

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

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

ABSTRAKT

Diplomová práce se zabývá problematikou tvorby biogenních aminů v průběhu zrání modelových přírodních sýrů a faktory, které jejich produkci mohou ovlivnit. V praktické části diplomové práce bylo vyrobeno celkem 6 šarží modelových vzorků sýrů holandského typu. Byly vyrobeny kontrolní výroby s použitou komerční kulturou a šarže s dekarboxyláza-pozitivními kmeny (starterový kmen *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* DEPE946 a nonstarterový kmen *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* DEPE T36), u kterých se sledovala produkce biogenních aminů v závislosti na koncentraci NaCl v přírodním sýru. Modelové vzorky byly sledovány v průběhu 84 dnů zrání. U všech vzorků byla stanovena základní chemická analýza, texturní profilová analýza, koncentrace volných aminokyselin a biogenních aminů. Významně vyšší celkové obsahy biogenních aminů byly detekovány v modelových vzorcích se sledovaným starterovým kmenem v porovnání s ostatními vzorky. Nejvyšší koncentrace byly detekovány v případě tyraminu. Obsah soli se projevil na produkci biogenních aminů.

Klíčová slova: sýry holandského typu, zrání sýrů, koncentrace NaCl, texturní profilová analýza, volné aminokyseliny, biogenní aminy

ABSTRACT

This Diploma Thesis deals with the issue of biogenic amines formation during a model natural cheeses ripening and the factors that may affect their production. In the practical part of the Diploma Thesis there were produced six batches of Dutch type cheese model samples in total. There were made control productions with used commercial culture and batches with decarboxylase - positive strains (starter strain of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* DEPE946 and non - starter strain *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* DEPE T36) with which the biogenic amine production was being monitored depending on the NaCl concentration in natural cheese. The model samples were monitored during a 84-day period of ripening. For all samples, there were determined the basic chemical analysis, texture profile analysis and free amino acids and biogenic amines concentrations. Significantly higher total contents of biogenic amines were detected in model samples with monitored starter strain compared to other samples. The highest concentrations were detected in the case of tyramine. The salt content affected biogenic amines production.

Keywords:Dutch type cheese, cheese ripening, the concentration of NaCl, texture profile analysis, free amino acids, biogenic amines

Na tomto místě bych velice ráda poděkovala Ing. Vendule Pachlové, Ph.D za odborné vedení, cenné rady, připomínky a trpělivost při zpracování mé diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat Ing. Ludmile Zálešákové za pomoc při práci v laboratoři. Zároveň bych chtěla poděkovat mé rodině a přátelům, kteří mě plně podporovali po celou dobu studia.

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

OBSAH

ÚVOD.....	11
I TEORETICKÁ ČÁST.....	12
1 BAKTERIE MLÉČNÉHO KVAŠENÍ.....	13
1.1 CHARAKTERISTIKA BAKTERIÍ MLÉČNÉHO KVAŠENÍ.....	13
1.2 ROZDĚLENÍ BAKTERIÍ MLÉČNÉHO KVAŠENÍ.....	14
1.2.1 Rod <i>Lactococcus</i>	16
1.2.2 Rod <i>Lactobacillus</i>	17
1.3 VYUŽITÍ BAKTERIÍ MLÉČNÉHO KVAŠENÍ.....	19
2 VÝZNAM SOLI V PŘÍRODNÍCH SÝRECH.....	22
2.1 SOLENÍ SÝRŮ	22
2.2 FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ MNOŽSTVÍ VSTŘEBÁVÁNÍ SOLI.....	24
2.3 FUNKCE SOLI V SÝRECH	26
2.3.1 Aktivita vody.....	26
2.3.2 Texturní a reologické vlastnosti sýrů	27
3 BIOGENNÍ AMINY.....	28
3.1 DEKARBOXYLÁZOVÁ AKTIVITA	29
3.2 FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ PRODUKCI BA	30
3.2.1 Dostupnost volných aminokyselin	30
3.2.2 Přítomnost mikroorganismů s dekarboxylační aktivitou	30
3.2.3 Vliv pH.....	31
3.2.4 Teplota.....	31
3.2.5 Vliv NaCl	32
3.2.6 Dostupnost zdrojů uhlíku	32
3.2.7 Aero-/anaerobióza	32
II PRAKTICKÁ ČÁST	33
4 CÍL PRÁCE	34
5 METODIKA A MATERIÁL	35
5.1 VÝROBA MODELOVÝCH VZORKŮ SÝRŮ	35
5.2 ZÁKLADNÍ CHEMICKÉ ANALÝZY	37
5.2.1 Stanovení sušiny.....	37
5.2.2 Stanovení pH.....	37
5.2.3 Stanovení NaCl	38
5.3 TEXTURNÍ PROFILOVÁ ANALÝZA	38
5.4 STANOVENÍ VOLNÝCH AMINOKYSELIN	39
5.5 STANOVENÍ BIOGENNÍCH AMINŮ	40
6 VÝSLEDKY A DISKUSE	42
6.1 ZÁKLADNÍ CHEMICKÉ ANALÝZY	42
6.2 TEXTURNÍ A PROFILOVÁ ANALÝZA	46
6.3 STANOVENÍ VOLNÝCH AMINOKYSELIN	49
6.4 STANOVENÍ BIOGENNÍCH AMINŮ	51
ZÁVĚR	59

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	61
SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....	69
SEZNAM OBRÁZKŮ	70
SEZNAM TABULEK.....	71

ÚVOD

Biogenní aminy jsou přítomny ve všech živých organizmech a jsou pro organismus nepostradatelné. V nadlimitních koncentracích však mohou mít na organismus negativní vliv. Jedná se zejména o nežádoucí vazoaktivní a psychoaktivní účinky. Jsou však v současnosti také spojovány s dlouhodobým negativním ovlivněním zdravotního stavu konzumenta např. z pohledu produkce karcinogenních nitrosaminů. Biogenní aminy vznikají dekarboxylací v potravinách se přirozeně vyskytujícími aminokyselinami prostřednictvím enzymatického aparátu (dekarboxyláz) některých bakterií (např. rody *Citrobacter*, *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*). Biogenní aminy mohou být také produkovány bakteriemi mléčného kvašení, které jsou běžně používány pro technologické účely jako startovací (zákysové), příp. doplňkové kultury. Použití těchto bakterií je tedy nepostradatelnou součástí biotechnologického procesu výroby sýrů. Dalším významným producentem biogenních aminů jsou tzv. nezákysové bakterie mléčného kvašení, jejichž množství se v průběhu zrání sýrů navyšuje. Obsahy biogenních aminů tak mohou být společnou aktivitou jejich producentů (přítomných mikroorganismů) ve zrajícím sýru koncentrovány a mohou tak představovat zdravotní riziko pro konzumenta. Podmínkou vzniku toxického množství biogenních aminů v sýrech je proteolýza, která je při zrání sýrů považována za jeden z nejdůležitějších pochodů ovlivňující kvalitu sýrů. Aminokyseliny, finální produkty proteolýzy, slouží jako prekurzory pro tvorbu biogenních aminů v sýrech. Mezi další faktory, které společně ovlivňují intenzitu dekarboxylace aminokyselin, můžeme zařadit přítomnost a zastoupení bakterií schopných dekarboxylovat aminokyseliny, pH, koncentraci solí, vodní aktivitu. Nezanedbatelnou roli zde hraje také doba zrání sýrů.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 BAKTERIE MLÉČNÉHO KVAŠENÍ

Bakterie mléčného kvašení (BMK) se vyskytují na mnoha místech. Nachází se na neporušených a rozkládajících se rostlinách, dále ve střevech lidí a zvířat a na jejich sliznicích. Jejich technologický význam spočívá v použití během výroby kysaných a kvašených potravin a pochutin živočišného a rostlinného původu v podobě čistých bakteriálních kultur či zákysů (tzv. startovacích kultur) a přirozeně se vyskytující mikroflóry v surovině [1].

1.1 Charakteristika bakterií mléčného kvašení

BMK tvoří fylogeneticky velmi heterogenní skupinu bakterií. Obsahují taxonomicky různorodou skupinu gram pozitivních tyčinek a koků. Typické BMK jsou nesporulující kataláza negativní. BMK je skupina mikroorganismů s několika společnými biochemickými a ekologickými rysy. Z hlediska využití v potravinářských fermentacích jsou významné především rody *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Weissella*. Rod *Bifidobacterium* je fylogeneticky nepříbuzný s ostatními BMK, ale je často uváděn spolu s BMK pro podobné biochemické a fyziologické vlastnosti. Obecně platí, že BMK jsou organizmy bez zdravotního rizika pro spotřebitele a životní prostředí. Mají pozitivní účinky na zdraví lidí a vedou ke snížení populací bakterií způsobujících kažení potravin nebo produkujících toxiny v trávicím traktu [4,5]. Jsou charakteristické fermentačním metabolismem, kde během fermentace sacharidů je hlavním konečným produktem kyselina mléčná. Některé druhy BMK jsou přirozenými obyvateli úst a střev savců, zatímco jiné jsou přizpůsobeny extrémnímu prostředí, jako jsou alkoholické nápoje nebo potraviny s vysokým obsahem soli. Zástupci BMK mohou být izolovány z velkého množství potravin včetně čerstvého a zpracovaného masa, ryb, obilovin, zeleniny. Jejich majoritní význam spočívá zejména v odvětví zpracování mléka a výroby mléčných výrobků. Role určitého druhu může záviset na konkrétní situaci a produktu, kdy na jedné straně může dojít k žádoucím změnám během výroby potravinářského výrobku, a na druhé straně může přispět stejný mikroorganismus jako kontaminant k znehodnocení jiného produktu. Příkladem této skutečnosti je např. *Lactobacillus sakei*, který může být použit jako startovací kultura pro výrobu fermentovaných uzenin, ale zároveň je jedním z nejdůležitějších bakterií způsobující nežádoucí sensorické změny vakuově baleného masa [3,4].

Společným znakem BMK je fermentace sacharidů za vzniku kyseliny mléčné. Můžeme je třídit podle hlavních a vedlejších fermentačních produktů na:

- Obligátně homofermentativní – hexózy jsou Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) metabolickou dráhou fermentovány výlučně na kyselinu mléčnou (>90%), pentózy a glukonáty nefermentují, protože organizmy zařazené do této skupiny nemají enzym fosfoketolázu.
- Fakultativně heterofermentativní – hexózy fermentují na kyselinu mléčnou pomocí EMP metabolické dráhy, některé druhy při nedostatku glukózy produkují kyselinu octovou, etanol a kyselinu mravenčí. Pentózy a často i glukonáty fermentují pomocí indukovatelné fosfoketolázy na kyselinu octovou, mravenčí a etanol.
- Obligátně heterofermentativní – hexózy fermentují fosfoketolázovou dráhou na kyselinu octovou, mléčnou, etanol a CO₂. Pentózy fermentují stejnou metabolickou dráhou na kyselinu mléčnou a octovou [1,15].

1.2 Rozdělení bakterií mléčného kvašení

BMK hrají klíčovou roli během výroby a zrání sýrů. Lze je rozdělit na startérové (zákysové) kultury a NSLAB (z anglického *Non-Starter Lactic Acid Bacteria*, tj. BMK nezákysového původu) [8].

Starterové kultury mají požadované technologické vlastnosti, které jsou spojeny se schopností mikroorganismů přeměňovat substráty např. sacharidy, bílkoviny a lipidy na metabolity, které ovlivní výslednou chuť, vůni a konzistenci výrobků. Role zákysových kultur spočívá především v produkci kyseliny mléčné, čímž se zajišťuje vhodné pH pro srážení mléka. A v neposlední řadě chrání sýr před různými patogeny (pomocí snižování pH a případné produkce bakteriocinů a dalších metabolitů s antimikrobiálními účinky) [8,9].

Podle optimální teploty růstu můžeme starterové kultury rozdělit na mezofilní a termofilní kultury. Mezofilní bakteriální kultury jsou v mlékárenské praxi používané velmi často. Optimální teplota růstu těchto bakteriálních kultur je okolo 30°C. Jejich kysací a aromativní schopnost se využívá při výrobě všech fermentovaných mléčných produktů s výjimkou jogurtů. Zejména při výrobě kysaného mléka, kysané smetany při výrobě másla, konzumních tvarohů a všech druhů sýrů (buď samostatně, nebo ve formě sekundárních přídatných kultur). Mezofilní bakteriální zákysové kultury jsou složeny z mezofilních ků, kam patří:

- *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*
- *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*

- *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* biovar *diacetylactis*
- *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *cremoris*
- *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *dextranicum*

Výše uvedené druhy mezofilních bakterií se mohou vhodně kombinovat pro přípravu směsných (příp. smíšených) kultur. Tyto kultury se mohou vyrábět jen z kmenů a druhů, které se dobře snášejí a podle možností by se měly v růstu a metabolismu doplňovat. V žádném případě nesmí docházet k antagonistickým účinkům. Příčinou antagonistického účinku mezi jednotlivými druhy nebo kmeny může být tvorba známých příp. neznámých antibiotických látek. Například určitý kmen *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* může produkovat antibiotikum nizin, vůči kterému je citlivý druh *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*.

Mezofilní kultury mohou být někdy označovány také jako O-kultury a LD- kultury. O-kultury obsahují specifické kmeny *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* a *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*. Tyto kultury netvoří CO₂. Vyznačují se odolností vůči fágům. Používají se při výrobě sýrů s uzavřenou strukturou, jako jsou např. sýry typu Čedar nebo Feta. LD-kultury obsahují typické kmeny *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *cremoris*, *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* biovar *diacetylactis*, *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*, *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*. LD-kultury se vyznačují také vysokou odolností vůči fágům a je pro ně typická tvorba diacetylu a CO₂. Tyto kultury se využívají při výrobě másla z kysané smetany, tvrdých a polotvrdých sýrů a různých sýrů s tvorbou ok v těstě [1,8,10].

Termofilní bakteriální kultury se v mlékárenském průmyslu používají při výrobě sýrů s vysokodohřivanou sýřeninou (např. ementál nebo parmezán), jogurtů, měkkých sýrů nebo tvarohů. Termofilní zákysové kultury obsahují kokovité a paličkovité termofilní bakterie mléčného kvašení s optimální teplotou růstu v rozmezí 40-45°C. Mezi termofilní bakterie patří:

- *Streptococcus thermophilus*
- *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*
- *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *lactis*
- *Lactobacillus helveticus*

NSLAB se do sýrů dostávají z jiných zdrojů než ze zákysových kultur. Nacházejí se především v sýrech vyráběných ze syrového mléka, protože pocházejí z mléka samotného. V sýrech vyráběných z pasterizovaného mléka může být zdrojem NSLAB rekontaminace pasterizovaného mléka např. ze zařízení s kterým mléko přichází do styku. V úvahu mů-

žeme vzít i bakterie z předcházejících výrob. Jedná se povětšinou o termorezistentní bakterie, které přežívají šetrnou pasteraci mléka. Známé jsou také biofilmy vytvořené na výměnkových deskách pasterizačního zařízení, které mohou být dalším zdrojem NSLAB např. druh *Streptococcus thermophilus*. Některé NSLAB jsou pasterací poškozeny jen subletálně, a proto se mohou v pasterizovaném mléku a mladém sýru obnovit a začít rozmnožovat. NSLAB mohou negativně i pozitivně ovlivňovat kvalitu sýra. Přispívají především k rozvoji chuti a v mnoha případech jsou považovány za žádoucí složku zrajících sýrů. Mezi NSLAB izolovaných ze sýrů patří např. *Lactobacillus casei*, *Lb. paracasei*, *Lb. curvatus*, *Lb. plantarum* [1]. NSLAB mohou po jejich selekci sloužit jako součást startovacích, příp. doplňkových kultur, přičemž jejich role může být např. produkce kyseliny mléčné, protektivní a probiotický účinek atd. Využití selektovaných NSLAB jako doplňkových kultur v sýrařství však musí splňovat dva základní předpoklady: (i) použitý kmen nebo směs kmenů nesmí negativně ovlivňovat proces zrání a reakce související s proteolýzou bílkovin, (ii) doplňkové kultury by měly inhibovat růst a účinky ostatních NSLAB [1,9].

1.2.1 Rod *Lactococcus*

Rod *Lactococcus* jsou gram pozitivní koky. Vyznačují se homofermentativním metabolismem a produkcí L(+) kyseliny mléčné. Největší měrou jsou v syrovém mléce, sýrech a jiných mléčných produktech zastoupeny druhy *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* a *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*. Rod *Lactococcus* se běžně vyskytuje na rostlinách a kůži zvířat. *Lc. plantarum* byl izolován zejména z rostlin, *L. garvieae* z ryb, zvířat a mléka a *L. pisium* z lososa [11]. Rod *Lactococcus* je široce rozšířen v přírodě a v poslední době se zvyšuje zájem o využití potenciálu nových kmenů izolovaných z různých přírodních ekosystémů pro výrobu aromatických sloučenin [12].

Ve starší literatuře nacházíme mléčnou skupinu streptokoků pojmenovanou *Streptococcus lactis*, *Streptococcus lactis* ssp. *diacetylactis*, *Streptococcus cremoris*, *Streptococcus lactis* ssp. *holandicus* apod. Důvody shrnutí některých rodů *Streptococcus* (*Lactococcus*) do jednoho druhu *Lactococcus lactis* jsou následovné: *Lactococcus lactis* ssp. *diacetylactis* má všechny hlavní vlastnosti společné s druhem *Lactococcus lactis*, ale má navíc významné vlastnosti fermentovat citrát na aromatickou látku diacetyl a CO₂. Tato vlastnost je podle nových poznatků regulována plazmidem [1,13].

Druh *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* je v mlékárenství nejvíce rozšířeným mikroorganizmem. V čerstvém za hygienických podmínek nadojeném mléce se velmi dobře rozmnožuje, až může způsobit zkysnutí. Je neodmyslitelnou součástí používaných čistých mlékařských kultur na výrobu některých kysaných mlék, smetan a na výrobu většiny druhů sýrů buď jako jediná kultura, anebo spolu s jinou specifickou skupinou mikroorganismů. Buňky mají vejčitý tvar v průměru 0,5-1,0 μm a vyskytují se většinou v párech nebo v krátkých řetězcích. Rostou v rozmezí teplot 10-40 $^{\circ}\text{C}$ a optimální teplota růstu je okolo 30 $^{\circ}\text{C}$. Charakteristické je, že nefermentuje sacharózu anebo jen v nepatrné míře. V mléku tvoří 0,8-0,9 % kyseliny mléčné. Méně než 10 % metabolitů jsou těkavé kyseliny, zejména kyselina octová. Kyselinu citronovou neštěpí, netvoří acetoin, diacetyl ani CO_2 . *Lactococcus lactis* štěpí pepton za tvorby amoniaku, kasein v neutrálním prostředí štěpí jen nepatrně. V médiu s obsahem 4 % NaCl roste dobře, ale médium s obsahem 6,5 % NaCl inhibuje jejich růst [1,13].

Druh *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* je průmyslově důležitý mikroorganismus, který se používá jako startovací kultura při výrobě mnoha druhů sýrů a dalších mléčných výrobků [14]. Pokud bychom srovnali oba poddruhy pak *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* má ve srovnání s *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* o něco nižší optimální teplotu růstu (přibližně 28 $^{\circ}\text{C}$). Dále tvoří měřitelné množství CO_2 , laktózu fermentuje pomaleji, morfologicky se vyznačuje zpravidla většími buňkami 0,6-1,0 μm , které zůstávají u sebe ve směru jejich dělení, proto vznikají dlouhé řetězky často z 20 a více buněk. Tvorba dlouhých řetězků je charakteristická pro čerstvé kultury pěstované v mléku. U starších kultur se řetězky rozpadávají na páry. Některé kmeny tvoří sliz. V mléku tvoří asi 0,7 % kyseliny mléčné. Jako homofermentativní bakterie mléčného kvašení tvoří málo vedlejších produktů, přičemž tvorba CO_2 je proměnlivá. Vytváří také málo acetoinu a diacetylu. Roste v médiu s obsahem 2 % NaCl, ale pokud je obsah vyšší než 4 % NaCl, pak v tomto prostředí neroste.

Je proto typickým smetanovým nebo mléčným streptokokem, ne však univerzálním sýrařským mikroorganizmem, protože v sýrech bývá vyšší koncentrace NaCl. Nejvyšší specifická míra růstu je při pH 6,3-6,9 [1,13].

