

Obsah biogenních aminů v přírodním sýru s přídavkem dekarboxyláza pozitivního kmene *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*

Anna Menšíková

Bakalářská práce
2013



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav technologie potravin

akademický rok: 2012/2013

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Anna MENŠÍKOVÁ**
Osobní číslo: **T10068**
Studijní program: **B2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Chemie a technologie potravin**
Forma studia: **prezenční**

Téma práce: **Obsah biogenních aminů v přírodním sýru s
přídavkem dekarboxyláza pozitivního kmene
Lactococcus lactis subsp. cremoris**

Zásady pro vypracování:

I. Teoretická část

1. Stručně charakterizujte výrobu sýrů holandského typu.
2. Mikroflóra sýrů holandského typu.
3. Charakterizujte vývoj biogenních aminů v polotvrdých a tvrdých sýrech během zrání.

II. Praktická část

1. Založte experimenty s vyrobenými modely vzorků s přídavkem a bez přídavku pozitivního kmene.
2. V průběhu zrání sledujte zastoupení vybraných skupin mikroorganismů a biogenních aminů.
3. Výsledky vyhodnoťte a formulujte závěry.

Rozsah bakalářské práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

[1]DRDÁK, M., STUDNICKÝ, J., MÓROVÁ, E., KAROVIČOVÁ, J. Základy potravinářských technologií. 1. Vydání. Bratislava: MALÉ CENTRUM, 1996. 512 s. ISBN 80-967064-1-1.

[2]FOX, P. F. Fundamentals of Cheese Science. Gaithersburg: Aspen Publishers, 2000. ISBN 0-8342-1260-9.

[3]FOX, P.F. a P.L.H. MCSWEENEY. Dairy Chemistry and Biochemistry. 1. vyd. Lon-don: Thomson Science, 1998. ISBN 0-412-72000-0.

[4]HALÁSZ, A.; BARÁTH, Á.; SIMON-SARKADI, L.; HOLZAPFEL, W. Biogenic amines and their production by microorganism in food. Trends in Food Science & Technology, 1994, 5 (2), 42-49.

Vedoucí bakalářské práce: **Ing. Radka Flasarová**
Ústav technologie potravin

Datum zadání bakalářské práce: **16. ledna 2013**

Termín odevzdání bakalářské práce: **2. května 2013**

Ve Zlíně dne 4. února 2013


doc. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan




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

Příjmení a jméno: MENŠÍKOVÁ ANNA

Obor: CHTP

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

- beru na vědomí, že odevzdáním diplomové/bakalářské práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, bez ohledu na výsledek obhajoby ¹⁾;
- beru na vědomí, že diplomová/bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému dostupná k nahlédnutí, že jeden výtisk diplomové/bakalářské práce bude uložen na příslušném ústavu Fakulty technologické UTB ve Zlíně a jeden výtisk bude uložen u vedoucího práce;
- byl/a jsem seznámen/a s tím, že na moji diplomovou/bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3 ²⁾;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ odst. 1 autorského zákona má UTB ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ odst. 2 a 3 mohu užit své dílo – diplomovou/bakalářskou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- beru na vědomí, že pokud bylo k vypracování diplomové/bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tedy pouze k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové/bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- beru na vědomí, že pokud je výstupem diplomové/bakalářské práce jakýkoliv softwarový produkt, považují se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Ve Zlíně 15.5.2013

Menšíková

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 nevýdělečně 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 nahlázení 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

Cílem této bakalářské práce bylo sledování přítomné mikroflóry a její vliv v průběhu zrání na zastoupení vybraných biogenních aminů (tryptamin, phenylethylamin, putrescin, cadaverin, histamin, tyramin, spermidin a spermin) u laboratorně vyrobených sýrů z komerční smetanové kultury (A výroba u sýrů za přídavku dekarboxyláza pozitivního kmene *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* (B výroba). Sýry byly skladovány po dobu 2 měsíců při teplotě 10 ± 2 °C. U všech sýrů byla provedena základní chemická analýza, mikrobiologický rozbor a chromatografické stanovení obsahu biogenních aminů pomocí vysoce účinné kapalinové chromatografie.

Vyšší celkové koncentrace biogenních aminů byly detekovány zejména u sýrů s přídavkem dekarboxyláza pozitivního kmene (B výroby), kde celkové koncentrace na konci doby zrání překročily hodnotu i 800 mg.kg^{-1} , přičemž vyšší hodnoty byly detekovány u vzorků s obsahem NaCl do 2 %. Nejvíce detekovaným biogenním aminem byl tyramin. Naopak biogenní aminy spermin a spermidin nebyly detekovány vůbec.