1.2.2 Rod *Lactobacillus*

Rod *Lactobacillus* patří do velké skupiny BMK jedná se také o gram pozitivní organizmy. S více než 100 druhy a poddruhy. Rod *Lactobacillus* představuje největší skupinu v rodině

Lactobacillaceae. Členové rodu jsou ve tvaru tyčinek, často uspořádány v řetízci. Jsou fakultativně aerobní, ale dobře rostou i za anaerobních podmínek. Laktobacily jsou spojeny s výrobou potravin, pro zlepšení chuti, vůně a textury popř. nutriční hodnoty. Jejich konzervační účinek je dán okyselením způsobený fermentací pentóz, hexóz na kyselinu mléčnou. Laktobacily se používají jako startovací nebo doplňkové kultury pro výrobu různých druhů sýrů, fermentovaných rostlinných potravin, fermentovaného masa, na výrobu piva a vína, kynutého pečiva a siláže. Způsobují rychlý pokles pH v surovině díky produkci kyseliny mléčné. Laktobacily se v současnosti využívají také pro přípravu probiotických preparátů, kde se vyskytují nejčastěji druhy *Lbc. acidophilus*, *Lbc. casei*, *Lbc. lactis*, *Lbc. reuteri*, *Lbc. plantarum*, *Lbc. brevis*. Probiotika ovlivňují zdravotní stav člověka několika způsoby. Mohou působit svou vlastní přítomností, vytěsňovat svým růstem patogenní mikroorganismy jako jsou *Helicobacter pylori*, *Salmonella* ssp., *Listeria monocytogenes*, *Clostridium difficile* apod. a to např. soutěžením o živiny, adhezními místy na střevním epitelu nebo tvorbou antimikrobiálních látek (bakteriocinů, peroxidu vodíku, organických kyselin a dalších). Bakteriociny jsou proteinové sloučeniny, schopné inhibovat mnohé gram pozitivní bakterie, zabraňují kažení a růstu patogenních bakterií, a jsou aktivní zejména proti blízce příbuzným druhům bakterií. Vzhledem k jejich vlivu na růst patogenů, mají bakteriociny potenciální využití jako přírodní konzervační látky. Na druhou stranu je funkčnost zástupců produkujících bakteriociny v průmyslovém zpracování potravin stále zpochybňována. V této souvislosti je žádoucí důmyslnější pochopení vztahů mezi růstem mikroorganismů a produkcí bakteriocinů v závislosti na různých faktorech. Produkce bakteriocinů je ovlivněna převážně hodnotami pH a teplotou. V případě zástupců druhu *Lactobacillus curvatus* byla pozorována silná aktivita vůči patogenu *Listeria monocytogenes*, proto se jeho použití jakožto ochranné kultury jeví jako perspektivní [18]. Důležitá schopnost probiotik je adheze na střevní epitelové buňky a sliznici. Adheze je několika stupňový proces, který není zcela objasněn. Tento proces zahrnuje interakce bakterií stěvnou, které jsou závislé na různých vlastnostech, jednou z nich je hydrofobicita povrchu buněk. Proteolytická aktivita, výroba aromatických sloučenin, bakteriocinů a exopolysacharidů jsou důležité pro kvalitu a nutriční hodnotu konečného výrobku a rozšíření spektra biotechnologických aplikací této významné skupiny BMK [15,16].

Do non-startérové skupiny laktobacilů patří *Lactobacillus curvatus* ssp. *curvatus*, jehož buňky jsou zakřivené, ve tvaru fazolek nebo tyčinek se zaoblenými konci a dosahuje obvykle velikosti 0,7-0,9 μm v některých případech až 2 μm . Vyskytují se v párech nebo

v krátkých řetězcích, mohou být pozorovány i v uzavřených kruzích. Některé kmeny jsou pohyblivé, jiné ztrácí svoji pohyblivost po subkultivaci. Při teplotě 45°C nerostou, ale většina druhů roste v rozmezí teplot 4-42 °C některé i při 2°C. *Lactobacillus curvatus* ssp. *curvatus* je fakultativně heterofermentativní, kyselinu mléčnou produkuje jako přebytek L-(+) izomer [17].

1.3 Využití bakterií mléčného kvašení

Jedním z cílů potravinářského průmyslu je hledání a výběr vhodných kmenů pro dosažení vysoké kvality výrobků. Před použitím kmenů v potravinách je nezbytná jejich spolehlivá identifikace a charakterizace. Pro tyto účely je důležité mít k dispozici rychlé a vhodné metody identifikace cílových mikroorganismů. V současné době se převážně používají molekulárně genetické metody např. PCR (polymerázová řetězová reakce) [6].

BMK jsou široce používány jako startovací bakterie, u nichž je požadovaná technologická funkce spojena se schopností mikroorganismů přeměňovat substráty, např. sacharidy, bílkoviny a lipidy na metabolity, které pozitivně ovlivňují produkt. BMK se používají během výroby fermentovaných mléčných výrobků zejména v případě sýrů a kysaných mléčných výrobků. Fermentované výrobky jsou obvykle vyráběny za použití směsných kultur, které obsahují definované kmeny různých druhů mikroorganismů. Jednokmenové kultury se využívají méně, protože rostou pomaleji v médiu, ale jejich využití není výjimkou. Smíšené kultury (obsahující bakterie i kvasinky) zlepšují chuť a organoleptické vlastnosti určitých druhů potravin (např. kefírového mléka, sýrů s mazem na povrchu) [7].

Při výrobě sýrů je úloha BMK klíčová. Aktivita bakteriálních enzymů má zásadní vliv pro rozvoj chuti a textury sýra v průběhu zrání. Mírné snížení pH mléka podporuje sladké srážení a také ovlivňuje mnoho aspektů během výrobního procesu sýrů, např. inhibuje růst některých patogenů. Výsledné snížení pH přispívá dále k prodloužení údržnosti sýrů. Okyselení mléka je dosaženo fermentací laktózy metabolizmem BMK. Většina sýrů je vyráběna za použití selektovaných kultur, které dodávají sýrům žádoucí vlastnosti. Mezi hlavní druhy, které jsou součástí startovacích kultur používaných při výrobě sýrů, se řadí *Lactococcus lactis*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus delbrueckii* a *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *dextranicum* [2].

Hlavní biochemické procesy doprovázející zrání sýru lze rozdělit na primární děje, které zahrnují metabolismus laktózy, laktátu a citrátu, lipolýzu (konečným produktem jsou volné

mastné kyseliny) a proteolýzu. Následně probíhají sekundární biochemické děje, které jsou důležité pro vlastní vývoj senzorycky aktivních sloučenin a zahrnují zejména metabolismus volných mastných kyselin a aminokyselin [57].

Během výroby sýrů dochází k fermentaci laktózy BMK na kyselinu mléčnou za současného snižování hodnoty pH sýřeniny, čímž se podpoří synerese (vytékání kapaliny z gelu). Voda vázaná na kasein se snižujícím se pH postupně přechází na vodu volnou, kterou je potom možné odstranit lisováním. Zásadní podpůrný dopad na prokysání sýřeniny má také použití zvýšené teploty během dohřívání a dosoušení. Sýřenina dále prokysává také během lisování. Nízká hodnota pH sýřeniny a málo disociovaná kyselina mléčná inhibuje růst a metabolismus nežádoucích kontaminujících bakterií z čeledi *Enterobacteriaceae* [1,10].

V sýrech s nízkodohřívanou sýřeninou vyráběných pomocí mezofilních kultur, je na řezu požadovaná tvorba 3-5 ok velikosti hrachu. Oka jsou tvořené oxidem uhličitým (CO_2), která jsou produkována zákysovémi bakteriemi. Hlavním zdrojem uhlíku pro tvorbu CO_2 v sýrech s nízkodohřívanou sýřeninou, jsou citráty mléka. Citráty jsou fermentovány aromatickými koky mezofilního zákyso, často nazývané jako citrát využívající (Cit^+) koky, které produkují kromě CO_2 i čtyřuhlíkaté sloučeniny, z nich diacetyl je nositelem typického aromatu. Mezi aromatické koky patří např. *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* biovar *diacetylactis*, *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *cremoris*, *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *dextranicum*. Příkladem poměrně vysoké produkce oxidu uhličitého je aktivita *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* biovar *diacetylactis*, který za vhodných podmínek tvoří v mléku 15-20 obj. % CO_2 . Z jedné molekuly kyseliny citronové vznikne po jedné molekule kyseliny octové, kyseliny pyrohroznové a CO_2 . Při přeměně dvou molekul kyseliny pyrohroznové na aceton a diacetyl vzniknou další dvě molekuly CO_2 . Jedná se o metabolismus citrátu [1,10].

Rozklad bílkovin (proteolýza) je charakteristickým znakem zrání polotvrdých sýrů. Na proteolýze se podílí syřidlo, extracelulární enzymy BMK (příp. nezákysové BMK) a plazmin (nativní proteáza mléka). Proteolytická aktivita plazminu je ve významné míře závislá na hodnotě pH prostředí. Má významnou úlohu při zrání sýrů s vyšší hodnotou pH (např. sýry ementálského a holandského typu). Nejprve je parakaseinu štěpen syřidlem, toto primární naštěpení pak urychluje působení extracelulárních enzymů, které štěpí polypeptidy na polypeptidy s nižší molekulovou hmotností. Vzniklé kratší oligopeptidy zejména dipeptidy a tripeptidy, mohou být intracelulárně hydrolyzovány pomocí endo a exopeptidáz (např. aminopeptidázy, di a tripeptidázy) primárních a sekundárních zákysových kultur nebo BMK nezákysového původu. Peptidy se vyznačují výraznými chuťovými vlast-

nostmi, které je možné zařadit do čtyř základních skupin (kyselá, slaná, hořká a umami). Některé peptidy mohou způsobovat hořkou chuť sýrů. Významná tvorba hořkých peptidů může být přisuzována např. rodům *Lactococcus*, díky jejich proteolytickým enzymům v buněčných stěnách. Pomocí enzymatického aparátu mohou být aminokyseliny dále katabolizovány za vzniku nejrůznějších sensoricky aktivních látek. Druhou cestou kde mohou být aminokyseliny využity, je syntéza proteinů, avšak biosyntéza je možná pouze u vitálních buněk. Konečným produktem proteolýzy jsou volné aminokyseliny (FAA). Jejich koncentrace závisí na druhu sýra, použité výrobní technologii a podmínkách zrání. Ve většině případů neovlivňují vývoj aroma sýru přímo. Mnohem významnější z hlediska vlivu na organoleptické vlastnosti sýru je konverze FAA na sensoricky aktivní látky (amoniak, aminy, karbonylové sloučeniny, fenol, alkoholy atd.), a to prostřednictvím intracelulárních enzymů mikroorganismů. Schopnost produkovat sensoricky aktivní sloučeniny z aminokyselin je silně i druhově a dokonce i kmenově závislá. Ze složitého komplexu reakcí lze jmenovat např. tyto: transaminace, deaminace, dekarboxylace za vzniku biogenních aminů a další [1,8,57].

2 VÝZNAM SOLI V PŘÍRODNÍCH SÝRECH

Obsah soli (NaCl) v sýrech se pohybuje v rozmezí od 0,7 do 6 % (v některých případech i nad 6 %), přičemž konkrétní obsah soli je závislý na druhu sýra. Nízký obsah soli mají zejména čerstvé sýry do 1,5 % NaCl, do této skupiny můžeme zahrnout i tvrdý sýr Gruyere s obsahem soli 1,1 % nebo sýry ementálského typu s obsahem 0,7 %. Střední obsah soli mají sýry s nízkodohřívanou sýřeninou 1,5-3,0 % např. Eidam, Gouda i sýry čedarového typu. Vyšší obsah soli mají sýry s plísní v těstě (např. Niva, Roquefort) nebo Olomoucké tvarůžky a to přibližně do 6 %. Další skupinu představují sýry zrající v solném nálevu (např. sýr Domiatti, Feta, Balkánský sýr nebo sýr Akawi) s obsahem soli nad 6 %.

Sůl v sýrech má tři důležité funkce: může přispívat k minimalizaci kažení a prevenci růstu patogenů, přímo přispívá k chuti a textuře sýrů a je zdrojem sodíku v potravě. Spolu s požadovanou hodnotou pH, aktivitou vody a hodnotu redox potenciálu, sůl pomáhá při konzervaci sýrů. Kromě výše zmíněných funkcí má obsah NaCl vliv na enzymatickou aktivitu a biochemické změny jako je metabolismus laktózy, kyseliny mléčné, citrátu dále proteolýza, lipolýza a hydratace parakaseinu, ke kterým dochází v průběhu zrání. Mnoho faktorů ovlivňuje příjem a distribuci NaCl v sýrech a přesné řízení těchto faktorů je důležitou součástí při průmyslové výrobě sýrů a zajištění tak jednotné a optimální kvality [10,19,20].

Denní spotřeba sodíku pro dospělého člověka je v rozmezí 2,4-6 g na den. Dietární příjem sodíku ve stravě je v dnešní době příliš vysoký, je dvakrát až třikrát vyšší než je doporučené množství pro žádoucí fyziologické funkce. Nadměrný příjem sodíku může způsobovat nežádoucí fyziologické změny, z nichž nejvýznamnější je hypertenze a zvýšení vylučování vápníku což může vést k osteoporóze. Nicméně, v sýrech je relativně malý příspěvek denního množství sodíku s výjimkou případů, kdy jsou konzumovány vysoká množství NaCl, a to zejména u vysoko solených sýrů např. Feta a Domiatti [10,19].

2.1 Solení sýrů

Výroba sýrů je převážně proces dehydratace a acidifikace, kdy se snižuje hodnota pH v mléce z 6,6 na 4,6-5,4 v čerstvé hmotě sýra. Solení má vliv nejen na výslednou chuť, ale ovlivňuje aktivitu kultur a enzymů během zrání sýrů. Zvýšením osmotického tlaku v prostoru mezi zrny a působením na bílkoviny se zvyšuje množství uvolněné syrovátky. Dále se solením zpevňuje povrch sýrů. NaCl proniká do sýrů difuzí, osmotické jevy se

uplatňují na povrchu sýrových zrn. Efektivní difuzní koeficient je však nižší než difuzní koeficient NaCl ve vodě. Difuzi může zpomalit např. vyšší viskozita, protitok ostatních látek a tukové kuličky, které blokují kanálky mezi zrny [8,20,21].

Rozlišujeme 4 způsoby solení:

- Solení do mléka – výhodou tohoto způsobu solení je dokonalé rozptýlení NaCl a slouží ke kontrole mikroflóry mléka. Přídavek soli do mléka před sýřením výrazně zhoršuje synerezi sýřeniny z hmoty sýra a vede k příliš vysoké hladině vlhkosti v konečném výrobku. Nežádoucími účinky přídavku soli do mléka je výsledný nárůst hydratace kaseinu, což zhoršuje kaseinovou agregaci tento jev je způsoben rozpuštěním koloidního fosforečnanu vápenatého. Tento způsob solení se využívá např. u typu Domiatti, kde se část NaCl přidává do mléka [20,22].
- Solení do zrna – jedná se o přímé přidání a míchání krystalů soli do rozkrájené, pomleté nebo rozbité sýřeniny na konci zpracování před formováním. V případě čedaru dochází k solení až po vylisování a následnému rozmělnění sýřeniny. Tento proces se nazývá čedarizace. Solení do zrna umožňuje zařadit solení do vlastní výrobní linky, mechanizace celé výroby je velmi usnadněna. Sůl se rozpouští ve vlhké sýřenině a proniká do částic rozkrájené sýřeniny. Napomáhá k vytužení zrna a uvolněná syrovátka rozpouští další krystaly NaCl. Vzniká přesycený roztok kolem každé částice. Výsledkem je rovnoměrné prosolení v krátké době 10-20 minut [8,21].
- Solení na sucho – při tomto způsobu se roztírá suchá sůl na povrch vyformovaných sýrů. Povrch sýra je v přímém kontaktu se solí, čímž dojde ke smrštění bílkovin a zpomalení pohybu soli. Solení na sucho se musí u větších sýrů vícekrát opakovat. Používá se sůl s většími krystaly, pokud bychom použili krystaly malých rozměrů, sůl by se rychle vstřebala a vytvořila by se kůra na povrchu sýrů. Solení na sucho se používá u sýrů s plísní v těstě (Roquefort, Niva). U sýrů s plísní na povrchu (Camembert, Hermelín, Brie) se solí kontinuálně nástřikem suché soli [19,21].
- Solení v solné lázni – tímto způsobem se u nás solí většina druhů sýrů např. eidam, gouda. Probíhá zde difuze soli dovnitř, která trvá podle velikosti sýrů několik hodin až dnů. Při solení v solném roztoku je nutné pravidelně kontrolovat koncentraci roztoku, teplotu lázně, kyselost a také bakteriologickou čistotu. Koncentrace solné lázně se pohybuje nejčastěji v rozmezí 18-22 %, pH solné lázně je 5,2 pro tvrdé sýry, 4,8-5,0 pro měkké sýry. Žádoucí je i obsah vápníku 0,1-0,2 %. Teplota solení se

většinou pohybuje mezi 10-14 °C. Doba solení závisí na velikosti a tvaru sýra a také na jeho požadovaném obsahu NaCl. Sýry by měly být vkládány do solné lázně řádně prokysané, u tvrdých a polotvrdých sýrů pH kolem 5,4. Sýry s vysokým pH vstřebávají méně soli, byly by příliš měkké. Naopak u sýrů s nízkým pH bude konzistence tuhá a křehká [8,19,20,21].

2.2 Faktory ovlivňující množství vstřebávání soli

Množství soli absorbované během solení je ovlivněno mnoha faktory. Mezi nejdůležitější faktory patří koncentrace NaCl a koncentrační gradient, čas solení, teplota sýřeniny a solného roztoku, geometrie sýra, počáteční rovnováha mezi poměrem S/V (sůl/vlhkost) v sýřenině, počáteční vlhkost sýřeniny a pH sýřeniny a solného roztoku [19].

- Koncentrace NaCl a koncentrační gradient – vyšší hladiny chloridu sodného v solném nálevu způsobují vyšší míru vstřebávání soli a zvýšení hladiny S/V v sýru. Difuze NaCl se šíří prostřednictvím sýra a je vždy ovlivněna koncentrací solného roztoku. Rychlost absorpce se zvyšuje a snižuje s rychlostí koncentrace solného roztoku v rozmezí 5 až 20 %. Ale zvýšení koncentrace NaCl až na výši 25 % v solném nálevu může způsobit snížení množství absorbované soli v závislosti na pH sýra před uložením do solného roztoku. Tento účinek je pravděpodobně spojen s dehydratací v povrchové vrstvě, která brání vstřebávání soli [19,24].
- Čas solení – doba solení se řídí nejen velikostí sýra, ale především jeho druhem, např. čerstvé sýry se solí 8-15 minut, romadúr 2-3 hodiny, holandská cihla 48 hodin a moravský blok až 72 hodin [41].
- Teplota solného roztoku – nemá být závislá na teplotě okolí. Solná lázeň má být podle potřeby temperovaná na požadovaný stupeň teploty ochlazením nebo přehříváním. Vyšší teplota solné lázně vysolení sýra urychluje, naopak nižší teplota vysolení zpomaluje. U nedokysaných sýrů, kde je potřeba zajistit teplotu vhodnou pro rozvoj mezofilní kultury, je teplota solné lázně po dobu prokysání udržována na 18-20 °C. Druhý den jsou už sýry prokysané a teplotu solného roztoku je možné snížit na 10-12 °C [25,41].
- Geometrie sýra – absorpce soli se zvyšuje s rostoucí plochou bloků sýrů. U solení do zrna (čedarizace) dojde k absorpci soli současně a čas potřebný k vyrovnání množství soli je podstatně nižší než v případě sýrů solených v solném roztoku. Pronikání soli ze solného roztoku do sýra, se vztahuje na plochu bloků sýrů. U sýrů

Romano (italské sýry) s podobným poměry S/V, je pak rychlost absorpce soli u obdélníkového tvaru sýrů vyšší než u válcového tvaru sýrů [19].

- Počáteční rovnováha S/V v sýřenině a předsolení – solení sýrů v solných lázních bývá nákladný proces, což se týče prostoru, nákladů na údržbu a korozivitu solným roztokem. V důsledku toho se může provádět předsolení vedoucí ke snížení času solení. Předsolení zvyšuje hladinu soli v sýřenině, až dojde ke zvýšení rovnováhy S/V např. u Goudy [19,24].
- Počáteční obsah vody – jak sůl prostupuje do sýra, přitahuje vodu ze středu sýra, solný roztok se zředí a vyrovná sušinu sýra. Toto pásmo se nazývá výměnné. Solení musí probíhat pozvolně, aby se nevytvořila příliš tvrdá popř. křehká kůra na povrchu sýrů [41].
- pH sýřeniny a solného roztoku – je žádoucí, aby solná lázeň měla určitý stupeň kyselosti. K výměně látek mezi sýrem a solnou lázní dochází pomocí difuze. Množství látek vzájemně se vyměňujících se nazývá difuzní spád. Jedná se o prostup NaCl osmózou přes polopropustnou membránu (povrch sýrů) do roztoku s nižší koncentrací NaCl. Naopak difuzí přechází ze sýra z míst vyšší koncentrace voda a v ní rozpustné štěpy bílkovin, laktóza, kyselina mléčná a kyselina fosforečná do míst s nižší koncentrací vody a vyšší koncentrací NaCl. Na kyselosti solné lázně pak závisí doba solení a jakost výrobku. Titrační kyselost (SH) nemá takový vliv na průběh solení jako aktivní kyselost udávaná v pH. Vztah mezi pH a SH solných lázní není lineární a nemá každá lázeň při stejném SH stejné pH a naopak. To závisí na tzv. pufrovací schopnosti solné lázně tj. obsahu minerálních látek a rozkladných produktů bílkovin, přicházejících ze sýra do solné lázně. Okyselení má konzervační účinek a také minimalizuje riziko povrchových vad (např. vzniku kůry na povrchu sýra) spojené se ztrátou H^+ iontů. Je možné, že nadměrné snížení pH solného roztoku např. na hodnotu 4,6 by vedlo k vysoké ztrátě vody z povrchu sýra, což by snížilo příjem soli. Kyselost solné lázně se má pohybovat na stejném pH jako sýr vložený k prosolení tj. pro tvrdý sýr pH 5,2, pro měkký sýr pH 4,8-5,0 [1,19,41].

Průnik soli do sýra v solné lázni nebo při solení na sucho, se uskutečňuje na jeho povrchu. Mezi obsahem soli v solné lázni (nebo na povrchu sýrů) a obsahem soli v sýru pod jeho povrchem musí být dostatečný koncentrační spád. Při vyrovnání obou koncentrací by se proces osmózy zastavil. Proto musí solení probíhat takovou intenzitou, aby sůl prostupující do sýra měla čas proniknout do nevysoleného jádra. Ustanovení rovnováhy S/V je dosaže-

no až v průběhu zrání, v závislosti na typu sýrů, velikosti a lisovacích podmínkách, např. 10-12 dní u sýru Limburger (měkký sýr), 8-12 týdnů pro Goudu, 4-6 týdnů pro sýry eidamského typu. Rozdíly v době potřebné pro vyrovnání koncentrace soli v celém bloku sýra jsou dále ovlivněny rozměry sýrů, poměru povrchu k objemu, ve složení a nakládání do solného nálevu (které mohou mít vliv na složení sýrů a distribuci soli a vlhkosti v koncentraci solného nálevu). Koncentrace soli v solné lázni jsou pro sýry ementálského typu 22 %, pro holandské sýry 17-18 %. Pro tvrdé a polotvrdé sýry se volí nižší teplota solné lázně 12-14 °C, pro měkké sýry je teplota 14-20 °C [1,10].

2.3 Funkce soli v sýrech

Sůl hraje důležitou roli v regulaci mnoha aspektů u sýrů a mléčných výrobků. Hlavní funkcí NaCl je podpoření bariérového efektu v sýrech a dodání chutě. Chuť soli je vysoce cenná a slanost je považována za jednu ze čtyř základních chutí. Lze předpokládat, že charakteristická chuť NaCl je dána sodnými kationty, protože KCl má výrazně odlišnou chuť ve srovnání s NaCl. Nesolený sýr není chutný a je přirozeně nevýrazný. NaCl má dále vliv na vodní aktivitu a správné solení podporuje růst určité mikroflóry. Obsah soli má zásadní vliv na složení sýrů, dynamiku růstu přítomné mikroflóry, proteinovou hydrataci a enzymatickou činnost, čímž ovlivňuje rychlost zrání, texturu, chuť a v neposlední řadě kvalitu sýrů [22,41].

2.3.1 Aktivita vody

Konzervační účinek NaCl v sýru je dán díky jeho účinku na vodní aktivitu (a_w). Po nasolení dojde ke snížení vodní aktivity a sýr se stává trvanlivější. NaCl zvyšuje osmotický tlak vodní fáze potravin, až dojde k dehydrataci bakteriálních buněk, a tím k jejich usmrcení nebo alespoň potlačení růstu. Během zrání sýrů jsou produkovány některé sloučeniny např. aminokyseliny, krátké peptidy a mastné kyseliny. Vznikem těchto sloučenin dochází také ke snížení aktivity vody. Většina druhů sýrů nemá dostatečně nízkou a_w , aby zabránily růstu kvasinek, plísní a některých patogenních bakterií. a_w spolu s nízkou hodnotou pH a nízkou teplotou je velmi účinnou kontrolou mikrobiálního růstu starterových a non-starterových bakterií mléčného kvašení. Poslední uvedené bakterie jsou obecně neškodné, ale ve vysokém počtu mohou být nežádoucí. Mohou přispět k nepředvídatelné chuti a racemizaci L(+) laktátu na D(-) laktát za tvorby nerozpustné soli s vápníkem, což jsou mléčně zbarvené krystaly laktátu, které se objevují jako bílé skvrny na sýru. Růst mezofilních

(např. *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*) a termofilních (např. *Streptococcus thermophilus*) starterových kultur bakterií mléčného kvašení v sýřenině je výrazně ovlivněn koncentrací NaCl, jak ukazují změny v populaci hustoty, využití laktózy nebo snižování pH sýřeniny během výroby sýrů. Starterová aktivita je stimulována 2 % obsahem NaCl. Citlivost starterových kultur na koncentraci soli se výrazně liší. Druh *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* je obecně tolerantnější k vyššímu obsahu NaCl než druh *Streptococcus thermophilus* [22,23].

2.3.2 Texturní a reologické vlastnosti sýrů

Textura jsou všechny mechanické, geometrické a povrchové vlastnosti výrobku vnímatelné prostřednictvím mechanických, hmatových, případně zrakových a sluchových receptorů [40]. Má prvořadý význam pro hodnocení oblíbenosti sýrů u konzumenta. Je nutné brát v úvahu změny textury během zrání sýrů, jež souvisejí také s požadovanými změnami chuti a vůně. Změnami během zrání prochází bílkoviny, sacharidy, v pozdějších etapách zrání i tuky. Textura se mění také vysycháním sýrové hmoty v průběhu zrání. NaCl má velký vliv na reologii a texturu sýrů. Sýr bez soli je měkký, pastovitý a lepkavý v závislosti na délce zrání. Naopak vysoké koncentrace soli vedou ke tvrdosti, suchosti, tyto vlastnosti byly pozorovány u vysoko solených sýrů např. Feta a Domiati [22,23,39].

Koncentrace NaCl a rovnováha S/V má vliv na reologické vlastnosti jako je např. pevnost, křehkost a pružnost. Tvrdost je mechanická vlastnost textury vztahující se na sílu potřebnou k dosažení dané deformace nebo penetrace výrobku. Zvýšení S/V v rozmezí 0,4-12 % má za následek zvýšení pevnosti a smykové tvrdosti různých sýrů. Zvýšení pevnosti lze částečně přičíst doprovázejícím změnám ve složení např. snížení obsahu vlhkosti a zvýšení obsahu proteinu, hydrataci parakaseinu. Účinky mohou dále souviset s růstem pH a rozsahem proteolýzy. Rozdíly ve stupni hydratace a kaseinové agregace jsou ovlivněny měnícím se obsahem soli, který by mohl změnit poměr mezi viskózní a elastickou složkou v sýrech [19].

3 BIOGENNÍ AMINY

Biogenní aminy (BA) jsou bazické dusíkaté sloučeniny, tvořené řadou mikroorganismů vykazující dekarboxylázovou aktivitu z odpovídajících aminokyselin, nebo aminací a transaminací aldehydů a ketonů. Nízká koncentrace BA může být lidským tělem tolerována, pokud jsou účinné detoxikační mechanismy ve střevním traktu. Na detoxikaci se podílí enzymy monoaminoxidázy a diaminoxidázy. Jestliže však nastane nadměrný příjem některého biogenního aminu, jsou katabolické funkce potlačeny a dochází k fyziologickým poruchám. Jedná se zvláště o nežádoucí vazoaktivní a psychoaktivní účinky [31,38]. Nejdůležitější BA nalezené v potravinách jsou histamin (His), tyramin (Tyr), putrescin (Put), kadaverin (Kad), β -fenyletylamin (Phe), spermidin (Spd) a spermin (Spn). BA jsou přítomny skoro ve všech potravinách především v těch s vysokým obsahem proteinů. Nedostatek hygieny v rámci výrobního procesu, resp. nedodržení správné výrobní praxe může vést k přítomnosti a aktivitě nežádoucí mikroflóry v průběhu zrání sýrů za současné produkce BA. Některé druhy bakterií (čeleď *Enterobacteriaceae* nebo některé kmeny rodů *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Micrococcus*, *Enterococcus* a *Pseudomonas*) jsou schopny produkovat BA dekarboxylázovou aktivitou. Produkce BA je vlastnost specifická spíše pro určité kmeny bakterií než vlastnost typická pro daný druh, tudíž různé kmeny téhož druhu se mohou lišit v intenzitě v produkci BA. BA mohou být také produkovány bakteriemi mléčného kvašení, které jsou běžně používány pro technologické účely jako startovací, příp. doplňkové kultury. Bakterie mléčného kvašení jsou používány v rámci biotechnologického procesu výroby sýrů jako zákysové kultury [28,29,30,33]. Obecně lze říct, že produkce BA během zrání sýrů je jev nežádoucí a mělo by se tomuto procesu předcházet. V tabulce 1 je znázorněno rozdělení BA [29].

Tabulka 1: Rozdělení biogenních aminů

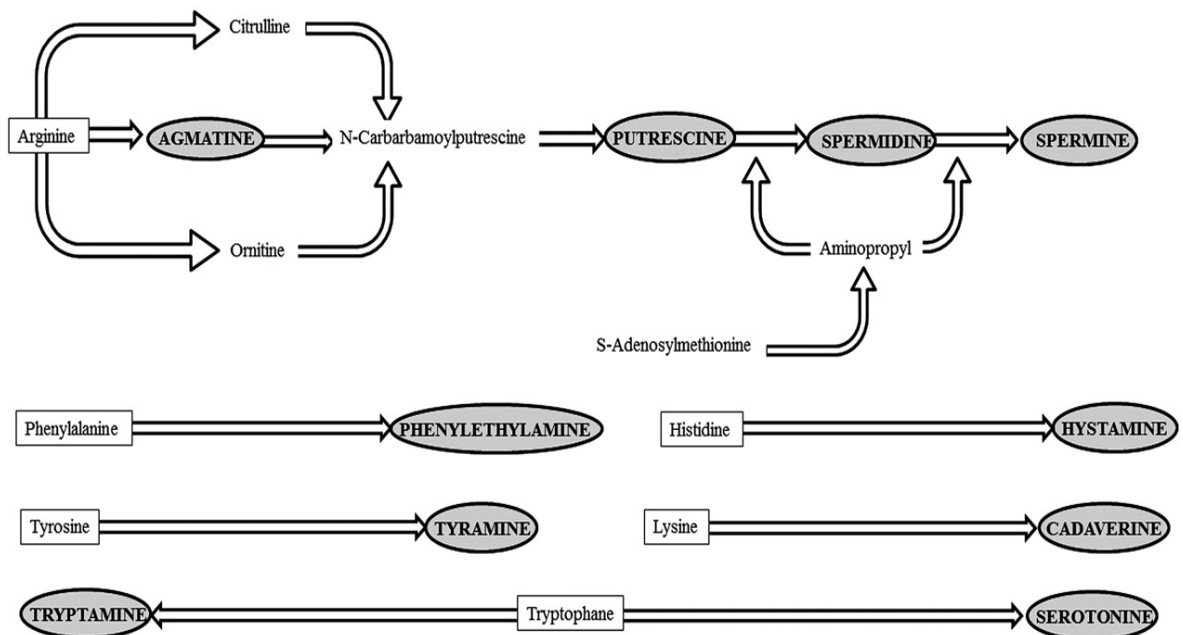
Klasifikace	podle chemické struktury	Podle počtu amino skupin
aromatické aminy – His, Tyr, Ser, Phe, Trp	alifatické – Put, Kad	monoaminy – Tyr, Phe
alifatické diaminy – Put, Kad	heterocyklické – His, Trp	diaminy – His, Put, Kad
Alifatické polyaminy – Spd, Spn, Agm	aromatické – Tyr, Phe	triaminy - Agm

3.1 Dekarboxylázová aktivita

BA jsou přítomné ve všech živých organizmech a jsou pro organismus nepostradatelné. Mají vliv na proliferaci buněk, slouží jako zdroj dusíku nebo jako prekurzory některých hormonů, plní funkci neurotransmiterů v centrálním nervovém systému. V nadlimitních koncentracích však mohou mít na organismus negativní vliv. V potravinách a krmivech představují BA jedny z nežádoucích metabolitů konečného rozkladu bílkovin. Z hlediska potravin a výživy je rozhodující cestou pro vznik BA dekarboxylace aminokyselin působením enzymů některých bakterií. Dekarboxylace je děj, kdy dochází k odštěpení karboxylové skupiny za tvorby CO_2 , účinný enzym se nazývá dekarboxyláza. Pyridoxal-5-fosfát působí jako kofaktor dekarboxyláz. Histidin dekarboxylázy lze rozdělit do dvou skupin, které pocházejí: (i) z eukaryotických buněk a gram-negativních bakterií, které vyžadují kofaktor pyridoxal-5-fosfátu, (ii) a z grampozitivních bakterií, které využívají kovalentně navázaný pyruvoyl jako součást prostetické skupiny [31].

Nejdůležitější BA jsou His, Tyr, Put, Kad a Phe, což jsou produkty dekarboxylace histidinu, ornitinu, tyrozinu, lyzinu a fenylalaninu. Putrescin může být vytvořen deaminací agmatinu [29].

Obrázek 1: Vznik biogenních aminů z příslušných aminokyselin [29]



3.2 Faktory ovlivňující produkci BA

Hlavními předpoklady pro vznik BA v potravinách je dostupnost volných aminokyselin, přítomnost mikroorganismů produkujících BA (ze surovin nebo přidávaných starterových kultur) a podmínky umožňující jejich růst zejména teplota, pH, NaCl, aero-/anaerobióza a dostupnost zdrojů uhlíku (např. glukózy). Stejně jako podmínky ovlivňující produkci a aktivitu enzymu [33,34].

3.2.1 Dostupnost volných aminokyselin

BA se vyskytují téměř v každé v potravíně, která obsahuje určité množství volných aminokyselin. Autolytická nebo bakteriální proteolýza může hrát významnou roli v uvolňování volných aminokyselin z proteinů, které slouží jako substrát pro dekarboxylázové reakce [32,37,38]. Zrání sýrů zahrnuje celou řadu biochemických procesů (rozklad laktózy, lipolýzu a proteolýzu). Na procesu zrání se podílejí starterové BMK a další přítomná mikroflóra, která obsahuje non-starterové BMK. Starterové BMK přispívají k rozkladu proteinů, zatímco non-starterové jsou zodpovědné zejména za peptidolýzu a uvolnění volných aminokyselin. Zrání a proteolýza jsou velmi důležitými faktory, které ovlivňují množství BA v sýrech. Rychlost proteolýzy se zvyšuje s dobou zrání, což vede k hromadění volných aminokyselin, které slouží jako substrát pro dekarboxylázovou činnost bakterií. Obecně platí, že čím je delší doba zrání, tím je vyšší obsah BA. Existuje několik studií (Buňková et al. [54]; Ladero et al. [55]), které potvrdily, že dlouho zrající sýry mají vysoký stupeň proteolýzy, což vede k vysokému množství BA nalezených v těchto sýrech v porovnání se sýry, které zrají kratší dobu [36]. Histamin byl detekován v dlouhodobě zrajících sýrech a bylo tak prokázáno, že proteolýza probíhající v období zrání zvyšuje produkci a hromadění histaminu v sýrech [47,56]. Stejný trend byl pozorován také u tyraminu [55].

3.2.2 Přítomnost mikroorganismů s dekarboxylační aktivitou

Přítomnost mikroorganismů produkujících BA je nezbytnou podmínkou pro biosyntézu těchto toxických látek. Akumulace BA ve vysokých koncentracích závisí nejen na přítomnosti těchto mikroorganismů, které musejí být v dostatečném množství, ale také na shodě různých faktorů v průběhu zpracování a skladování mléčných výrobků, např. zvýšení zračí teploty může ovlivnit metabolismus bakteriální mikroflóry, a tím může dojít ke zvýšené aktivitě dekarboxyláz a tudíž ke zvýšené produkci BA. V případě fermentovaných potravin jsou BA, produkovány některými kmeny bakterií mléčného kvašení přítomných ve starte-

rových kulturách nebo tvořící součást přidružené sekundární mikroflóry [47]. Burdychová a Komprda [43] izolovali *Lactobacillus helveticus*, který produkoval histamin, a byl identifikován jako startovací kultura pro výrobu sýrů. Ve zrajícím sýru byly také izolovány druhy *Lactobacillus* ssp. a byla prokázána jejich produkce tyraminu (Ladero et al. [55]). Jako možné východisko pro snížení obsahu BA ve zrajících sýrech je možné použití kultur s aminooxidázovou aktivitou, která snižuje koncentraci BA, např. *Brevibacterium lineans* může snižovat obsah tyraminu a histaminu v průběhu zrání některých skupin sýrů [43,44,46]. Minimalizace výskytu mikroorganismů produkujících BA, lze dosáhnout zajištěným dobrého hygienického stavu surovin, a pokud možno další mikrobiální kontroly během celého výrobního procesu. Je také důležité, aby starterové kultury používané při výrobě fermentovaných potravin, byly prosté mikroorganismů s dekarboxylázovou aktivitou [34].

3.2.3 Vliv pH

pH je klíčový faktor ovlivňující dekarboxylázovou aktivitu. Tvorba BA bakteriemi s dekarboxylázovou aktivitou je fyziologický mechanismus pro vyrovnání kyselého prostředí. Dekarboxylázová činnost aminokyselin je silnější v kyselém prostředí, a proto se optimální hodnota pH pro produkci BA pohybuje v rozmezí 4-5,5. Optimální úroveň pH pro syntézu tyraminu je 5,0. Tato hodnota se také shoduje s optimem pro dekarboxylaci histidinu [35,42,45].

3.2.4 Teplota

Teplota prostředí významně ovlivňuje enzymatickou aktivitu mikroorganismů a tím i potenciální vznik BA. Teplota je důležitý parametr při zpracování sýrů, v průběhu zrání a skladování. Skladování produktu zahrnuje období mezi posledním krokem výroby (zrání) až do data spotřeby. Optimální teplota růstu dekarboxyláza-pozitivních bakterií se pohybuje mezi 20-30 °C. Obecně platí, že produkce a hromadění BA se zvyšuje s rostoucí teplotou během výroby a skladování sýrů. Naopak nízká teplota zrání a skladování (5 °C) snižuje kumulaci BA, jako je histamin, tyramin, putrescin a kadaverin. Optimální tvorba histaminu je značně rozdílná (5-38 °C) a závisí hlavně na druhu produkující mikroflóry [31,36,46].

3.2.5 Vliv NaCl

Dalším faktorem, který by mohl mít vliv na nárůst obsahu BA je koncentrace soli ve fermentovaných výrobcích. Tradičně se sůl používá k regulaci růstu patogenních mikroorganismů během kvašení a zrání mléčných výrobků s cílem zabránit kažení potravin. Dalším důsledkem je snížení rychlosti růstu bakterií, včetně těch produkujících BA, aby došlo ke snížení koncentrace BA [36].

Většina sýrů vyráběných ze syrového mléka, obsahuje vysoké počty *Enterococcus* ssp., který je jeden z hlavních producentů BA. Gardini et al.[45] uvádí, že přidáním vysoké koncentrace NaCl (okolo 5 %) do mléka, které bylo inokulováno kmenem *Enterococcus faecalis*, došlo ke snížení produkce fenyletylaminu a tyraminu na minimum [45]. Podobný účinek koncentrace NaCl byl pozorován u sýrů vyráběných z mléka naočkovaného kmenem *Lactobacillus bulgaricus* nebo *Lactobacillus buchneri* [36,45].

3.2.6 Dostupnost zdrojů uhlíku

Přítomnost zkvasitelných sacharidů např. D-glukózy, zvyšuje dekarboxylázovou aktivitu mikroorganismů. Obsah D-glukózy v rozmezí hodnot od 0,5-2,0 %, představuje optimální koncentraci pro vznik BA. Pokud by obsah D-glukózy, byl vyšší jak 3 % dojde k inhibici dekarboxyláz [46].

3.2.7 Aero-/anaerobióza

Přítomnost kyslíku má významný vliv na biosyntézu BA. Např. *Enterobacter cloacea* produkuje asi poloviční množství putrescinu v anaerobních podmínkách ve srovnání s aerobním prostředím, a *Klebsiella pneumoniae* syntetizuje podstatně méně kadaverinu, ale má schopnost produkovat putrescin za anaerobních podmínek. Redox potenciál v médiu také ovlivňuje produkci BA. Snížením redox potenciálu dojde ke zvýšení produkce histaminu. V přítomnosti kyslíku může dojít k inhibici nebo zničení histidin dekarboxylázy [46].