Klíčová slova: biogenní aminy, sýry holandského typu, mikroorganismy s pozitivní dekarboxylázovou aktivitou

ABSTRACT

The aim of the bachelor thesis was determination of microorganisms during ripening and their influence on selected biogenic amine formation (tryptamine, phenylethylamines, putrescine, cadaverine, histamine, spermidine and spermine) in laboratory produced cheeses from commercial culture (samples A) and cheeses with addition of positive decarboxylase activity microorganism *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* (samples B). Cheeses were stored during 2-month ripening at 10 ± 2 °C. All samples were subjected to basic chemical analysis, microbiological analysis and biogenic amine determination using high performance liquid chromatography.

Higher total biogenic amine amounts were detected especially in cheeses with positive decarboxylation activity microorganism addition (samples B), the total biogenic amine concentrations reached the amounts 800 mg.kg^{-1} . These values were presented especially

in samples with NaCl content to 2 %. The most observed biogenic amine was tyramine. Spermidine and spermine weren't detected in any samples during cheese ripening.

Keywords: biogenic amines, Dutch-type cheese, microorganisms with positive decarboxylase activity

Tímto bych ráda poděkovala vedoucí mé bakalářské práce Ing. Radce Flasarové za odborné vedení, rady, připomínky a trpělivost.

Dále bych chtěla poděkovat doc. Ing. Františku Buňkovi, Ph.D. a doc. RNDr. Leoně Buňkové, Ph.D za jejich odborné konzultace.

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

OBSAH

ÚVOD	11
I TEORETICKÁ ČÁST	12
1 SÝRY HOLANDESKÉHO TYPU	13
1.1 VÝROBA SÝRŮ HOLANDESKÉHO TYPU	13
1.2 BIOCHEMICKÉ PROCESY PROBÍHAJÍCÍ BĚHEM ZRÁNÍ.....	15
1.2.1 Rozklad laktózy BMK na kyselinu mléčnou a přeměna kyseliny mléčné	16
1.2.2 Proteolýza.....	18
1.2.3 Lipolýza a reakce volných mastných kyselin.....	18
1.2.4 Metabolismus citrátu	19
2 MIKROFLÓRA SÝRŮ HOLANDESKÉHO TYPU	20
2.1 ZÁKYSOVÉ BAKTERIE A JEJICH RŮST V SÝRECH	20
2.2 NEZÁKYSOVÉ BAKTERIE A JEJICH RŮST V SÝRECH	21
3 VÝVOJ BIOGENNÍCH AMINŮ V POLOTVRDÝCH A TVRDÝCH SÝRECH BĚHEM ZRÁNÍ.....	22
3.1 VZNIK BIOGENNÍCH AMINŮ	22
3.2 VLIV BIOGENNÍCH AMINŮ NA LIDSKÝ ORGANISMUS	22
3.3 VÝSKYT BIOGENNÍCH AMINŮ	24
II PRAKTICKÁ ČÁST	25
4 CÍL PRÁCE.....	26
5 MATERIÁL A METODIKA	27
5.1 CHARAKTERISTIKA VZORKŮ	27
5.2 VÝROBA SÝRŮ	27
5.3 ZÁKLADNÍ CHEMICKÁ ANALÝZA	29
5.4 EXTRAKCE A STANOVENÍ BIOGENNÍCH AMINŮ	29
5.5 MIKROBIOLOGICKÁ ANALÝZA	30
6 VÝSLEDKY A DISKUZE	32
6.1 ZÁKLADNÍ CHEMICKÁ ANALÝZA	32
6.2 ANALÝZA OBSAHU BIOGENNÍCH AMINŮ	36
6.3 MIKROBIOLOGICKÁ ANALÝZA	38
6.3.1 Výsledky stanovení celkového počtu mikroorganismů	39
6.3.2 Výsledky stanovení počtu enterokoků a koliformních bakterií	40
6.3.3 Výsledky stanovení počtu mléčných koků	41
6.3.4 Výsledky stanovení počtu bakterií rostoucích na MRS agaru	44
6.4 SOUHRNNÁ DISKUZE.....	45
ZÁVĚR	49
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	50
SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....	54
SEZNAM OBRÁZKŮ.....	55
SEZNAM TABULEK	56
SEZNAM GRAFŮ.....	57

PŘÍLOHA I: SLOŽENÍ KULTIVAČNÍCH MÉDIÍ	59
--	-----------

ÚVOD

Sýr je obecný název pro skupinu fermentovaných mléčných výrobků rozmanitých chutí, aromat, forem a textur vyráběných po celém světě. Podle dostupné literatury byly první sýry vyrobeny náhodně kočovnými kmeny z jižní Asie a Středního východu. Podle archeologů se pak nejstarší nálezy datují od doby asi 6000 let před naším letopočtem. Sumerové uchovávali sýr již zhruba 4000 let př. n. l., avšak výrobu sýrů dovedli k dokonalosti až Římané, kteří ve svých domech byli schopni ovlivňovat jednotlivé fáze zrání sýrů. Podoba současných sýrů se začala profilovat až ve středověku [1] a např. Fox a kol. [2] ve své literatuře uvádí, že vznik sýrů holandského typu se datuje již od 17. století. Vznik sýru Goudy, jakožto jednomu z neznámějších zástupců této skupiny sýrů, je přisuzován roku 1697 [1].

Sýry jsou bohatým zdrojem živin pro lidskou spotřebu. Mikroflóra sýrů je tvořena převážně bakteriemi mléčného kvašení (BMK), jejichž hlavní funkcí je metabolizovat mléčný disacharid laktózu na kyselinu mléčnou, která má nezastupitelné místo v procesech zrání sýrů. U některých kmenů BMK byla detekována pozitivní dekarboxylázová aktivita, díky které jsou tyto bakterie schopny ve vhodných podmínkách tvořit biologicky aktivní látky – biogenní aminy. V současné době je přítomnost BA, respektive mikroorganismů majících schopnost BA produkovat, intenzivně zkoumána zejména z důvodu vlivu na zdraví konzumentů, který může být jak pozitivní tak negativní [2,3].

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 SÝRY HOLANDSKÉHO TYPU

Dle vyhlášky č. 77/2003 Sb. ze dne 6. března 2003 (v platném znění), je sýr mléčný výrobek vyrobený vysrážením mléčné bílkoviny z mléka působením syřidla nebo jiných vhodných koagulačních činidel, prokysáním a oddělením podílu syrovátky [4]. Sýry holandského typu pak dle téže vyhlášky patří do skupiny přírodních sýrů, podskupina polotvrdé nebo tvrdé sýry [4].

Mezi významné zástupce sýrů holandského typu patří především Edam a Gouda. Tyto sýry mají většinou ochrannou známku původu, která zaručuje jak technologický postup, tak i jakost a původ surovin. Mezi české nejznámější zástupce sýrů holandského typu patří například Eidam [5].

Sýry nejen v minulosti, ale i v současnosti jsou velmi důležitou složkou stravy člověka, a to nejen díky vysokému obsahu bílkovin, s nimiž je i spojený obsah esenciálních aminokyselin, ale také značnému podílu vápníku, jehož množství se však může značně lišit podle typu výrobku. Nezanedbatelná je i přítomnost snadno stravitelných tuků, které jsou jemně rozptýleny, a jsou bohaté na mastné kyseliny s krátkým až středně dlouhým řetězcem (např. kyselina stearová, palmitová, olejová), které se mohou uvolňovat z triacylglycerolů a jsou prekurzorem pro vznik sensoricky aktivních látek. Tuk je také nositelem důležitých vitaminů rozpustných v tucích (například vitamin A, D a E) [6]. Kromě vitaminů rozpustných v tucích jsou přítomné i vitaminy rozpustné ve vodě, zejména vitaminy skupiny B [6].

1.1 Výroba sýrů holandského typu

Vstupní surovinou pro výrobu sýrů je mléko, na které jsou kladeny vysoké požadavky, zejména na jeho jakost (např. dobrá syřitelnost, prokysávací schopnost, mikrobiologická jakost mléka aj.) [7].

Při přijímání mléka do mlékárny jsou prováděny testy, které poukazují na kvalitu přijímané suroviny. Mléko by nemělo mít zvýšenou kyselost, přičemž optimální hodnota titrační kyselosti u čerstvého mléka se pohybuje okolo 7,0 °SH (v ČR se za optimální stav považuje hodnota 6,2 – 7,8 °SH), aktivní kyselost pak obvykle pH 6,5 – 6,7 [7,8]. Obsah mikroorganismů v čerstvém mléce by dle Nařízení evropského parlamentu a rady (ES) č. 853/2004 ze dne 29. dubna 2004 neměl být vyšší než 100 000 KTJ/ml při 30 °C a počet somatických buněk by neměl převyšovat hodnotu 400 000 buněk v 1 ml mléka [9].

V minulosti byly sýry tradičně vyráběny ze syrového mléka. Syrové mléko pro výrobu sýrů se používalo zejména do roku 1940, ale i v současné době jsou známy některé typy sýrů vyrábě-

né ze syrového mléka. Mezi nejznámější zástupce holandských sýrů vyráběných ze syrového mléka můžeme zařadit například Kollumer či Texelaar [8,10]. Použití tepelně neošetřeného mléka může způsobovat řadu problémů, ať už z hlediska hygienického (možné potenciační riziko ohrožení zdraví konzumentů) či technologického, kdy možná sekundární kontaminace může mít negativní vliv na technologii výroby sýrů či jejich senzoryckou jakost (například žluknutí tuků, či snížení SH i pH mléka kyselinotvornými mikroorganismy, čímž vzniká možnost nežádoucího sražení mléka). Z těchto důvodů se před samotnou výrobou většiny typů sýrů provádí tepelné ošetření mléka, a to především šetrná pasteurace, která je dle vyhlášky č. 77/2003 Sb., ze dne 6. března 2003 (v platném znění), definována jako použití teploty nejméně 71,7 °C po dobu nejméně 15 sekund popřípadě jiná kombinace času a teploty za účelem dosažení rovnocenného účinku [4]. Po tepelném ošetření je mléko ochlazeno na požadovanou teplotu a připraveno na další technologický krok výroby – inokulace zákysovou kulturou. Před samotnou inokulací je do mléka přidáván nasycený roztok CaCl_2 v množství 20 – 40 ml na 100 litrů mléka. Dále se může přidávat KNO_3 v množství 3 – 15 g na 100 litrů mléka, který následně chrání zrající sýry před duřením tak, že snižuje možnost růstu sporetvorných mikroorganismů (např. *Clostridium tyrobutiricum*). Takto upravené mléko je zahřáno na 30 – 35 °C a po dosažení požadované teploty je provedena inokulace provozním zákysem [2,7,8].