PRAKTICKÁ ČÁST

4 CÍL PRÁCE

Cíle praktické části lze shrnout do následujících bodů:

- vyrobit modelové vzorky sýrů holandského typu, které se budou lišit použitou kulturou (sledovaným kmenem) a obsahem NaCl,
- založit skladovací pokus modelových vzorků sýrů,
- sledovat změny v matrici modelových vzorků sýrů v závislosti na čase a sledovaných faktorech (biogenní aminy produkující kmen vs. obsah NaCl v matrici přírodního sýra).

5 METODIKA A MATERIÁL

5.1 Výroba modelových vzorků sýrů

Bylo vyrobeno 6 šarží modelových vzorků sýrů holandského typu. Každá šarže obsahovala 24 bloků o hmotnosti 90 g. Technologické operace byly totožné, s výjimkou sledovaného kmene a způsobu solení (viz. tabulka 1). Byly vyrobeny 2 paralelní kontrolní výroby s běžnou komerční kulturou (Laktoflora® - smetanová, sušená Milcom a.s., Česká republika), 2 paralelní výroby se sledovaným dekarboxyláza-pozitivním kmenem *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* DEPE 946 (izolát ze zrajících sýrů identifikovaný jako součást starterových kultur) a 2 paralelní výroby se sledovaným kmenem *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* DEPE T36 (non-starterový laktobacil). Každá výroba byla solena na dvě požadované koncentrace NaCl. Pro kontrolní výrobu sýrů z 20 l mléka se použilo 100 ml smetanového zákysu (Laktoflora® - smetanová, sušená Milcom a.s., Česká republika). Zákys se připravil ve dvou 50 ml zkumavkách. Kmeny s prokazatelnou dekarboxylační aktivitu, byly získány a připraveny na Ústavě inženýrství a ochrany životního prostředí, přičemž růstovým bujonem bylo inokulováno 50 ml mléka pro přípravu provozního zákysu. Další 50 ml mléka bylo inokulováno komerční kulturou (Laktoflora® - smetanová, sušená Milcom a.s., Česká republika). Mléko pro výrobu modelových vzorků sýrů se sledovaným kmenem bylo tedy inokulováno smetanovým provozním zákysem (50 ml) a provozním zákysem sledovaného kmene (50 ml).

Každá šarže byla vyrobena z 20 l pasterovaného mléka standardizovaného na tučnost 2,5 %. Mléko se vytemperovalo na teplotu 32 ± 1 °C a zaočkovalo se požadovaným zákysem. K mléku bylo přidáno 10 ml chloridu vápenatého. Celý objem mléka se dostatečně promíchal po dobu 30 minut. Následně se mléko zasyřilo 640 μ l syřidla (Chymax M, Chr. Hansen) zředěného asi 10 ml vody. Mléko se syřidlem se krátce zamíchalo a následně se nechala ustálit hladina. Následovalo 30 minutové sýření. Vzniklá sýřenina se rozkrájela na hranoly (5x5 cm). Takto rozkrájená sýřenina se nechala 10 minut vytužit. Po vytužení následovalo míchání sýřeniny za současného drobení po dobu asi 20 minut. Po rozdrobení zrna se za stálého míchání odebralo asi 5 l syrovátky. Po odpuštění syrovátky se přidala prací voda o teplotě 80 ± 2 °C, pro dosažení požadované dohřívací teploty 41 ± 1 °C. Následovalo dosoušení za stálého míchání po dobu 60 minut. Po uplynulé době se sýřenina za stálého míchání slila do dvou velkých forem vyloženou plachetkami a 10 minut se nechala předlisovat. Po 10 minutách se sýřenina otočila k rovnoměrnému odtoku syrovátky a stejný postup

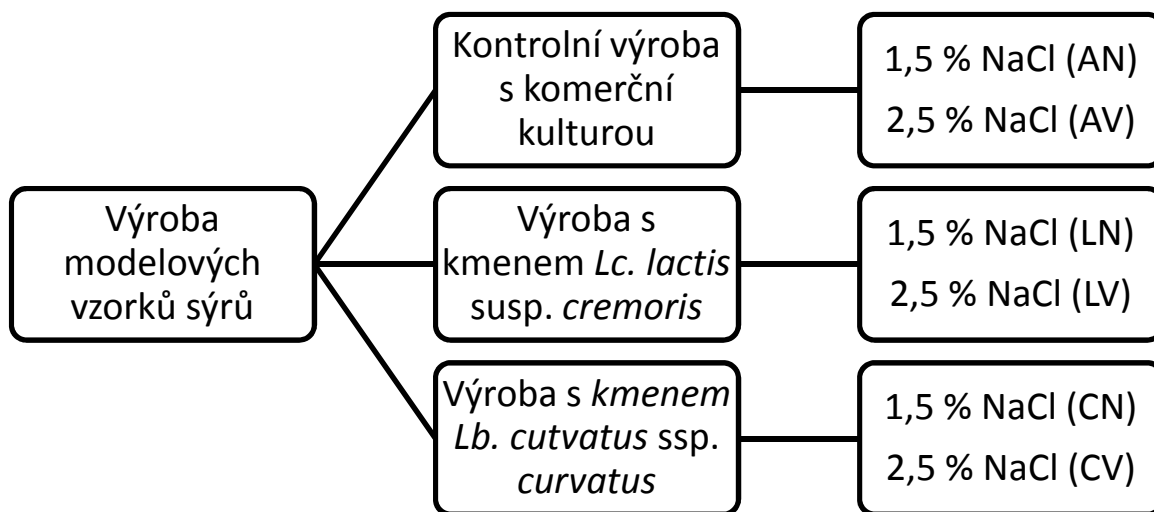
se zopakoval po uplynutí dalších 10 minut. Po předlisování následovalo rozkrájení sýřeni-ny na 24 rovnoměrně velkých kusů, které se napěchovaly do menších formiček, přikryly se plachetkou a následovalo 90 minutové lisování s postupně se navyšující zátěží. Každých 30 minut byla zátěž navýšena o 30 kg na 1 kg sýra. Sýry byly lisovány při finální zátěži 90 kg na 1 kg sýra po dobu 30 minut. Po vylisování se sýry uložily do zracích nádob pro prokysání ve zrací komoře při teplotě 10-12 °C.

Po prokysání byly sýry soleny na cílovou koncentraci NaCl pomocí 20% (w/v) roztoku soli:

- 11 bloků sýrů bylo soleno na cílovou koncentraci 1,5 % po dobu 30 minut,
- 11 bloků sýrů bylo soleno na cílovou koncentraci 2,5 % NaCl. Po 30, 60 a 90 minutách byla vyměněna solná lázeň pro podpoření koncentračního gradientu,
- 2 bloky byly podrobeny analýzám před solením.

Vysolené sýry se umístily do nádoby k oschnutí po dobu 30 minut. Po oschnutí se sýry ponořily do antimykotického roztoku Delvocidu (DELVOCID®XT1 DSM Food Specialties Dairy Ingredients, Nizozemí) o koncentraci 0,3 % po dobu 4 s a nechaly se 1 hodinu oschnout. Poté se sýry zabalily do cryovakového (smrštitelného) obalu. A uložily se do zrací komory o teplotě 10 ± 2 °C, kde probíhalo zrání po dobu 84 dní. V odběrových termínech (po prokysání, 1. den, 28. den, 56. den a 84. den) byly odebrány 2 vzorky z každé šarže a následně podrobeny analýzám. V odběrových dnech byly bloky podrobeny texturní profilové analýze (TPA) a základní chemické analýze (stanovení pH, obsahu sušiny a NaCl). Následně byly odebrány vzorky pro lyofilizaci (Lyofilizátor ALPHA 1-4 LSC, CHRIST, prodejce LABICOM s.r.o., ČR, Olomouc). Z lyofilizovaných vzorků byla provedena stanovení volných aminokyselin (FAA) a biogenních aminů (BA), přičemž stanovení volných aminokyselin bylo provedeno 1. den, 56. den a 84. den od výroby z důvodu technických problémů se zařízením. Obrázek 2 znázorňuje rozdělení a kódování vzorků.

Obrázek 2: Rozdělení a kódování vzorků



5.2 Základní chemické analýzy

5.2.1 Stanovení sušiny

Obsah sušiny byl stanoven gravimetricky. Sušina je zbytek vzorku, který se získá jeho vysušením při 102 °C. Váženka se naplní asi 30-50 g předsušeného mořského písku (Lach:Ner, Neratovice) a se skleněnou tyčinkou se vloží do sušárny při teplotě 105 °C. Do takto připravené váženky se naváží přibližně 3 g vzorku sýra s přesností na čtyři desetinná místa a dobře se tyčinkou promíchá. Naplněná váženka se spolu s tyčinkou vloží do sušárny vyhřáté na 105 °C. Suší se do konstantní hmotnosti přibližně 5 hodin. Po vysušení se vzorky uchovávaly v exsikátoru. Výsledky se stanovily zvážením misek před a po vysušení. Získané výsledky se vyjádřily v %. Sušina se stanovovala u všech vzorků ve 12 opakováních [48].

5.2.2 Stanovení pH

U každého vzorku se stanovovala hodnota aktivní kyselosti pomocí vpichového pH metru (pH Spear Eutech instruments, Nizozemsko). Stanovení se provádělo ve 12 opakováních.

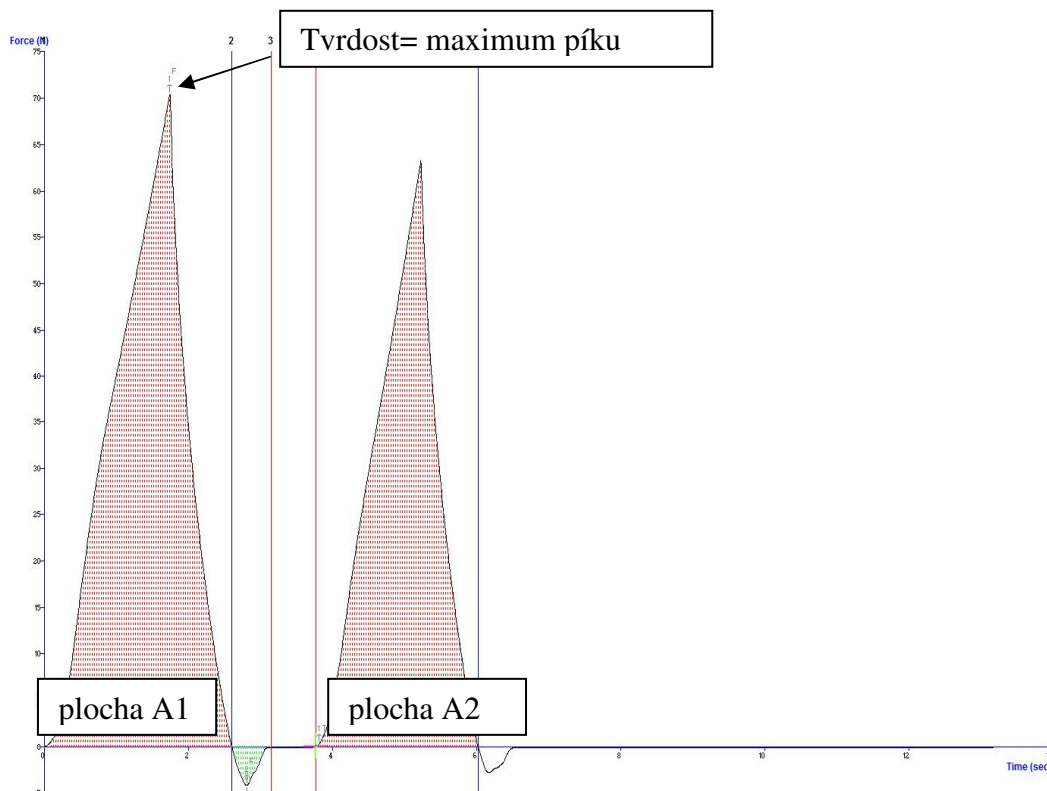
5.2.3 Stanovení NaCl

Ke stanovení NaCl se využívá argonometrická titrace [49]. Tato metoda je založena na reakci chloridů se stříbrnými anionty. Stanovení se provádělo u všech vzorků ve 12. opakováních. Do 250 ml titrační baňky se diferenčně odváží s analytickou přesností asi 1 g vzorku sýra. Samotný vzorek se s dostatečným množstvím horké destilované vody rozmělní ve třecí misce. Obsah baňky se ochladí cca na 50 °C a přidá se 2 ml 5 % dichromanu draselného (dichroman draselný, p.a., IPL- Ing. Petr Lukeš) jako indikátoru. Titruje se dusičnanem stříbrným (dusičnan stříbrný, p.a., Lach:Ner, Neratovice) za stálého míchání do oranžového zbarvení, asi 30 s.

5.3 Texturní profilová analýza

Texturní profilová analýza (TPA) je založena na kompresních testech. Z vnitřních středů bloků byl vykrojen válec o šířce 40 mm a výšce 20 mm, který byl podroben kompresním testům na texturním stroji (Analyzátor textury Texture Exponent 32 - STABLE MICRO SYSTEM LTD., Velká Británie) s použitím 25 % komprese pomocí cylindrické sondy o průměru 50 mm [50]. Vzorek se umístil mezi dvě ploché desky a byl stlačen ve dvou kompresních cyklech. Tato metoda byla použita u vzorků dané šarže v 8 opakování, resp. byly použity v daném odběrovém dni vždy dva bloky sýra z dané šarže. Na obrázku 3 je znázorněna zátěžová křivka. Z této křivky lze odečíst maximum síly v newtonech, tento parametr je ukazatel tvrdosti. Dále z této křivky můžeme vyjádřit soudržnost, která je dána poměrem plochy píků A2/A1 [27,50].

Obrázek 3: Zátěžová křivka



5.4 Stanovení volných aminokyselin

Pro stanovení volných aminokyselin byla použita iontově výměnná chromatografie. Vzorky sýrů se před samotnou analýzou navážily na analytických vahách (A&D GH-200 EC) a následně byly zmrazeny v hlubokomrazícím boxu (MDF-U3286S, SANYO, prodejce Schoeller instruments, ČR, Praha). Poté byly vzorky lyofilizovány za použití lyofilizátoru (ALPHA 1-4 LSC, CHRIST, prodejce LABICOM s.r.o., ČR, Olomouc) a následně zváženy. Lyofilizované vzorky byly extrahovány pomocí litnocitranového pufru. Chemikálie, které byly použity pro přípravu litnocitranového pufru jsou následující:

- Kyselina citronová, p.a. LACHNER
- Citronan litný, p.a. ZMBD Chemik s.r.o
- Chlorid litný, p.a. ZMBD Chemik s.r.o
- Hydroxid litný, p.a. ZMBD Chemik s.r.o

K derivatizaci byl použit ninhydrid, který byl připraven z těchto chemikálií:

- Ninhydrin, pro AAA400, ZMBD Chemik s.r.o
- Methylcellosolv pro AAA400, ZMBD Chemik s.r.o
- Hydrintantin pro AAA400, ZMBD Chemik s.r.o
- Acetátový pufr pro AAA400, ZMBD Chemik s.r.o

Pro samotné stanovení byl navážen vzorek do centrifugační zkumavky o objemu 15 ml. Do zkumavky bylo přidáno 5 ml litnocitranového pufru a nechalo se třepat v třepačce (laboratorní třepačka LT2) po dobu 45 minut. Poté se vzorky odstředily (Odstředivka EBA 21, Hettich ZENTRIFUGEN, Germany, Tuttlingen) při 6000 otáčkách po dobu 15 minut. Vzorky se pak odpipetovaly do ependorfeek a nechaly se odstředit na odstředivce (odstředivka MIKRO 200R, MIKRO 200 R, Hettich ZENTRIFUGEN, Germany, Tuttlingen) při 15 000 otáčkách po dobu 45 minut. Takto připravené vzorky byly dávkovány do automatického analyzátoru aminokyselin AAA 400 (Ingos, Praha) [53].

5.5 Stanovení biogenních aminů

Ke stanovení BA (kadaverinu, histaminu, fenyletylaminu, putrescinu, tyraminu, spermidinu a sperminu) byla použita metoda HPLC (vysoce účinná kapalinová chromatografie). Pro stanovení byly použity tyto standarty:

- HISTAMINE, approx.97%, SIGMA, Germany
- 2-PHENETHYLAMINE, puriss, p.a. standard for GC $\geq 99,5\%$ (GC), FLUKA (Product of Germany)
- TYRAMINE 99% (T), ALDRICH, Germany,
- PUTRESCINE DIHYDROCHLORIDE, $\geq 98,0\%$ (TLC), SIGMA (Product of Switzerland)
- CADAVERINE, 95%, ALDRICH (Product of Switzerland)
- AGNATINE SULFATE, purum $\geq 99\%$ T FLUKA (Product of USA)
- SPERMIDINE formolecular biology $\geq 98\%$ (GC), SIGMA (Product of Switzerland)
- SPERMINE, $\geq 99,0\%$, FLUKA (Product of Switzerland)
- TRYPTAMINE, $\geq 98,0\%$ (NT) FLUKA (Product of Switzerland)
- 1,7-DIAMINOHEPTANE, $\geq 98,0\%$ (TLC) SIGMA (Product of Switzerland)

Před samotnou analýzou byla provedena lyofilizace (viz. kapitola 5.4). Po lyofilizaci byla provedena extrakce 100 ml 0,6 M kyseliny chloristé (70-72% pro analýzu ACS,ISO,Reag.

Ph Eur – MERCK, GERMAN). Do derivatizační nádoby byl odpipetován 1 ml vzorku, ke kterému se napipetovalo 100 µl vnitřního standartu 1,7-heptadiaminu (1,7-DIAMINOHEPTANE, $\geq 98,0\%$ (TLC) SIGMA (Product of Switzerland)) o koncentraci 500 mg/l. Ke vzorku bylo přidáno 1,5 ml karbonátového pufru obsahující hydrogenuhličitan sodný, uhličitan draselný a uhličitan sodný bezvodý (MERCK, GERMAN). Filtrát byl podroben derivatizaci 2 ml danzylchloridu (SIGMA, Product of Switzerland). Připravená směs byla třepána v temnu v laboratorní třepačce LT2 po dobu 20 hodin. K tomuto vzorku bylo následně přidáno 200 µl prolinu (L-Proline forbiochemistry – MERCK, MERCK, GERMANY). Uzavřená derivatizační zkumavka byla třepána další hodinu. Do zkumavky bylo přidáno 3 ml heptanu (Heptane CHROMASOLV®, for HPLC, $\geq 99\%$ - SIGMA – ALDRICH) a zkumavka byla třepána 3 minuty. Z vytvořené heptanové vrstvy se odpipetovalo 1 ml do vialky, která byla odpařena pod dusíkem (prodejce Linde, Kroměříž) při 60 °C do sucha. Vzniklý odparek byl zředěn 1,5 ml acetonitrilu (Acetonitrile CHROMASOLV® Plus, for HPLC, $\geq 99,9\%$ - SIGMA – ALDRICH). Derivatizované vzorky byly po danzylaci opět filtrovány (porozita 0,22 µm) a nanášeny na kolonu (Agilent Eclipse Plus C18 RRHD s rozměry 3,0 x 50 mm). Vzniklé filtráty byly dávkovány do systém HPLC (binární pumpa LabAlliance, USA, autosampler LabAlliance, USA, kolona s termostatem; UV/VIS DAD detektor ($\lambda = 254$ nm); a degaser 1260 Infinity, Agilent Technologies). Stanovení bylo prováděno při 30 °C. Eluční program je znázorněn v tabulce 3[51,52]. Z každého bloku sýra byly provedeny 2 extrakce, ze kterých se na kolonu nanášel vzorek ve 24 opakování (n=24).