Po pomnožení zákysové kultury následuje sýření. U sýrů holandského typu se využívá sladké sražení, které je zprostředkováno chymozinem, což je enzym, který katalyzuje specifické vysražení kaseinových bílkovin. Chymozin je získáván ze žaludků sajících telat, ale kvůli jeho nedostatku je v současné době nahrazován například produkcí geneticky modifikovaných mikroorganismů jako je například *Bacillus subtilis*, *Apergillus* spp. a *Escherichia coli*. U tvrdých a polotvrdých sýrů se množství syřidla volí tak, aby sýření proběhlo zhruba za 20 – 30 minut při teplotě 31 – 32 °C. Mléko sražené na tuhou, gelovitou hmotu je prokrojeno tzv. sýrařskými harfami. Takto prokrojená sýřenina je ponechána v klidu a může tak docházet k tzv. synezezi, při které odchází ze sýřeniny část syrovátky a zrno se vytužuje (stává se pevnějším). Poté je sýřenina míchána za vzniku sýrařských zrn o požadované velikosti obilky [8,11,12].

Jelikož sýry holandského typu patří do skupiny sýrů s nízkodohřívanou sýřeninou, další fází výroby je dohřívání sýřeniny, což je proces, při kterém je asi $\frac{1}{4}$ syrovátky nahrazena takzvanou prací vodou o teplotě 80 – 90 °C. Cílem dohřívání je zvýšení teploty sýřeniny pomocí prací vody na 38 – 42 °C. Při tomto kroku také dochází ke snížení obsahu rozpustných látek, zejména laktózy, čímž jsou regulovány mikrobiologické procesy. Na dohřívání navazuje do-

soušení sýřeniny, což je míchání sýřeniny v syrovátce po dosažení požadované teploty. Cílem je zvyšování sušiny zrna a ovlivnění probíhajícího prokysávání. U nízkodohříváných sýrů tento krok trvá obvykle 20 – 30 minut [8,7].

Dalším krokem je vypouštění zrna do forem za současného odkapu syrovátky, aby se zabránilo oschnutí zrna. Poté je sýřenina ve formách lisována za použití tlaku 25 – 55 kPa (po dobu 1 až 20 hodin v závislosti na velikosti a typu lisovaného sýra). Během formování sýrů, zejména pokud formování trvá několik hodin, nastává intenzivní rozvoj bakterií mléčného kvašení, v důsledku čehož je laktóza metabolizována na kyselinu mléčnou [8].

Solení sýrů je krok, který má vliv na organoleptické vlastnosti sýra, zlepšuje i jeho stravitelnost, podílí se na osmoticko – difúzních procesech a reguluje růst mikroorganismů. Solení vytvarovaných sýrů probíhá zpravidla v solné lázni o koncentraci 18 až 22 % NaCl. Konečný obsah NaCl v sýrech se nejčastěji pohybuje mezi 0,8 až 2,5 %. Po krátkém oschnutí se sýry balí do obalů, kdy mohou být použity polopropustné fólie, vosk či nátěrová hmota. Zrání probíhá ve zrácích sklepech při teplotě 8 ± 2 °C a relativní vlhkosti 80 %. Optimální zrácí doba sýrů holandského typu je zpravidla 6 – 8 týdnů [8,7].

Během zrání dochází ke změnám, které probíhají již od formování sýrů v důsledku mikrobiologických a enzymatických vlivů. Zrání probíhá v celé hmotě sýra. U polotvrdých sýrů je to zejména díky primárním (zákysovým) kulturám, které se během výroby přidávají do mléka. Jednotlivé procesy zrání sýrů jsou popsány v kapitole 1.2 Biochemické procesy probíhající během zrání [1,6].

1.2 Biochemické procesy probíhající během zrání

Zrání sýrů je složitý biochemický proces probíhající působením mikrobiálních enzymů nebo enzymů syřidla, přičemž je ovlivňován vzhled, chuť, vůně a konzistence sýra. Během zrání dochází také k mikrobiologickým změnám, pro které je charakteristický rozklad zákysových kultur a naopak růst kultur nezákysových.

Biochemické procesy během zrání je možné rozdělit do následujících fází [8]:

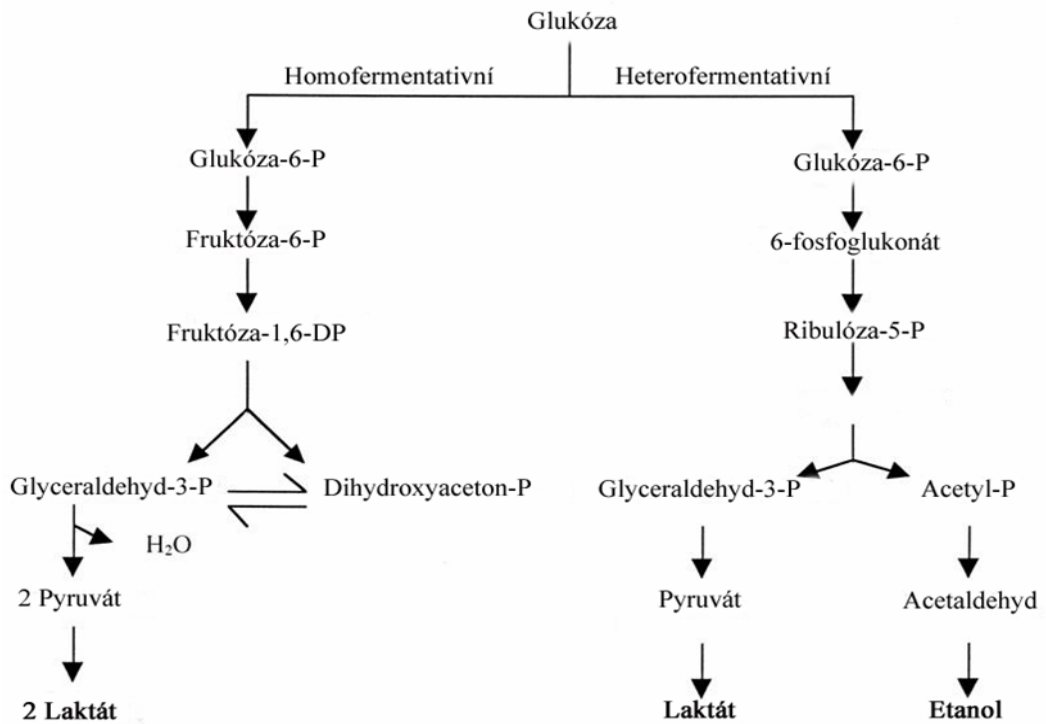
- a) Rozklad laktózy BMK na kyselinu mléčnou a přeměna kyseliny mléčné,
- b) Proteolýza,
- c) Lipolýza a reakce volných mastných kyselin,
- d) Metabolismus citrátu.

1.2.1 Rozklad laktózy BMK na kyselinu mléčnou a přeměna kyseliny mléčné

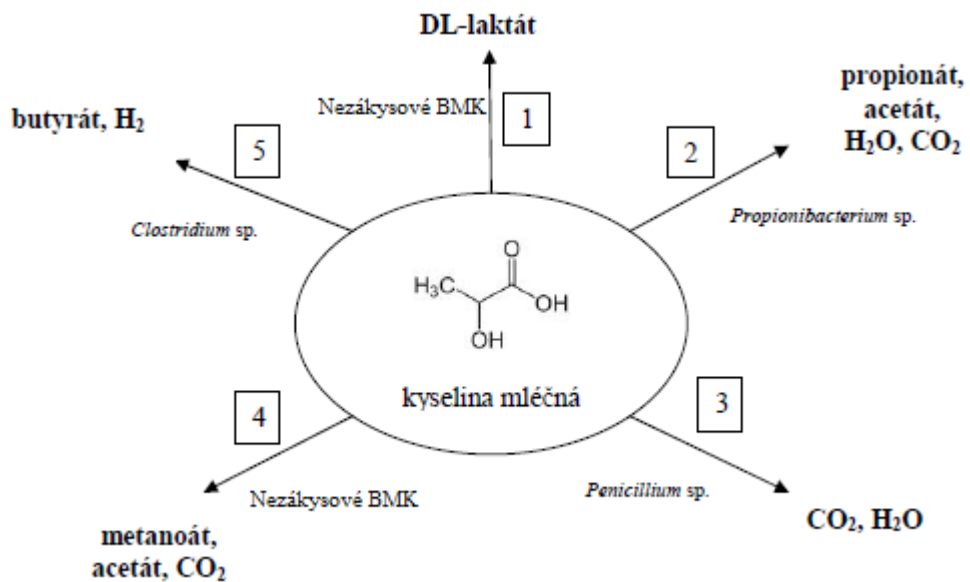
Rozklad laktózy, přičemž její počáteční obsah v sýřenině sýrů holandského typu je dle Foxe a kol. [2] okolo 3%, nastává již při formování a lisování sýřeniny. U sýrů holandského typu je tento rozklad laktózy zprostředkován především homofermentativními BMK, které štěpí laktózu enzymem (β – galaktosidázou) na glukózu a galaktózu. Galaktóza je dále převedena na glukózu. Glykolýzou vzniká kyselina mléčná jako hlavní produkt reakce (Obrázek 1) [13]. L – laktát produkovaný rody *Lactococcus* může být nezákysovými bakteriemi racemizován na D – laktát (Obrázek 2), (v Čedaru a v sýrech holandského typu), který je méně rozpustný, což vede k tvorbě krystalků, které se mohou objevit na povrchu zralého sýra (zejména u dlouhodobě zrajících) jako bílé skvrny sýrů [14]. Racemizace zahrnuje oxidaci L – laktátu činností L – laktát dehydrogenázy na pyruvát, který je následně redukován D – laktát dehydrogenázou na D – laktát. U sýrů holandského typu se množství zbytkové laktózy podle Foxe [2] snižuje na nedetekovatelné množství (< 0,1 %) asi během prvních 12 hodin zrání, přičemž rychlost fermentace zbytkové laktózy BMK je do jisté míry závislá na koncentraci NaCl v sýřenině [14].