Tabulka 2: Eluční program

čas	10% ACN	100% ACN
0	39	61
0,1	39	61
1,4	30	70
3,5	17	83
4	0	100
9,5	0	100
11,5	39	61
15,5	39	61

Pozn.: ACN – acetonitril

6 VÝSLEDKY A DISKUSE

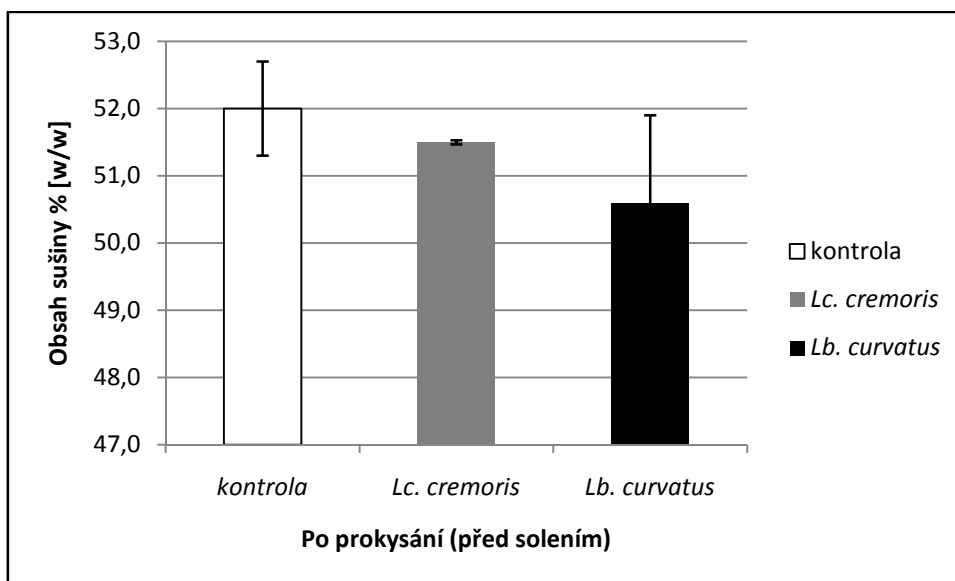
Celkem bylo vyrobeno 6 šarží modelových vzorků sýrů, které se lišily použitou kulturou a sledovaným mikroorganizmem. Vzorky sýrů z jednotlivých šarží byly vysoleny pomocí dvou odlišných způsobů solení. Vyrobene bloky byly uloženy ve zrací komoře při teplotě 10-12 °C, kde se ponechaly zrát po dobu 84 dnů. V odběrových termínech (po prokysání, 1. den, 28. den, 56. den a 84. den od výroby) byly z každé šarže, resp. slanosti odebrány 2 vzorky a podrobeny základním chemickým analýzám a texturní profilové analýze. Dále byly vzorky lyofilizovány pro stanovení koncentrace volných aminokyselin a biogenních aminů. Ve výsledkové části jsou uvedeny průměrné hodnoty získané z paralelních šarží modelových vzorků.

6.1 Základní chemické analýzy

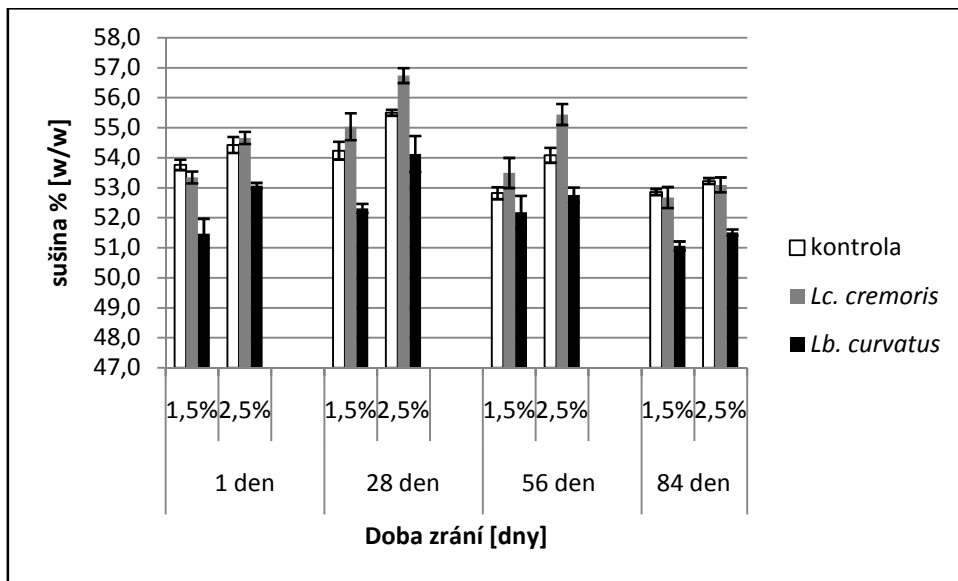
Byl stanoven obsah sušiny, který je prezentován na obrázku 4 a 5. Na obrázku 4 je znázorněn obsah sušiny po prokysání (resp. před solením), u výroby kontrolní šarže A byla stanovena hodnota sušiny $52,0 \pm 0,7 \%$, u výroby L $51,5 \pm 0,03 \%$ a výroby C $50,6 \pm 0,3 \%$. Po vysolení na cílovou koncentraci došlo obecně k vzestupu sušiny u všech výrob. U výrob, které byly vysoleny na cílovou koncentraci 2,5 % NaCl, byla obecně zaznamenána vyšší sušina než u sýrů s nižší slaností. U výrob A, L a C, které byly vysolené na cílovou koncentraci 1,5 % NaCl (vzorky AN, LN, CN), pak byl trend následující: kontrolní výroba s běžnou komerční kulturou (AN), u které se obsah sušiny pohyboval 1. den zrání na hodnotě $53,8 \pm 0,8 \%$ [w/w], následně v průběhu zrání resp. 28. den po výrobě došlo k mírnému vzestupu obsahu sušiny na hodnotu $54,2 \pm 0,08 \%$ [w/w]. Do konce doby skladování se obsah sušiny u kontrolních vzorků (AN) snižoval. Také v případě vzorků inokulovaných dekarboxyláza-pozitivním kmenem *Lc. lactis* subsp. *cremoris* (LN) byl pozorován pokles obsahu sušiny. Do 28. dne obsah sušiny rostl až na hodnoty $55 \pm 0,8 \%$ v případě vzorků s nižší slaností a na hodnoty $56,7 \pm 0,9 \%$ v případě vzorků s vyšší slaností. Naopak nejnižší hodnoty byly naměřeny u šarží inokulovaných kmenem *Lb. curvatus* subsp. *curvatus* a to po celou dobu skladovacího experimentu. Obsah sušiny byl významně nižší ve srovnání s ostatními modelovými vzorky a to bez ohledu na způsob solení. U vzorků šarží CN se obsah sušiny pohyboval do 56. dne skladování v rozmezí hodnot 51,5-52,2 % [w/w]. Poslední den skladování obsah sušiny klesl na hodnotu $51,1 \pm 1,5 \%$ [w/w]. U vzorků šarží s vyšší slaností byl pozorován obdobný trend vývoje obsahu sušiny, kde však byl obsah sušiny vyšší přibližně o 1 až 1,5 % ve srovnání s nízkovysolenými

vzorky. Odlišné hodnoty byly pozorovány poslední odběrový den (84. den od výroby), ve kterém se difference mezi vzorky s odlišnou slaností snížily. V případě kontrolní výroby AV byla naměřena hodnota 1. den zrání $54,4 \pm 0,01$ % [w/w] obsahu sušiny. Nejvyšší hodnoty výroby AV byly zaznamenány 28. den od výroby, kdy se obsah sušiny zvýšil na hodnotu $55,5 \pm 0,2$ % [w/w]. Do konce doby skladování se obsah sušiny mírně snižoval. Obecně nejvyšší hodnoty sušiny byly naměřeny u výroby LV, kde nejvyšší hodnota byla $56,7 \pm 1,04$ % [w/w], tato hodnota byla naměřena 28. den po výrobě. Naopak nejnižší hodnoty byly zaznamenány opět u šarží inokulovaných kmenem *Lb. curvatus* subsp. *curvatus*. Nejnižší hodnoty ze skupiny vysoce solených vzorků byly pozorovány v případě vzorků CL, kde se obsah sušiny pohyboval v rozmezí hodnot 53,1-51,5 % [w/w] po celou dobu skladování.

Obrázek 4: Obsah sušiny modelových vzorků po prokysání

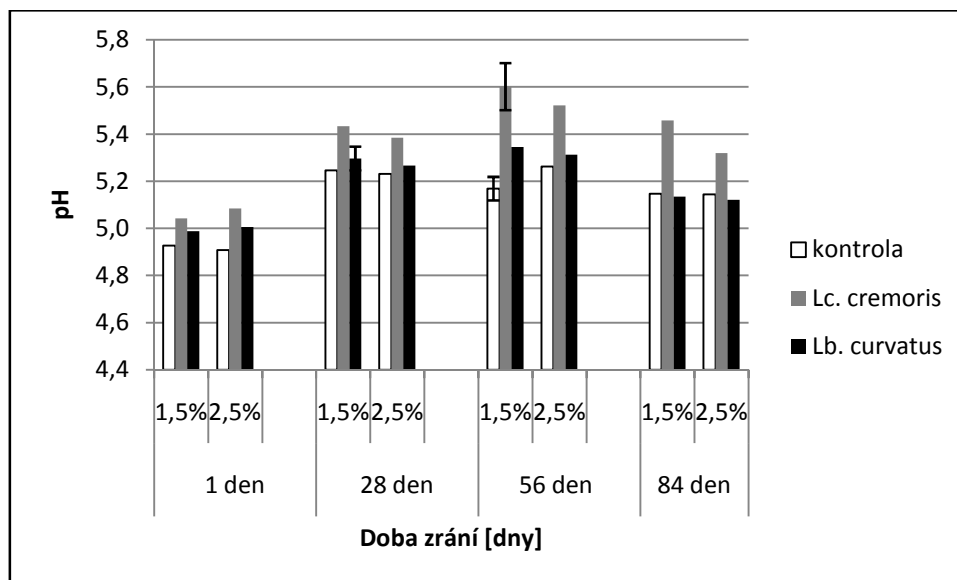


Obrázek 5: Vývoj obsahu sušiny modelových vzorků sýrů v průběhu zrání



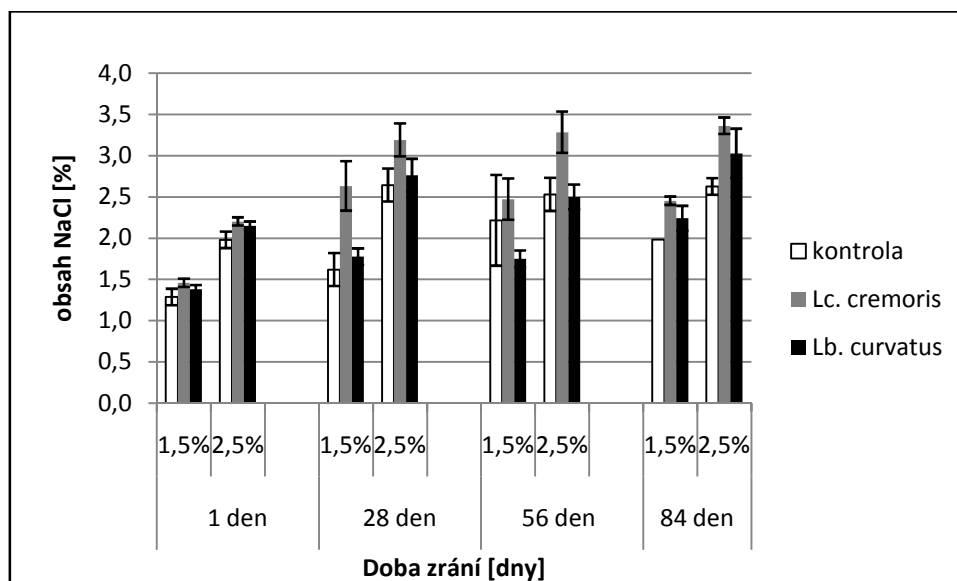
Na obrázku 6 je znázorněn vývoj pH během celé doby zrání. U všech výrob bez rozdílu koncentrace NaCl se hodnoty pH 1. den zrání pohybovaly v rozmezí 4,9-5,1. Po 28. dni od výroby došlo k mírnému zvýšení pH na hodnoty 5,2-5,4. Dalo by se, říci že se pH zvyšovalo až do 56. dne skladování. Nejvyšší hodnoty pH byly stanoveny 56. den skladování u vzorků se sledovaným kmenem *Lc. lactis* subsp. *cremoris* (LN a LV), u kterých došlo k zvýšení pH na hodnotu $5,6 \pm 0,1$ a $5,5 \pm 0,1$. Postupné zvyšování pH mohlo být způsobeno rozkladem kyseliny mléčné na další produkty metabolismu (např. CO_2 , H_2O , kyselinu propionovou a máselnou) [10].

Obrázek 6: Vývoj pH modelových vzorků sýrů v průběhu zrání



Obsah NaCl u nízkosolených sýrů (1,5 %) byl následovný: v případě vzorků šarží AN, u kterých byl 1. den zrání naměřen obsah NaCl $1,3 \pm 0,3$ % se pak ke konci doby skladování obsah NaCl zvýšil na hodnotu $2,0 \pm 0,3$ %. U výroby LN, byl naměřen obsah NaCl $1,5 \pm 0,04$ %, tato hodnota byla naměřena 1. den zrání. Po 28. dni od výroby došlo k prudkému vzestupu koncentrace NaCl na hodnotu $2,6 \pm 0,3$ %. Na konci doby skladování se obsah NaCl pohyboval na stejné hodnotě. U vzorků šarží CN dosahoval obsah NaCl podobných hodnot jako v případě vzorků AN a koncentrace NaCl se v průběhu zrání a skladování pohybovala v rozmezí hodnot 1,4-2,2 %. Obsah NaCl u vysokosolených sýrů (cílová koncentrace soli 2,5 %) vyrobených z kontrolních výrob AV, byla 1. den zrání naměřena hodnota $2,0 \pm 0,1$ % NaCl, po 28. dni od výroby se obsah zvýšil na hodnotu $2,6 \pm 0,4$ %, tato hodnota byla naměřena i na konci doby skladování 84. den. Pokud bychom porovnali výroby AV a LV, pak vzorky výrob LV dosahovaly vyššího stupně prosolení. Nejvyšší hodnota (3,4 % NaCl), byla naměřena poslední den skladování. Výroba CV byla svými hodnotami obsahu NaCl podobná vzorků z výroby AV. Dalo by se říci, že odpovídá podobnému trendu jako v předcházejícím případě u nízkosolených sýrů. Nárůst koncentrace NaCl 28. den od výroby může být přisouzen tomu, že sůl prostupuje od povrchu ke středu a koncentruje se v povrchové vrstvě v tzv. solném prstenci a během solení proniká hlouběji do tzv. solného pásma. Stejněměrné prosolení nastane až v průběhu zrání [41]. Vývoj obsahu NaCl je znázorněn na obrázku 7.

Obrázek 7: Vývoj obsahu NaCl modelových vzorků sýrů v průběhu zrání



6.2 Texturní a profilová analýza

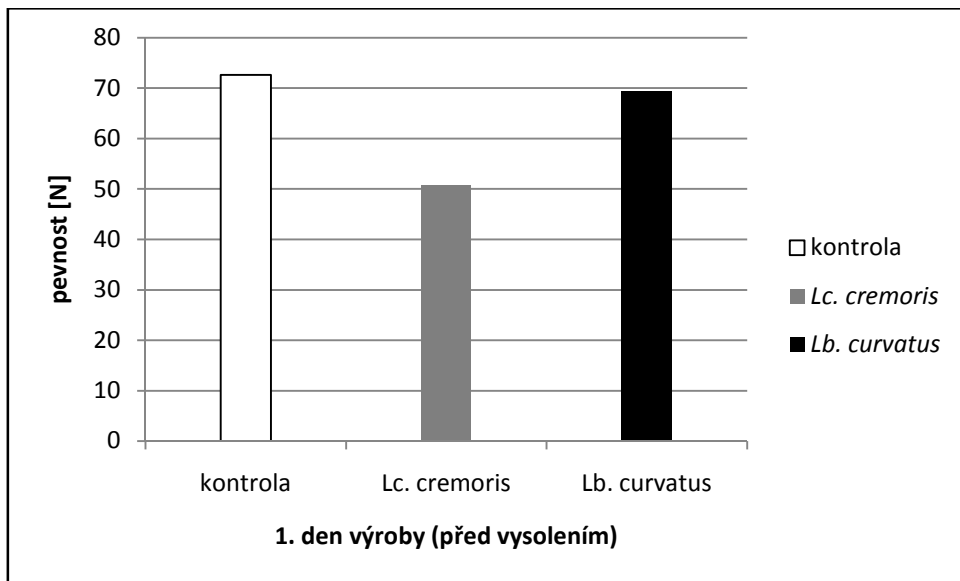
Obecně lze říci, že vyšší hodnoty pevnosti modelových sýrů byly pozorovány po celou dobu 84-denního skladovacího experimentu v případě vzorků vysolených na vyšší obsah NaCl, což potvrzují také práce Fox et al. [10] a Buňka et al. [58]. Vyšší obsah soli navýšil obsah sušiny, jak vyplývá ze stanovení základní chemické analýzy (kap. 6.1) a v důsledku toho došlo také k navýšení pevnosti modelových vzorků sýrů. Vývoj pevnosti před vysolením a v průběhu zrání je znázorněn na obrázku 8 a 9. Mezi vzorky před vysolením a 1. den po vysolení u nízkosolených sýrů, jsou jen nepatrné rozdíly, které byly pravděpodobně způsobeny vysokou koncentrací soli v povrchových vrstvách bloků sýrů, přičemž vzorek pro posouzení texturních analýz byl vykrojen ze středové části bloku sýra. Na druhou stranu již po prokysání jsou viditelné značné odlišnosti mezi šaržemi inokulovanými odlišnou kulturou. Výrazně nižší hodnoty pevnosti byly pozorovány v případě vzorků šarží s kmenem *Lc. lactis* subsp. *cremoris* DEPE 946. Ze srovnání jednotlivých modelových vzorků inokulovaných odlišnými kulturami vyplývá, že nejnižších hodnot pevnosti bylo i nadále dosaženo po celou dobu experimentu v případě skupiny modelových sýrů inokulovaných dekarboxylázo-pozitivním kmenem *Lc. lactis* subsp. *cremoris* DEPE 946. Naopak nejvyšší hodnoty tvrdosti byly obecně zaznamenány u kontrolní výroby (vzorky A). Ihned po vysolení byl pozorován poměrně nízký rozdíl mezi vzorky s odlišnou koncentrací

soli až na výjimku modelových vzorků s *Lb. curvatus* subsp. *curvatus*. Nepříliš velké rozdíly byly pravděpodobně způsobeny nerovnoměrným rozložením soli v celém bloku sýrů, což je přirozený stav v brzkých stádiích zrání sýrů solených pomocí solné lázně jak také uvádí publikace Pachlová et al. [58] a Buňka et al. [59]. Ihned po vysolení je koncentrace soli nejvyšší v povrchových vrstvách bloků sýrů a až v průběhu zrání dochází k vyrovnání její koncentrace napříč sýrem.

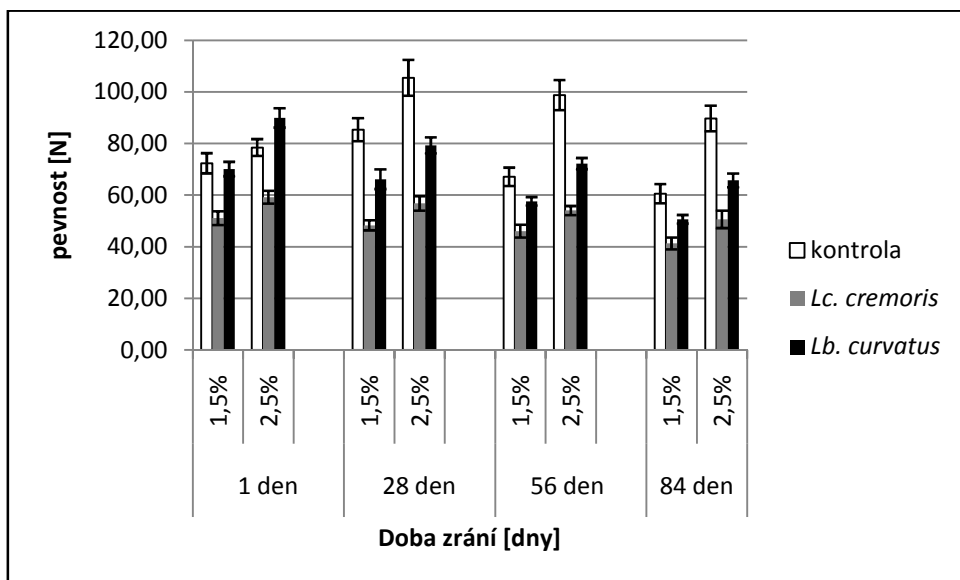
Po 28 dnech zrání došlo k výraznému nárůstu pevnosti kontrolních bloků sýrů, a to v případě vzorků AV až nad hodnoty 100 N. Nárůst pevnosti mohl být pravděpodobně způsoben difuzí NaCl z okrajových částí do středu a proteolytickými změnami kaseinů (bobtnání proteinové matrice) [57,60]. Modelové vzorky inokulované dekarboxyláza-pozitivními kmeny po 28 dnech zrání vykazovaly pokles pevnosti bez ohledu na koncentraci soli. I v dalších stádiích zrání docházelo k postupnému poklesu hodnot pevnosti modelových vzorků, přičemž po celou dobu byl zachován trend vyšší pevnosti v případě více solených vzorků. Postupné snižování pevnosti sýrové matrice je obecně způsobeno hydrolýzou proteinové sítě, kterou může vyvolat proteolytická aktivita zákysových a nezákysových bakterií mléčného kvašení [60,61].