Vápník uvolněný z kaseinu reaguje se vzniklou kyselinou mléčnou za vzniku mléčnanu vápenatého. Zrna sýřeniny jsou slepována a mění se v homogenní hmotu prostřednictvím monokalciumpkaseinátu, který ve slabých roztocích solí bobtná. Probíhá také přeměna anorganických solí fosforu a vápenatých solí (až 80 %) v rozpustnou formu. V průběhu zrání dochází k rozkladu kyseliny mléčné na další kyseliny (zejména propionová, octová aj.), oxid uhličitý, vodu, případně jiné sloučeniny v závislosti na charakteru a složení sekundární zákysové kultury (Obrázek 2) [7,11,15,16].

Obrázek 1: Glykolýza zprostředkovaná homofermentativními a heterofermentativními bakteriemi mléčného kvašení [13]



Obrázek 2: Metabolismus kyseliny mléčné v průběhu zrání sýrů



Kde: 1 – racemizace, 2 – metabolismus pomocí *Propionibacterium* spp., 3 – metabolismus pomocí *Penicillium* spp., 4 – metabolismus pomocí nezákysové BMK, 5 – anaerobní metabolismus pomocí *Clostridium* spp. [14]

1.2.2 Proteolýza

Proteolytické reakce probíhají díky působení enzymů bakterií mléčného kvašení (mají velmi komplexní proteolytický systém), syřidla, případně nezákysových BMK (zejména pokud je k výrobě použito tepelně neošetřené mléko). Působením proteolytických enzymů jsou tvořeny štěpy – peptidy s velkou molekulovou hmotností, ze kterých další hydrolyzou vznikají peptidy s nižší molekulovou hmotností. Peptidy, které vznikají, se vyznačují významným vlivem na senzory jakost sýrů, zejména na chuť. Vliv na chuť sýrů může být pozitivní, ale i negativní, což závisí na kvantitativním zastoupení peptidů, protože některé peptidy mohou způsobovat nežádoucí hořkou chuť. Významnou tvorbou hořkých peptidů se vyznačují některé proteolytické enzymy buněčných stěn konkrétních kmenů rodu *Lactococcus*, což může být důvodem omezení jejich přítomnosti ve složení komerčních kultur. Delší dobou zrání se mohou peptidy rozkládat až na volné aminokyseliny, ze kterých mohou za určitých podmínek vznikat biogenní aminy, což jsou látky biologicky aktivní a jejich případné vysoké koncentrace mohou mít pro lidský organismus toxické účinky [7,15,17,18].

Katabolismus aminokyselin hraje hlavní roli ve vývoji chuťových látek [14].

1.2.3 Lipolýza a reakce volných mastných kyselin

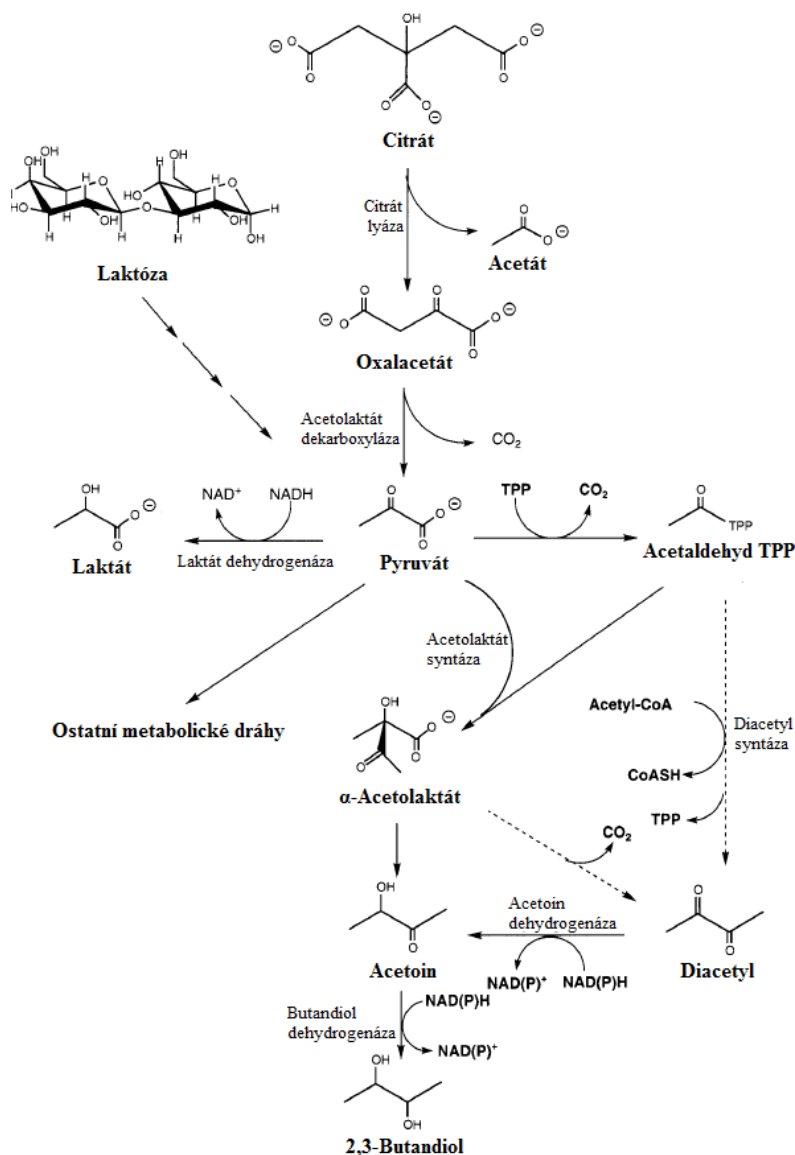
Lipolýza je proces během kterého dochází účinkem lipáz k uvolnění mastných kyselin z triacylglycerolů. Lipázy mohou být endogenní, mezi které můžeme zařadit lipoproteinlipázu, jejíž činnost je výrazná zejména u sýrů vyrobených ze syrového mléka (pasterací je tato lipáza částečně inaktivována) či exogenní, tedy lipázy mikrobiální [14]. Jednotlivé druhy sýrů mají odlišnou koncentraci MK. U sýrů holandského typu se koncentrace mastných kyselin pohybuje v rozmezí 200 – 1000 mg.kg⁻¹, oproti tomu například u sýrů s plísní v těstě jsou tyto koncentrace daleko vyšší (až 30 000 mg.kg⁻¹) [14].

Následnou reakcí nově vzniklých volných mastných kyselin dochází k tvorbě významných senzory aktivních látek (aldehydy, ketony, amoniak aj.). Menší množství těchto látek je příjemné a žádoucí, avšak vyšší koncentrace mohou způsobit nežádoucí senzory vady. U sýrů holandského typu je oproti sýrům s plísní v těstě typická nízká úroveň lipolýzy (vysoká úroveň lipolýzy u sýrů s plísní v těstě je dána zejména činností *Penicillium* spp.) a je dána nízkou lipolytickou aktivitou enzymů zákysových i nezákysových bakterií [7,11,15].

1.2.4 Metabolismus citrátu

Čerstvé mléko obsahuje nízké koncentrace (0,16 %) citrátu a z toho většina (až 90 %) při výrobě sýrů odchází do syrovátky. Zbytek citrátu zůstává v sýřenině, který je během zrání metabolizován mezofilními kyslíkovými bakteriemi (například *Leuconostoc* spp. a citrát pozitivní kmeny *Lactococcus*, zejména *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* var. *diacetylactis*) v přítomnosti zkvasitelných sacharidů na sloučeniny jako je diacetyl, 2,3 – butandiol aj., což jsou senzoricke aktivní látky, které přispívají k vývoji typické chuti sýrů holandského typu. Vzniklý CO_2 je zodpovědný za tvorbu malých ok, které jsou u sýrů holandského typu žádoucí (3 – 5 ok v nákroji) (Obrázek 3) [2,11,19].

Obrázek 3: Metabolismus citrátu pomocí citrát pozitivních kmenů *Lactococcus* spp. a *Leuconostoc* spp.



2 MIKROFLÓRA SÝRŮ HOLANDSKÉHO TYPU

Z hlediska svého chemického složení (aminokyseliny, vitaminy skupiny B, laktóza aj.) představují sýry vhodné prostředí pro růst a množení mikroorganismů. Mezi faktory, jež tento růst ovlivňují, patří především vodní aktivita, koncentrace soli, pH, oxidačně – redukční potenciál a teplota zrání sýrů, přičemž kombinace jednotlivých faktorů ovlivňuje růst mikroorganismů daleko výrazněji [2].