Na obrázku 10 je znázorněna soudržnost vzorků, která je vyjádřena jako poměr plochy píků A2/A1. Soudržnost můžeme také vyjádřit termínem konzistence, která udává pevnost vnitřních vazeb v potravíně. K výrazným rozdílům soudržnosti v průběhu skladovacího experimentu nedocházelo. Pouze 56. den zrání došlo k poklesu u vzorků LN a LV. Naopak ke zvýšení došlo 84. den zrání a to u výroby AN.

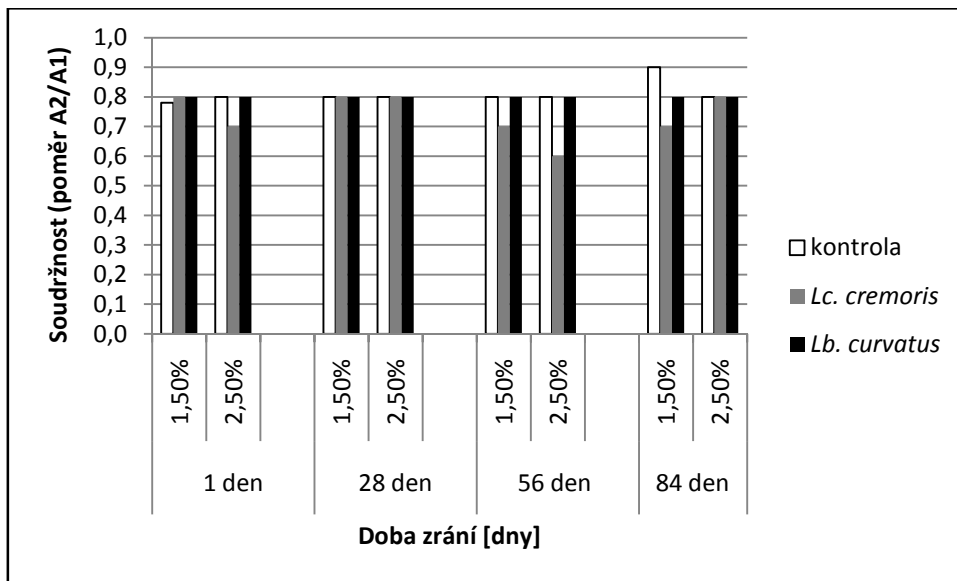
Obrázek 8: Vývoj pevnosti před vysolením



Obrázek 9: Vývoj pevnosti modelových vzorků sýrů v průběhu zrání



Obrázek 10: Soudržnost modelových vzorků sýrů

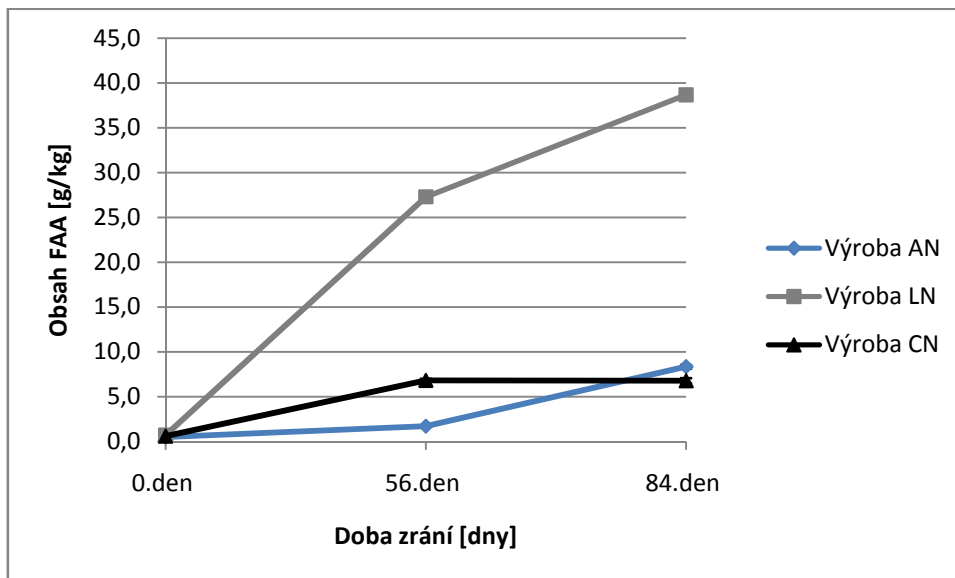


6.3 Stanovení volných aminokyselin

Vývoj celkového obsahu volných aminokyselin v průběhu zrání u nízkosolených a vysokosolených sýrů, je znázorněn na obrázku 11 a 12. Na procesu zrání se podílejí starterové BMK a další přítomná mikroflóra, a to zejména non-starterové BMK. Starterové BMK přispívají k rozkladu proteinů, zatímco non-starterové jsou zodpovědné zejména za peptidolýzu a uvolnění volných aminokyselin [54]. Rychlost proteolýzy se zvyšuje s dobou zrání, což vede k hromadění volných aminokyselin, které slouží jako substrát pro dekarboxylázovou činnost bakterií, což také potvrzují práce Linares et al. [36] a Fernández et al. [56]. U výrob, které byly vysoleny na nižší slanost (1,5 %), byl trend následovný: u vzorků šarže LN byla detekována významně vyšší množství volných aminokyselin ve srovnání s ostatními šaržemi (AN a CN). Ihned po prokysání se obsah volných aminokyselin u kontrolní výroby (AN) pohyboval na hodnotě $0,5 \pm 0,1$ g/kg čerstvé hmoty, v průběhu zrání resp. 56. den zrání se obsah volných aminokyselin zvýšil na koncentraci $1,7 \pm 0,05$ g/kg, do konce doby skladování (84. den) došlo k opět ke zvýšení na hodnotu $8,3 \pm 0,2$ g/kg. Šarže inokulovaná kmenem *Lc. lactis* subsp. *cremoris* (LN) dosahovala ihned po prokysání (před solením sýrů) hodnot $0,7 \pm 0,01$ g/kg. V průběhu zrání docházelo k prudkému zvyšování koncentrace volných aminokyselin, přičemž 84. den skladování došlo k vzestupu volných aminokyselin až na hodnotu $38,7 \pm 0,5$ g/kg. U šarží s použitým non-starterem (CN) byla po prokysání naměřena průměrná koncentrace volných aminokyselin $0,7 \pm 0,01$

g/kg. Během skladovacího experimentu došlo k navýšení obsahu volných aminokyselin na hodnotu $6,7 \pm 0,3$ g/kg (detekováno 84. den zrání).

Obrázek 11: Vývoj obsahu volných FAA v průběhu zrání u nízkosolených sýrů

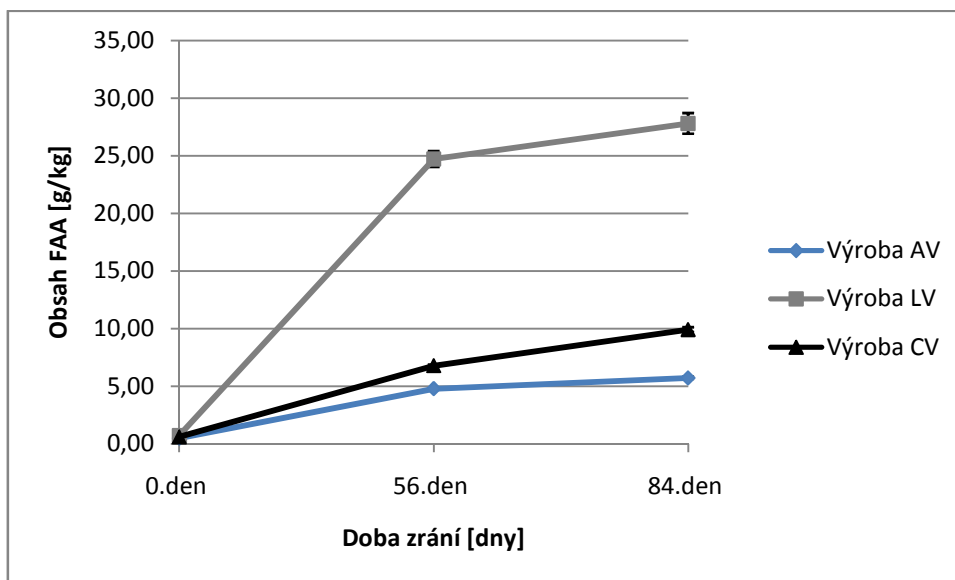


U modelových vzorků, které byly vysoleny na vyšší slanost (2,5 %), se koncentrace volných aminokyselin vyvíjela obdobným trendem jako u sýrů s nižší slaností. Také docházelo k postupnému zvyšování koncentrací volných aminokyselin v průběhu zrání. U kontrolní výroby (AV) byla na konci experimentu naměřena hodnota $5,7 \pm 0,1$ g/kg (84. den skladování). Modelové vzorky LV dosahovaly podstatně vyšších hodnot než šarže AV. U výroby LV byla naměřena koncentrace 27,8 g/kg (tato hodnota byla zaznamenána 84. den skladování). Nižších hodnot dosahovala výroba s použitým non-starterem (CV). U těchto modelových vzorků byla detekována koncentrace $9,9 \pm 0,2$ g/kg, a to opět na konci doby skladování.

Pokud bychom porovnali šarže vzorků s nižší a vyšší slaností, pak modelové vzorky s nižším obsahem NaCl dosahovaly vyšších koncentrací volných aminokyselin. Vyšší obsahy NaCl ovlivňují intenzitu proteolýzy. Pouze u výroby CN, která byla vysolena na cílovou koncentraci 1,5 % NaCl, byla detekována nižší koncentrace volných aminokyselin než u výroby s vyšší slaností (CV), což mohlo být způsobeno konverzí volných aminokyselin na sensoricky aktivní látky (amoniak, aminy, karbonylové sloučeniny atd.) a to prostřednictvím intracelulárních enzymů mikroorganismů. Schopnost produkovat sensoricky

aktivní sloučeniny z aminokyselin je silně druhově i kmenově závislá. Jedná se především o reakce transaminace, deaminace a dekarboxylace za vzniku biogenních aminů [50,57].

Obrázek 12: Vývoj obsahu volných FAA v průběhu zrání u vysokosolených sýrů



6.4 Stanovení biogenních aminů

Stanovením bylo sledováno 8 základních BA (His, Kad, Phe, Put, Spd, Spn, Trp, Tyr). Ve vzorcích však byly detekovány pouze Tyr, Spd a Spn.

Pokud bychom srovnali výrobu nízkosolených a vysokosolených sýrů, pak můžeme říci, že vyšší koncentrace soli snižují obsahy BA. Toto tvrzení bylo podpořeno výsledky u všech sledovaných šarží, a to po celou dobu experimentu. Např. u kontrolní výroby AN (nízkosolené sýry) byla naměřena celková koncentrace BA 113,5 mg/kg v čerstvé hmotě, tato hodnota byla stanovena na konci doby zrání (84. den). V případě vzorků výroby AV (vysokosolených sýrů) byla detekována ve stejném odběrovém dni hodnota pouze 78,5 mg/kg. Nižší hodnoty biogenních aminů v případě kontrolní výroby lze konstatovat jako příznivé, neboť leží pod hranicí 100 mg/kg, která je považována řadou autorů za toxikologicky významnou [32,42,63]. Buňková et al. [30] uvádí, že zvýšení koncentrace NaCl v růstovém médiu na hodnotu 4,5 %, snižuje produkci biogenních aminů. V této práci bylo potvrzeno, že i hodnoty nad 2,5 % NaCl mohou omezit produkci biogenních aminů, a to v reálném

systemu potraviny (zrajícího sýra). Na obrázku 13 a 14 je prezentován vývoj obsahu BA po celou dobu zrání.

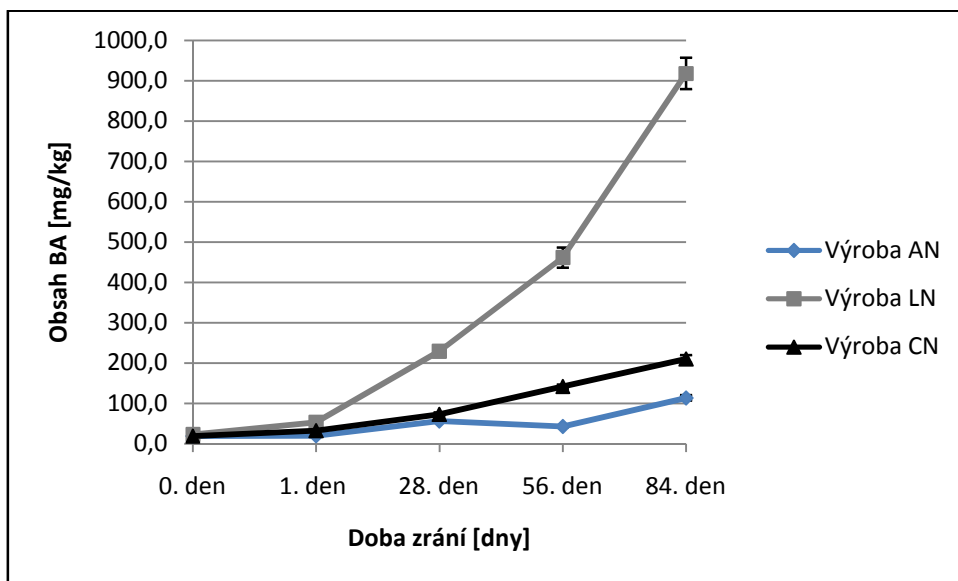
Absolutně nejvyšší koncentrace BA byly detekovány u vzorků s nízkou koncentrací soli, kde byl použit dekarboxyláza-pozitivní kmen *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* (LN), jehož původ byl identifikován z čistých mlékařských kultur. Koncentrace BA se v případě vzorků se starterovým dekarboxyláza-pozitivním kmenem navýšila v průběhu zrání z $22,5 \pm 1,4$ mg/kg na 918,1 mg/kg. Finální koncentrace BA lze považovat za velmi riziková, které mohou konzumentovy způsobit závažné zdravotní problémy. Šarže (CN) s použitým non-starterem (*Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus*) dosahovaly nižších hodnot než modelové vzorky LN. U těchto šarží došlo k navýšení obsahu BA z $18,8 \pm 0,6$ mg/kg na 209,9 mg/kg. Přestože i v tomto případě (vzorky LB) se jedná o množství BA, která jsou nad hranicí toxikologicky významného limitu (100 mg/kg), koncentrace BA byla na konci doby skladování v modelových vzorcích inokulovaných dekarboxyláza pozitivním starterovým kmenem více jak čtyřnásobná, což lze považovat za alarmující zjištění. Ze zjištěných výsledků vyplývá, že použití zákysových bakterií s dekarboxylační aktivitou může představovat významně vysoká rizika ze strany ochrany bezpečnosti potravin. Naopak nejnižší koncentrace byly naměřeny u kontrolní výroby (AN), kde se obsah BA pohyboval v rozmezí hodnot 19-113,5 mg/kg. Zvýšená množství BA na konci doby skladování kontrolních modelových vzorků mohou být s největší pravděpodobností přisouzena nezákysovým bakteriím, které se ve zrajících sýrech přirozeně vyskytují a v průběhu zrání svým počtem převyšují množství starterových BMK [43]. Zjištěné skutečnosti ještě více podmiňují potřebu zevrubnějšího pochopení vztahů, které nastávají v poměrně složitém mikrobiálním společenství ve zrajících sýrech s cílem omezení produkce biogenních aminů přítomnou mikroflórou s dekarboxyláza-pozitivní aktivitou.

Ze zjištěných hodnot obsahu biogenních aminů vyplývá nutnost vhodného výběru starterových bakterií, kde by jejich selekce měla být založena nejen na technologické funkci, ale také s ohledem na zajištění zdravotní nezávadnosti potravin ve smyslu nízké produkce biogenních aminů. Za optimálního předpokladu by mikroorganismy používané jako součást starterových kultur neměly produkovat biogenní aminy.

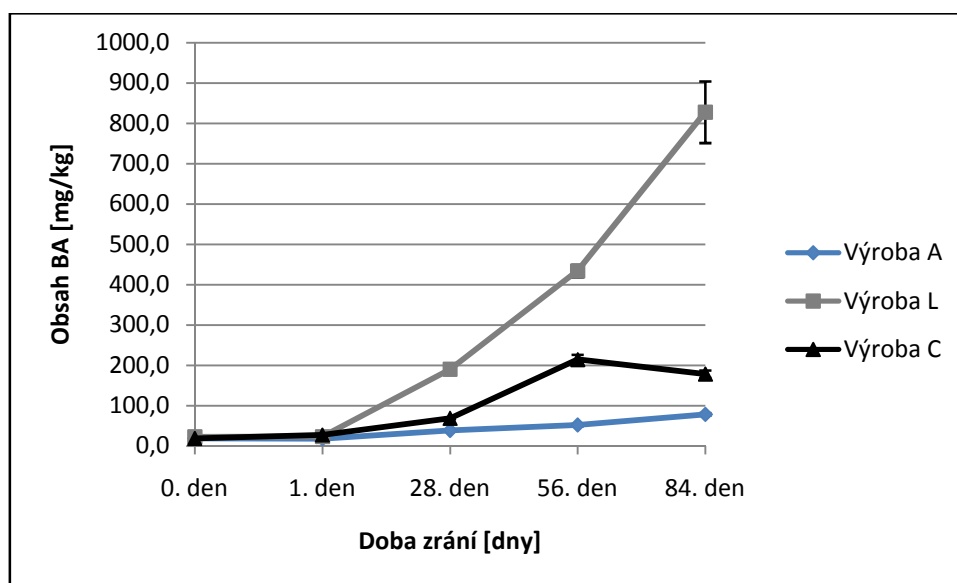
U vysokosolených sýrů docházelo také k postupnému zvyšování koncentrací BA. U kontrolní výroby (AV) byla naměřena hodnota $19,0 \pm 0,6$ mg/kg ihned po prokysání resp. před solením. Po vysolení došlo ke zvýšení koncentrace, a na konci doby skladování byla naměřena hodnota 78,5 mg/kg. Nejvyšších obsahů biogenních aminů opět dosahovaly modelové

vzorky inokulované kmenem *Lc. lactis* subsp. *cremoris* (LV), u těchto šarží docházelo k prudkému zvyšování koncentrací BA. Na konci doby skladování (84. den) byla detekována hodnota 827,8 mg/kg. U výroby s použitým kmenem *Lb. curvatus* subsp. *curvatus* (CV) byla stanovena hodnota BA 214,5 mg/kg, a to 56. den zrání. Na konci doby skladování došlo k nepatrnému snížení obsahu BA na hodnotu 178,4 mg/kg. Vývoj obsahu BA v průběhu zrání u vysokosolených je prezentován na obrázku 14.

Obrázek 13: Vývoj obsahu BA v průběhu zrání u nízkosolených sýrů



Obrázek 14: Vývoj obsahu BA v průběhu zrání u vysokosolených sýrů



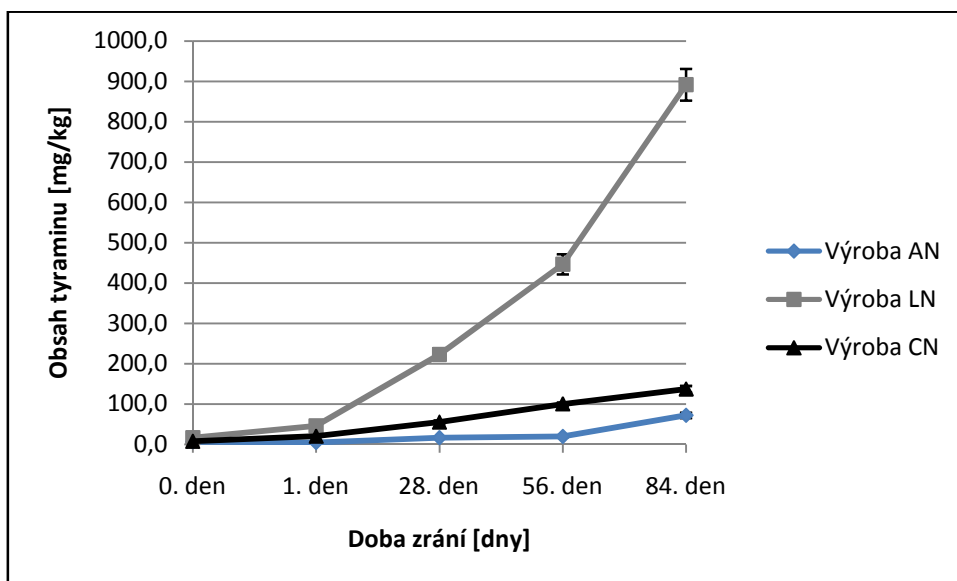
Tyramin, putrescin a histamin jsou nejčastějšími a nejvíce zastoupenými BA v sýrech [44]. V naší práci byl z těchto aminů detekován pouze tyramin. Absolutně nejvyšší množství tyraminu (891,6 mg/kg) bylo naměřeno poslední den zrání u výroby LN. Ve stejném odběrovém termínu (84. den) bylo detekováno významné množství tyraminu také v případě vzorků LV (818 mg/kg). Přestože v případě vzorků záměrně inokulovaných dekarboxyláza-pozitivním kmenem *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* DEPE 946 byly detekovány významně vysoké koncentrace tyraminu také v případě vzorků vysoce vysolených. Vyšší koncentrace soli v modelovém vzorku sýrů částečně omezila produkci BA. Vývoj obsahu tyraminu je prezentován na obrázku 15 a 16.

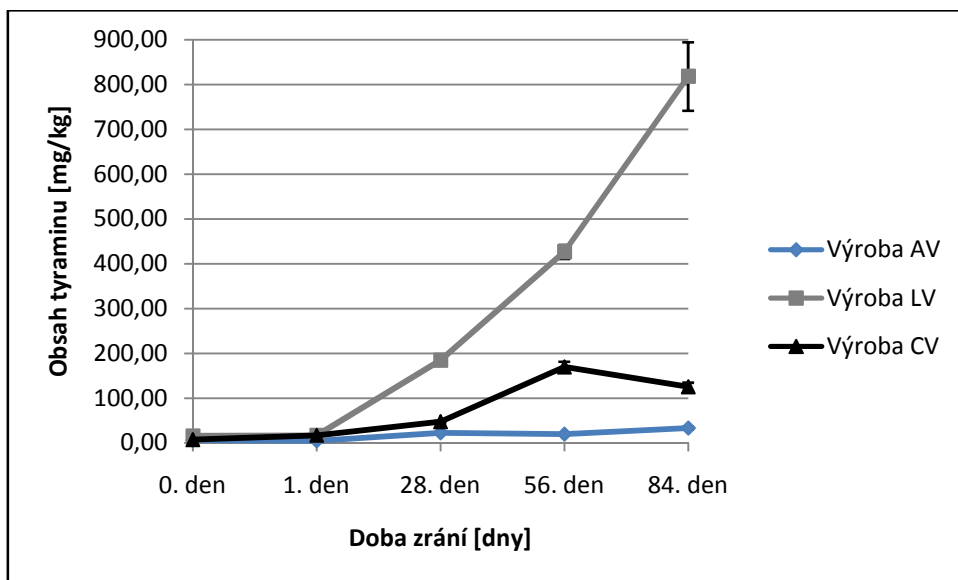
Šarže vzorků značeny LN a LV, byly vyrobeny s použitím dekarboxyláza-pozitivním kmenem *Lc. lactis* subsp. *cremoris* DEPE 946. U těchto vzorků byla zaznamenána nejvyšší koncentrace tyraminu po celou dobu zrání. Tyto výsledky jsou v souladu také s prací Buňkové et al. [30]. Buňková et al. [53] uvádí, že se produkce tyraminu připisuje zejména rodu *Lactococcus*. Tyto bakterie jsou běžně používány v rámci biotechnologického procesu výroby sýrů jako zákysové kultury [30]. Naopak nižší hodnoty produkce tyraminu byly zaznamenány u výrob inokulovaných kmenem *Lb. curvatus* subsp. *curvatus* DEPE T36 (výroba CN a CV). Námi použitý kmen *Lb. curvatus* subsp. *curvatus* vykázal pozitivní, ale ne příliš silnou produkci tyraminu v reálných podmínkách zrajícího sýra. Přestože mnohé kmeny laktobacilů včetně *Lb. curvatus* jsou uváděny jako producenti tyraminu [64], Halász et al. [62], uvádí ve své práci, že je tyramin pravděpodobně více tvořen aerobní mikroflórou než laktobacily přidanými v průběhu výroby.

Vzhledem k nižší produkci tyraminu prostřednictvím non-starterového kmene *Lb. curvatus* subsp. *curvatus* ve srovnání se starterovým zástupcem lze konstatovat, že dekarboxylační aktivita jednotlivých BMK je nejen druhově, ale také pravděpodobně kmenově závislá. Navíc jednotlivé kmeny mohou být odlišně ovlivněny mikroenvironmentálními podmínkami v potravině. Tyto faktory se následně mohou výrazně projevit v produkci potenciálně rizikových koncentrací biogenních aminů.

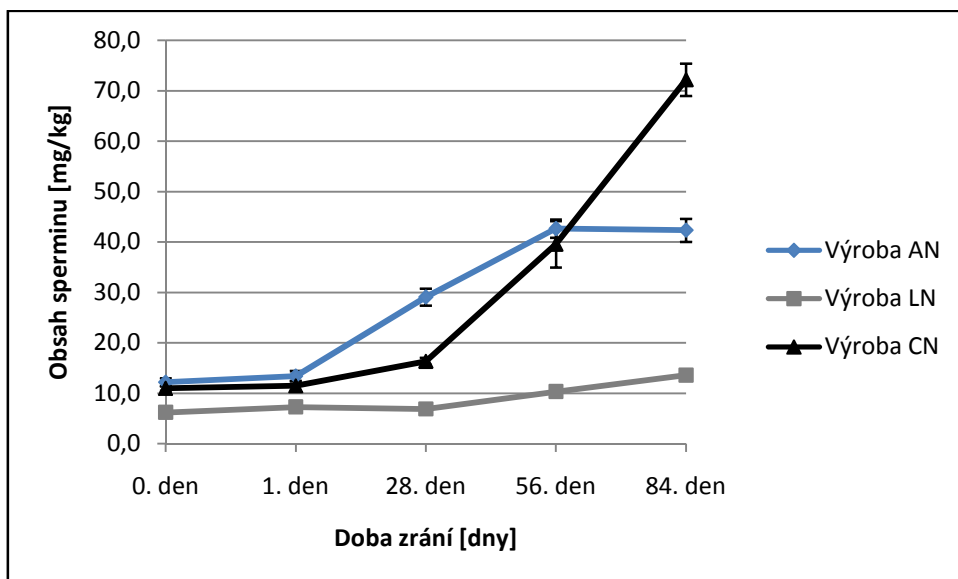
V České republice nejsou dosud bohužel definovány hygienické limity pro biogenní aminy v sýrech. Je tedy obtížné určit kritické hodnoty pro jednotlivé aminy [65]. V důsledku toho se může používat pro přímé hygienicko-toxikologické zhodnocení kvality návrh podle Spaniera et al. [66], který uvádí nejvyšší přípustné množství ve výši 900 mg/kg. Toto množství vyjadřuje sumu histaminu, tyraminu, putrescinu a kadaverinu. V naší práci byl detekován pouze tyramin, u kterého byla naměřena nejvyšší hodnota 891,6 mg/kg. Ačkoliv tato hodnota nepřekračuje přípustné množství, dalo by se říci, že se jedná o koncentraci, která může způsobit nežádoucí účinky na zdravotní stav konzumenta, a to bezprostředně po konzumaci. Význam monitoringu, kontroly a podmínění snížení obsahu biogenních aminů v reálných potravinách však spočívá zejména z dlouhodobého pohledu. V současnosti v odborné literatuře bohužel nejsou k dispozici dlouhodobé studie, které by byly zaměřeny na rizikové působení pravidelného příjmu vyšších koncentrací biogenních aminů, přestože se mohou spolupodílet na ovlivnění zdravotního stavu obyvatelstva

Obrázek 15: Vývoj obsahu tyraminu v průběhu zrání u nízkosolených sýrů

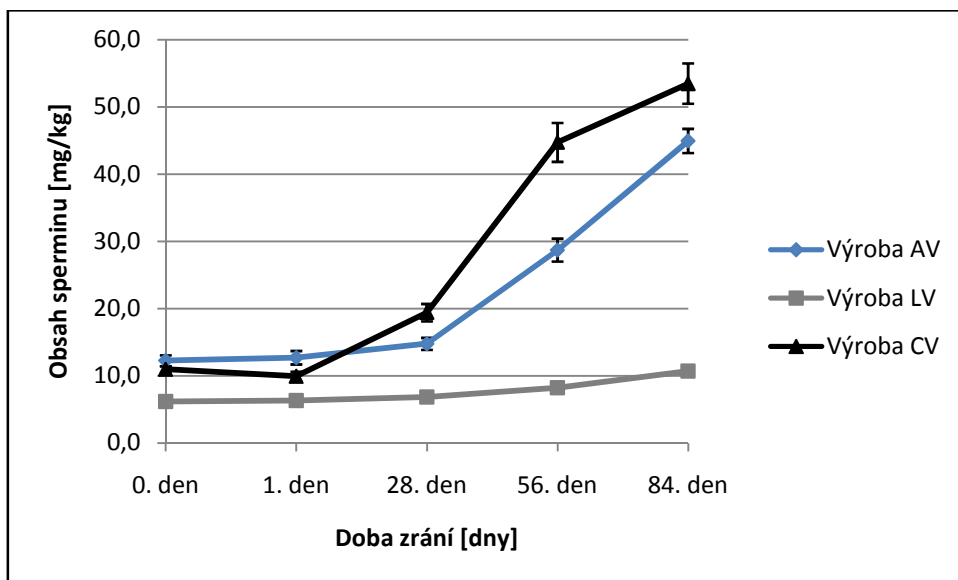


Obrázek 16: Vývoj obsahu tyraminu v průběhu zrání u vysokosolených sýrů

Jako další BA byly v praktické části detekovány aminy spermin a spermidin. Množství sperminu se pohybovalo u všech výrob do desítek mg/kg. Ve srovnání se všemi šaržemi dosahovaly nejvyššího množství sperminu modelové vzorky CN, a to v množství 72,2 mg/kg (84. den zrání). Naopak nejnižší množství bylo zaznamenáno u výroby LV, kde se obsah sperminu pohyboval v průběhu zrání v rozmezí hodnot 6,2-10,7 mg/kg. Vývoj obsahu sperminu v modelových vzorcích přírodních sýrů je znázorněn na obrázku 17 a 18.

Obrázek 17: Vývoj obsahu sperminu v průběhu zrání u nízkosolených sýrů

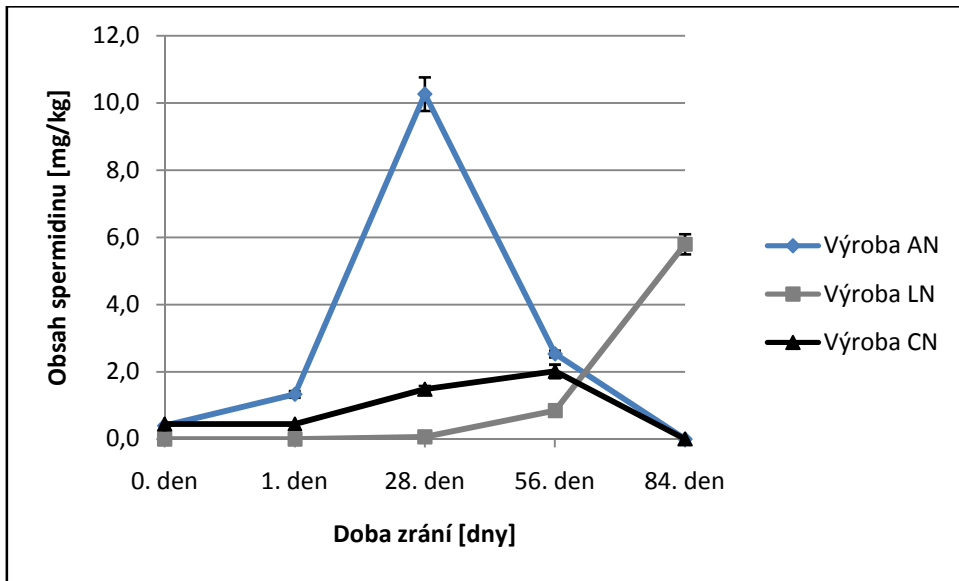
Obrázek 18: Vývoj obsahu sperminu v průběhu zrání u vysokosolených sýrů



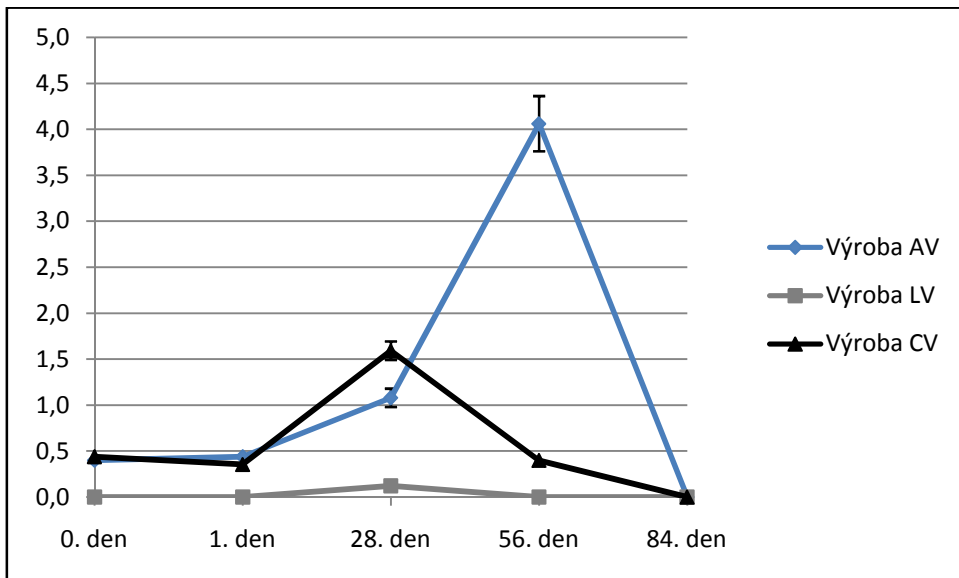
Spermidin byl ve sledovaných výrobcích nalezen v koncentracích odpovídajících jednotkám mg/kg. U výroby AN a AV byla detekována množství spermidinu v rozmezí hodnot 0,4-4,1 mg/kg, u výroby AN byla naměřena vybočující hodnota 10,3 mg/kg 28. den od výroby. Do konce doby skladování byl u všech výrob, zaznamenám snižující se trend. Vývoj obsahu spermidinu je znázorněn na obrázku 19 a 20.

Buňková et al. [63] uvádí ve své práci, že jsou polyaminy spermin a spermidin přirozenou součástí mléka, proto se jejich produkce nepřipisuje přítomným mikroorganismům, ale předpokládá se, že pochází z původního materiálu. Toto tvrzení se nám nepotvrdilo. V naší práci docházelo k mírnému zvyšování koncentrací těchto polyaminů, které by se dalo přisoudit aktivitě přítomných mikroorganismů.

Obrázek 19: Vývoj obsahu spermidinu v průběhu zrání u nízkosolených sýrů



Obrázek 20: Vývoj obsahu spermidinu v průběhu zrání u vysokosolených sýrů



ZÁVĚR

V rámci praktické části diplomové práce, bylo hlavním cílem sledovat dekarboxylázovou aktivitu vybraných kmenů bakterií mléčného kvašení v reálném prostředí potraviny (přírodním sýru). V praktické části bylo vyrobeno 6 šarží modelových vzorků sýra holandského typu. Byly vyrobeny kontrolní výroby s běžnou komerční kulturou, dále výroby inokulované dekarboxyláza-pozitivním kmenem *Lc. lactis* subsp. *cremoris* a non-starterovým laktobacilem *Lb. curvatus* subsp. *curvatus*. Jednotlivé šarže se solily na cílovou koncentraci 1,5 % a 2,5 % NaCl. Technologické operace byly totožné s výjimkou sledovaného kmene a způsobu solení. U všech vzorků byla stanovena základní chemická analýza, texturní profilová analýza a stanovena koncentrace volných aminokyselin a biogenních aminů.

V diplomové práci bylo zjištěno, že vyšší koncentrace NaCl, navýší obsah sušiny a v důsledku toho, dojde k navýšení pevnosti modelových vzorků sýrů. Nárůst pevnosti mohl být pravděpodobně způsoben difuzí NaCl z okrajových částí do středu a proteolytickými změnami kaseinů (bobtnání proteinové matrice). V dalších stádiích zrání docházelo k postupnému poklesu hodnot pevnosti modelových vzorků, přičemž po celou dobu byl zachován trend vyšší pevnosti v případě více solených vzorků. Postupné snižování pevnosti sýrové matrice je obecně způsobeno hydrolýzou proteinové sítě, kterou může vyvolat proteolytická aktivita kyselých a neutrálních bakterií mléčného kvašení.

Ze stanovení volných aminokyselin vyplývá, že intenzita proteolýzy se zvyšuje s dobou zrání, což vede k hromadění volných aminokyselin, které slouží jako substrát pro dekarboxylázovou aktivitu bakterií přítomných v sýrech.

Za použití metody HPLC byla stanovena koncentrace biogenních aminů. Nejvyšší koncentrace BA, byly naměřeny u výrob inokulovaných starterovým kmenem *Lc. lactis* subsp. *cremoris* v porovnání s ostatními výrobami. Pokud bychom srovnali výrobu nízkosolených a vysokosolených sýrů, pak můžeme říci, že vyšší koncentrace soli mohou přispět ke snížení produkce BA v reálném systému potraviny (zrajícího sýra).

Ve vzorcích byly detekovány pouze tyramin, spermin a spermidin. Absolutně nejvyšší množství tyraminu (891,6 mg/kg) bylo naměřeno poslední den zrání u výroby s použitým dekarboxyláza-pozitivním kmenem, který byl izolován z přírodního sýra a identifikován jako kyselá bakterie.

Ze zjištěných hodnot obsahu biogenních aminů vyplývá nutnost vhodného výběru starterových bakterií, kde by jejich selekce měla být založena nejen na technologické funkci, ale také s ohledem na zajištění zdravotní nezávadnosti potravin ve smyslu nízké produkce biogenních aminů. Za optimálního předpokladu by mikroorganismy používané jako součást starterových kultur neměly produkovat biogenní aminy.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] GÖRNER, F., E. VALÍK. *Aplikovaná mikrobiologie požívatin: principy mikrobiologie požívatin, potravinářsky významné mikroorganismy a ich skupiny, mikrobiologie potravinářských výrob, ochorenia mikrobiálneho pôvodu, ktorých zárodky sú prenášané požívatinami*. 1. vyd. Bratislava: Malé centrum, 2004, 528 s. ISBN 8096706497.
- [2] FERNANDES, Rhea. *Microbiology handbook*. Cambridge: Leatherhead Pub., and Royal Society of Chemistry, c2009, xiii, 173 p. ISBN 1905224621.
- [3] JANET E. L. CORRY, *Handbook of culture media for food microbiology*. 3rd ed. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2010. ISBN 978-184-7559-166.
- [4] BURGAIN, J., J. SCHER, G. FRANCIUS, F. BORGES, M. CORGNEAU, A. M. REVOL-JUNELLES, C. CAILLIEZ-GRIMAL a C. GAIANI. Lactic acid bacteria in dairy food: Surface characterization and interactions with food matrix components. *Advances in Colloid and Interface Science* [online]. 2014, vol. 213, s. 21-35 [cit. 2015-04-23]. DOI: 10.1016/j.cis.2014.09.005.
- [5] SAARELA M. Vol. *Functional dairy products*. Cambridge: Woodhead, 2007. ISBN 978-184-5691-530.
- [6] ŠPANOVÁ, A., Identification of lactic acid bacteria a by polymerase chain reaction. *Mlékařské listy*, 2009, č. 116, s. 12-16
- [7] KIMOTO-NIRA, H., R. AOKI, K. MIZUMACHI, K. SASAKI, H. NAITO, T. SAWADA a C. SUZUKI. Interaction between *Lactococcus lactis* and *Lactococcus raffinolactis* during growth in milk: Development of a new starter culture. *Journal of Dairy Science* [online]. 2012, vol. 95, issue 4, s. 2176-2185 [cit. 2015-04-24]. DOI: 10.3168/jds.2011-4824.
- [8] KADLEC, P., K. MELZOCH, M. VOLDŘICH. *Co byste měli vědět o výrobě potravin?: technologie potravin*. Vyd. 1. Ostrava: Key Publishing, 2009, 536 s. ISBN 978-80-7418-051-4.
- [9] PLOCKOVÁ, M., Š. TŮMA. Protektivní kultury pro výrobu polotvrdých sýrů. *VŠCHT*, 2007, s. 31-37, ISBN 978-80-7080-661-6
- [10] FOX, P. F., P. L. H. McSWEENEY., T. M. COGAN., T. P. GUINEE. *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*. Volume 1 General Aspects. 3rd edition. London: Elsevier Academia Press. 2004. ISBN 0-1226-3652-X

- [11] CASALTA, E a M MONTEL. Safety assessment of dairy microorganisms: The Lactococcus genus. *International Journal of Food Microbiology* [online]. 2008, vol. 126, issue 3, s. 271-273 [cit. 2015-04-24]. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2007.08.013.
- [12] GUTIÉRREZ-MÉNDEZ, N., B. VALLEJO-CORDOBA, A. F. GONZÁLEZ-CÓRDOVA, G. V. NEVÁREZ-MOORILLÓN a B. RIVERA-CHAVIRA. Evaluation of Aroma Generation of Lactococcus lactis with an Electronic Nose and Sensory Analysis. *Journal of Dairy Science* [online]. 2008, vol. 91, issue 1, s. 49-57 [cit. 2015-04-24]. DOI: 10.3168/jds.2007-0193.
- [13] HLADÍKOVÁ, Z., J. SMETANKOVÁ, G. GREIF a M. GREIFOVÁ. Characterization of lactococcus strains and their using in dairy technology. *Potravinarstvo*. 2012-02-15, vol. 6, issue 1, s.
- [14] O'CALLAGHAN, J. a S. CONDON. Growth of Lactococcus lactis strains at low water activity: correlation with the ability to accumulate glycine betaine. *International Journal of Food Microbiology* [online]. 2000, vol. 55, 1-3, s. 127-131 [cit. 2015-04-24]. DOI: 10.1016/s0168-1605(00)00168-9.
- [15] IRAFFA, G., N. CHANISHVILI a Y. WIDYASTUTI. Importance of lactobacilli in food and feed biotechnology. *Research in Microbiology* [online]. 2010, vol. 161, issue 6, s. 480-487 [cit. 2015-04-24]. DOI: 10.1016/j.resmic.2010.03.001.
- [16] SEDLÁČKOVÁ P., Š. HORÁČKOVÁ, M. PLOCKOVÁ. Charakteristika laktobacilů izolovaných z trávicího traktu kojenců. *Mlékařské listy*, č. 129, s. 2-6
- [17] TORRIANI, S., C. A. VAN REENEN, G. KLEIN, G. REUTER, F. DELLAGLIO a L. M. T. DICKS. Lactobacillus curvatus subsp. curvatus subsp. nov. and Lactobacillus curvatus subsp. melibiosus subsp. nov. and Lactobacillus sake subsp. sake subsp. nov. and Lactobacillus sake subsp. carnosus subsp. nov., New Subspecies of Lactobacillus curvatus Abo-Elnaga and Kandler 1965 and Lactobacillus sake Katagiri, Kitahara, and Fukami 1934 (Klein et al. 1996, Emended Descriptions), Respectively. *International Journal of Systematic Bacteriology* [online]. 1996, vol. 46, issue 4, s. 1158-1163 [cit. 2015-04-24]. DOI: 10.1099/00207713-46-4-1158.
- [18] MATARAGAS, M., J. METAXOPOULOS, M. GALIOTOU a E. H. DROSINOS. Influence of pH and temperature on growth and bacteriocin production by Leuconostoc mesenteroides L124 and Lactobacillus curvatus L442. *Meat Science* [online].

- 2003, vol. 64, issue 3, s. 265-271 [cit. 2015-04-24]. DOI: 10.1016/s0309-1740(02)00188-2.
- [19] GUINEE, T P. Salting and the role of salt in cheese. *International Journal of Dairy Technology*. 2004, vol. 57, 2-3, s. 99-109.
- [20] SANTAPAOLA, J., A. ANDRÉS, S. MALDONADO a M. FERNÁNDEZ. APPLICATION OF THE RESPONSE SURFACE ANALYSIS METHOD TO THE STUDY OF SALT AND WATER PROFILES IN GOAT'S CHEESE SALTED IN LAYERS. *Journal of Food Process Engineering* [online]. 2011, vol. 35, issue 3, s. 355-369 [cit. 2015-04-24]. DOI: 10.1111/j.1745-4530.2010.00593.x.
- [21] KADLEC, P. *Technologie potravin II*. 1. vyd. Praha: VŠCHT, 2002, 236 s. ISBN 80-708-0510-2.
- [22] KILCAST, D. ANGUS, FIONA. *Reducing salt in foods*. Cambridge: Woodhead, 2007 ISBN 978-184-5690-182
- [23] FOX, P. F., T. P. GUINEE. Cheese Science and Technology. *Milk and Dairy Products in Human Nutrition*. Oxford: John Wiley, 2013-06-03, s. 357.
- [24] MELILLI, C., D. M. BARBANO, G. LICITRA, G. TUMINO, G. FARINA a S. CARPINO. Influence of Presalting and Brine Concentration on Salt Uptake by Ragusano Cheese. *Journal of Dairy Science* [online]. 2003, vol. 86, issue 4, s. 1083-1100 [cit. 2015-04-24]. DOI: 10.3168/jds.s0022-0302(03)73691-1.
- [25] TURHAN, M. a G. KALETUNÇ. Modeling of Salt Diffusion in White Cheese during Long-Term Brining. *Journal of Food Science* [online]. 1992, vol. 57, issue 5, s. 1082-1085 [cit. 2015-04-24]. DOI: 10.1111/j.1365-2621.1992.tb11269.x.
- [26] TAMIME, A. Y., D. D. MUIR, M. WSZOLEK, J. DOMAGALA, L. METZGER, W. KNEIFEL, K. DÜRRSCHMID, K. J. DOMIG, A. HILL, A. SMITH, T. P. GUINEE Quality Control in Processed Cheese Manufacture. *Processed Cheese and Analogues*. Oxford, UK: Wiley-Blackwell, 2011-06-10, s. 245
- [27] EVERARD, C. D, C. P. O'DONNELL, D. J. O'CALLAGHAN, Elizabeth M SHEEHAN, C. M. DELAHUNTY, B. T. O'KENNEDY a V. HOWARD. Prediction of sensory textural properties from rheological analysis for process cheeses varying in emulsifying salt, protein and moisture contents. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2007, vol. 87, issue 4, s. 641-650.

- [28] PLEVA, P., L. BUŇKOVÁ, E. THEIMROVÁ, V. BARTOŠÁKOVÁ, F. BUŇKA a K. PUREVDORJ. Biogenic amines in smear and mould-ripened cheeses. *Potravinárstvo* [online]. 2014, vol. 8, issue 1 [cit. 2015-04-24]. DOI: 10.5219/408.
- [29] LOIZZO, M. R., F. MENICHINI, N. PICCI, F. PUOCI, U. G. SPIZZIRRI a D. RESTUCCIA. Technological aspects and analytical determination of biogenic amines in cheese. *Trends in Food Science & Technology* [online]. 2013, vol. 30, issue 1, s. 38-55 [cit. 2015-04-24]. DOI: 10.1016/j.tifs.2012.11.005.
- [30] BUŇKOVÁ, L., F. BUŇKA, E. POLLAKOVÁ, T. PODEŠVOVÁ a V. DRÁB. The effect of lactose, NaCl and an aero/anaerobic environment on the tyrosine decarboxylase activity of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* and *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. *International Journal of Food Microbiology* [online]. 2011, vol. 147, issue 2, s. 112-119 [cit. 2015-04-24]. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2011.03.017.
- [31] KAHOTKA, L., I. MANGA, M. HŮLOVÁ, J. PŘICHYSTALOVÁ, T. LŮŽOVÁ, Testování dekarboxylázové aktivity *Escherichia Coli*, Celostátní přehlídka sýrů, VŠCHT, 2012, s. 160-165. ISBN 978-80-7080-838-2
- [32] SHALABY, A. R. Significance of biogenic amines to food safety and human health. *Food Research International* [online]. 1996, vol. 29, issue 7, s. 675-690 [cit. 2015-04-24]. DOI: 10.1016/s0963-9969(96)00066-x.
- [33] BUŇKOVÁ L., F. BUŇKA, M. HLOBILOVÁ, V. DRÁP, S. KRAČMÁR. Komparace různých metod detekce dekarboxylázové aktivity u bakterií mléčného kvašení. *Potravinárstvo vedecký časopis prepotravinárstvo*.2010,s.372-380. ISBN 1337-0960
- [34] European Food Safety Authority (EFSA), Panel on Biological Hazards (BIOHAZ). Scientific Opinion on risk based control of biogenic amine formation in fermented foods. *EFSA Journal* 2011. vol. 9, iss.10. p. 93
- [35] SUZZI, G. Biogenic amines in dry fermented sausages: a review. *International Journal of Food Microbiology* [online]. 2003, vol. 88, issue 1, s. 41-54 [cit. 2015-04-24]. DOI: 10.1016/s0168-1605(03)00080-1.
- [36] LINARES, D. M., B. del R., V. LADERO, N. MARTÍNEZ, M. FERNÁNDEZ, M. C. MARTÍN a M. A. ÁLVAREZ. Factors Influencing Biogenic Amines Accumu-

- lation in Dairy Products. *Frontiers in Microbiology* [online]. 2012, vol. 3 [cit. 2015-04-24]. DOI: 10.3389/fmicb.2012.00180.
- [37] GLÓRIA, M. B. AMINES. *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*. Elsevier, 2003, s. 173.
- [38] PLEVA, P., L. BUŇKOVÁ, A. LAUKOVÁ, E. LORENCOVÁ, V. KUBÁŇ a F. BUŇKA. Factors affected decarboxylation activity of enterococcus faecium isolated from rabbit. *Potravinarstvo* [online]. 2012, vol. 6, issue 2 [cit. 2015-04-24]. DOI: 10.5219/182.
- [39] LUŽOVÁ T., Š. POVOLNÁ, Š. NEDOMOVÁ, K. ŠUSTOVÁ, V. BLAŠKOVÁ. Influence of ripening of Edam cheese on texture properties. *Acta Mendelovy zemědělské a lesnické univerzity v Brně*. Brno: Ediční středisko MZLU v Brně, 2008, 176 s. s. 107-114, ISBN 1211-8516.
- [40] ANONYM. ČSN ISO 11036 (56 0034), Senzorická analýza – Metodologie – Profil textury, 1997.
- [41] ŠUSTOVÁ K. Solení sýrů. Farmářská výroba sýrů a kysaných mléčných výrobků IX. MENDELU, 2012, ISBN 978-80-7375-613-0
- [42] SANTOS, M. H. Silla. Biogenic amines: their importance in foods. *International Journal of Food Microbiology* [online]. 1996, vol. 29, 2-3, s. 213-231 [cit. 2015-04-24]. DOI: 10.1016/0168-1605(95)00032-1.
- [43] BURDYCHOVA, R. a T. KOMPRDA. Biogenic amine-forming microbial communities in cheese. *FEMS Microbiology Letters* [online]. 2007, vol. 276, issue 2, s. 149-155 [cit. 2015-04-24]. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2007.00922.x.
- [44] LADERO, V., E. SÁNCHEZ-LLANA, M. FERNÁNDEZ a M. A. ALVAREZ. Survival of biogenic amine-producing dairy LAB strains at pasteurisation conditions. *International Journal of Food Science & Technology* [online]. 2011, vol. 46, issue 3, s. 516-521 [cit. 2015-04-24]. DOI: 10.1111/j.1365-2621.2010.02508.x.
- [45] GARDINI, F., M. MARTUSCELLI, M. C. CARUSO, F. GALGANO, Maria A. CRUDELE, F. FAVATI, M. E. GUERZONI a G. SUZZI. Effects of pH, temperature and NaCl concentration on the growth kinetics, proteolytic activity and biogenic amine production of *Enterococcus faecalis*. *International Journal of Food Microbiology* [online]. 2001, vol. 64, 1-2, s. 105-117 [cit. 2015-04-24]. DOI: 10.1016/s0168-1605(00)00445-1.

- [46] KARAVIČOVÁ, J. KOHAJDOVÁ Z. Biogenic Amines in Food. *Chemical Paper*. 2003, vol. 59, iss. 1, p. 70-79
- [47] LADERO, V., D. M. LINARES, M. FERNÁNDEZ a M. A. ALVAREZ. Real time quantitative PCR detection of histamine-producing lactic acid bacteria in cheese: Relation with histamine content. *Food Research International*[online]. 2008, vol. 41, issue 10, s. 1015-1019 [cit. 2015-04-24]. DOI: 10.1016/j.foodres.2008.08.001.
- [48] ANONYM, 2005, ČSN ISO 5534. Sýra a tavené sýry – stanovení obsahu celkové sušiny
- [49] INDRA Z., MIZERA J. *Chemické kontrolní metody pro obor zpracování mléka*. Učebnice pro střední průmyslové školy potravinářské. 1992, s. 273.
- [50] PACHLOVÁ, V., BUŇKA, F., BUŇKOVÁ, L., WEISEROVÁ, E., HLADKÁ, K., VOJTÍŠKOVÁ, P., KRÁČMAR, S. Vliv průběhu zrání na obsah vybraných složek v přírodním sýru eidamského typu. *Potravinářstvo*. 2009, s. 33 – 36. ISSN 1337-0960.
- [51] DADÁKOVÁ, E., M. KŘÍŽEK a T. PELIKÁNOVÁ. Determination of biogenic amines in foods using ultra-performance liquid chromatography (UPLC). *Food Chemistry* [online]. 2009, vol. 116, issue 1, s. 365-370 [cit. 2015-04-24]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2009.02.018.
- [52] BUŇKOVÁ, L., G. ADAMCOVÁ, K. HUDCOVÁ, H. VELICHOVÁ, V. PACHLOVÁ, E. LORENCOVÁ a F. BUŇKA. Monitoring of biogenic amines in cheeses manufactured at small-scale farms and in fermented dairy products in the Czech Republic. *Food Chemistry* [online]. 2013, vol. 141, issue 1, s. 548-551 [cit. 2015-04-24]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2013.03.036.
- [53] BUŇKOVÁ, L., F. BUŇKA, M. HLOBILOVÁ, Z. VAŇÁTKOVÁ, D. NOVÁKOVÁ a V. DRÁB. Tyramine production of technological important strains of *Lactobacillus*, *Lactococcus* and *Streptococcus*. *European Food Research and Technology* [online]. 2009, vol. 229, issue 3, s. 533-538 [cit. 2015-04-24]. DOI: 10.1007/s00217-009-1075-3.
- [54] BUŇKOVÁ, L., F. BUŇKA, G. MANTLOVÁ, A. ČABLOVÁ, I. SEDLÁČEK, P. ŠVEC, V. PACHLOVÁ a S. KRÁČMAR. The effect of ripening and storage conditions on the distribution of tyramine, putrescine and cadaverine in Edam-

- cheese. *Food Microbiology* [online]. 2010, vol. 27, issue 7, s. 880-888 [cit. 2015-04-24]. DOI: 10.1016/j.fm.2010.04.014.
- [55] LADERO, V., N. MARTÍNEZ, M. C. MARTÍN, M. FERNÁNDEZ a M. A. ALVAREZ. QPCR for quantitative detection of tyramine-producing bacteria in dairy products. *Food Research International* [online]. 2010, vol. 43, issue 1, s. 289-295 [cit. 2015-04-24]. DOI: 10.1016/j.foodres.2009.10.007.
- [56] FERNÁNDEZ, M., B. del R., D. M. LINARES, M. C. MARTÍN a M. A. ALVAREZ. Real-Time Polymerase Chain Reaction for Quantitative Detection of Histamine-Producing Bacteria: Use in Cheese Production. *Journal of Dairy Science* [online]. 2006, vol. 89, issue 10, s. 3763-3769 [cit. 2015-04-24]. DOI: 10.3168/jds.s0022-0302(06)72417-1.
- [57] BUŇKA F., V. PACHLOVÁ, L. BUŇKOVÁ, J. HRABĚ. Změny jakosti v průběhu zrání polotvrdých sýrů. *Sýry - Zlín - 2012: perspektivy výroby sýrů a hodnocení jejich jakosti: mezinárodní konference: Zlín, 15. listopadu 2012 : sborník příspěvků*. Vyd. 1. Editor Ivan Holko. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta technologická, 2012, 1 CD-ROM. ISBN 978-80-7454-231-2.
- [58] BUŇKA, F., V. PACHLOVÁ a L. NENUTILOVÁ. Texture Properties of Dutch-Type Cheese as a Function of Its Location and Ripening. *International Journal of Food Properties* [online]. 2013, vol. 16, issue 5, s. 1016-1027 [cit. 2015-04-22]. DOI: 10.1080/10942912.2011.575496.
- [59] PACHLOVÁ, V., F. BUŇKA, L. BUŇKOVÁ, E. WEISEROVÁ, P. BUDINSKÝ, M. ŽALUDEK a S. KRÁČMAR. The effect of three different ripening/storage conditions on the distribution of selected parameters in individual parts of Dutch-type cheese. *International Journal of Food Science & Technology* [online]. 2011, vol. 46, issue 1, s. 101-108 [cit. 2015-04-22]. DOI: 10.1111/j.1365-2621.2010.02460.x.
- [60] BUŇKA F., V. PACHLOVÁ, I. BUREŠOVÁ, L. PERNICKÁ, L. BUŇKOVÁ. Využití pelegova modelu pro hodnocení jakosti přírodních sýrů v průběhu zrání. *Potravinářstvo*, 2013, s. 58-62, ISSN 1337-0960
- [61] AL-OTAIBI, M. M. a R. A. WILBEY. Effect of temperature and salt on the maturation of white-salted cheese. *International Journal of Dairy Technology* [online]. 2004, vol. 57, issue 1, s. 57-63 [cit. 2015-04-22]. DOI: 10.1111/j.1471-0307.2004.00123.x.

- [62] HALÁSZ, A., Á. BARÁTH, L. SIMON-SARKADI a W. HOLZAPFEL. Biogenic amines and their production by microorganisms in food. *Trends in Food Science & Technology* [online]. 1994, vol. 5, issue 2, s. 42-49 [cit. 2015-04-24]. DOI: 10.1016/0924-2244(94)90070-1.
- [63] BUŇKOVÁ L., P. BUDÍNSKÝ, G. ADAMCOVÁ, P. PLEVA, F. BUŇKA. Monitoring výskytu biogenních aminů ve fermentovaných mléčných výrobcích v ČR. *Mlékařské listy*, 2012, č. 134, s. 1-3
- [64] BOVER-CID, S., M. IZQUIERDO-PULIDO a M. C. VIDAL-CAROU. Effect of the interaction between a low tyramine-producing *Lactobacillus* and proteolytic staphylococci on biogenic amine production during ripening and storage of dry sausages. *International Journal of Food Microbiology* [online]. 2001, vol. 65, 1-2, s. 113-123 [cit. 2015-04-24]. DOI: 10.1016/s0168-1605(00)00525-0.
- [65] STANDAROVÁ E., I. BORKOVCOVÁ, L. VORLOVÁ. Obsah biogenních aminů v sýrech z české obchodní sítě. Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno. *Veterinářství*. 2008, č. 58, s. 735-739.
- [66] SPANIER, M. C., BRUIN, T. J. F., van ROODE, B. A. S. W. HPLC determination of biogenic amines and evaluation of results. *Food Policy Trends in Europe*, 1991, vol. 6s. 213.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

BMK	Bakterie mléčného kvašení
EMP	Embden-Meyerhof-Parnas
NSLAB	Non-Starter Lactic Acid
CO ₂	Oxid uhličitý
NaCl	Chlorid sodný
S/V	Sůl/vlhkost
SH	Titrační kyselost
KCl	Chlorid draselný
a _w	Aktivita vody
BA	Biogenní aminy
His	Histamin
Tyr	Tyramin
Trp	Tryptamin
Ser	Serotonin
Phe	Fenyletylamin
Put	Putrescin
Kad	Kadaverin
Spn	Spermin
Spd	Spermidin
Agm	Agmatin
TPA	Texturní profilová analýza
HPLC	Vysoce účinná kapalinová chromatografie

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Vznik biogenních aminů z příslušných aminokyselin [29].....	29
Obrázek 2: Rozdělení a kódování vzorků.....	37
Obrázek 3: Zátěžová křivka	39
Obrázek 5: Vývoj obsahu sušiny modelových vzorků sýrů v průběhu zrání.....	44
Obrázek 6: Vývoj pH modelových vzorků sýrů v průběhu zrání.....	45
Obrázek 7: Vývoj obsahu NaCl modelových vzorků sýrů v průběhu zrání	46
Obrázek 8: Vývoj pevnosti před vysolením.....	48
Obrázek 9: Vývoj pevnosti modelových vzorků sýrů v průběhu zrání.....	48
Obrázek 10: Soudržnost modelových vzorků sýrů.....	49
Obrázek 11: Vývoj obsahu volných FAA v průběhu zrání u nízkosolených sýrů	50
Obrázek 13: Vývoj obsahu BA v průběhu zrání u nízkosolených sýrů.....	53
Obrázek 14: Vývoj obsahu BA v průběhu zrání u vysokosolených sýrů	54
Obrázek 15: Vývoj obsahu tyraminu v průběhu zrání u nízkosolených sýrů	55
Obrázek 16: Vývoj obsahu tyraminu v průběhu zrání u vysokosolených sýrů.....	56
Obrázek 17: Vývoj obsahu sperminu v průběhu zrání u nízkosolených sýrů	56
Obrázek 18: Vývoj obsahu sperminu v průběhu zrání u vysokosolených sýrů.....	57
Obrázek 19: Vývoj obsahu spermidinu v průběhu zrání u nízkosolených sýrů.....	58
Obrázek 20: Vývoj obsahu spermidinu v průběhu zrání u vysokosolených sýrů	58

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Rozdělení biogenních aminů	28
Tabulka 3: Eluční program	41