2.1 Zákysové bakterie a jejich růst v sýrech

Kmeny bakterií mléčného kvašení se běžně využívají pro technologické účely jako zákysové kultury [20]. Tyto kultury mohou být tvořeny nejen bakteriemi, ale také kvasinkami, plísněmi nebo jejich kombinací, které jsou schopny zahájit požadované kvašení při výrobě sýrů a fermentovaných mléčných výrobků (např. jogurty, zakysaná smetana, kefir apod.). Při výrobě sýra jsou vybranými spouštěči kvašení vybrané kmeny mikroorganismů, které jsou záměrně přidávány do mléka nebo smetany, či jejich směsi v průběhu výroby, a jsou tak schopny vyvolat specifické změny ve vzhledu, chuti a textuře konečného produktu [21].

Bakterie mléčného kvašení tvoří velkou přirozenou skupinu pravidelných nesporelujících kataláza negativních mikroaerofilních až fakultativně anaerobních grampozitivních koků a tyčinek, které fermentují sacharidy a tvoří přitom především kyselinu mléčnou [22,23]. Pro výrobu sýrů holandského typu se využívá zejména mezofilní kultura, která zahrnuje jak primární, tak sekundární zákysové kultury. Mezi primární řadíme především homofermentativní bakterie *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* a mezi sekundární *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis*. V současné době se jako součást sekundární zákysové kultury využívají i mikroorganismy typu *Lactobacillus casei* nebo *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* [24].

Počet zákysových bakterií v provozních zákysech se zpravidla pohybuje v rozmezí $10^6 - 10^8$ KTJ.ml⁻¹ a počet zákysových bakterií je u většiny sýrů první den ode dne výroby přibližně 10^9 KTJ.g⁻¹ [6,2]. Během výroby jsou zákysové bakterie dominující mikroflórou sýrů, ale jejich činnost je výrazně snížena na konci výroby zejména díky poklesu pH a přítomnosti NaCl [14]. Jakmile nastane lýze zákysových bakterií, začnou se v důsledku rozpadu buněk vyskytovat intracelulární enzymy, zejména peptidázy, které spolu s chymozinem a bakteriálními proteinázami hydrolyzují kaseiny na peptidy a následně až na aminokyseliny, které v sýrech vystupují jako prekurzory sensoricky aktivních látek. Zákysové bakterie se značně

liší časem rozpadu – některé kmeny se rozpadají poměrně rychle, zato jiné stěží, či vůbec. Rozpad je způsoben zejména intracelulární muramidásou, což je hlavní autolytický enzym laktokoků, který hydrolyzuje buněčnou stěnu (peptidoglykan). Množství tohoto enzymu je přísně regulováno, jinak by buňky jako takové nemohly růst. Obecně platí, že kmeny *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* podléhají lýze rychleji (například oproti kmenům *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*), což může mít za následek vznik většího množství sensoricky aktivních látek. Sýry vyrobené s poměrně rychle lyzující zákysovou kulturou zrají rychleji, než ty vyrobené s přidavkem zákysových kultur, které lyzují pomaleji [2,14].

2.2 Nezákysové bakterie a jejich růst v sýrech

Většina sýrů může obsahovat vedle zákysových BMK i bakterie nezákysové, jejichž přítomnost je do jisté míry žádoucí především z hlediska možné rozmanitosti výroby. Tyto bakterie jsou většinou fakultativně heterofermentativní laktobacily, jako je například *Lactobacillus casei*, *Lb. paracasei*, *Lb. plantarum*, a *Lb. curvatus* a obligátně heterofermentativní *Lactobacillus* spp., jako je například *Lb. brevis* a *Lb. fermentum*. Některé z těchto bakterií jsou termo-rezistentní (přežívají pasteraci) a po prokysání sýrů startérovými bakteriemi přispívají k rozvoji sensoricky aktivních látek tak, že metabolizují bílkoviny za vzniku peptidů až aminokyselin (dle délky zrání sýrů) a lipidy za vzniku mastných kyselin. Nezákysové bakterie se tedy do sýrů mohou dostat zpravidla z prostředí samotné technologie výroby sýrů [2,25]. Kleter uvádí, že v případě výskytu laktobacilů může dojít k navýšení jejich počtu třeba jen z $1 \text{ KTJ} \cdot \text{ml}^{-1}$ mléka i na hodnoty vyšší než $10^7 \text{ KTJ} \cdot \text{ml}^{-1}$ během několika týdnů [26].

3 VÝVOJ BIOGENNÍCH AMINŮ V POLOTVRDÝCH A TVRDÝCH SÝRECH BĚHEM ZRÁNÍ

Biogenní aminy jsou nízkomolekulární alifatické, aromatické nebo heterocyklické sloučeniny odvozené od aminokyselin vyskytující se v živých organismech ve formě metabolických meziproduktů a produktů majících biologickou aktivitu. V nízkých koncentracích jsou BA pro organismus živočichů a člověka nezbytné a plní řadu důležitých funkcí (stabilizace makromolekul, zdroj dusíku pro biochemické procesy, lokální tkáňové hormony aj.). Při příjmu vysokých koncentrací se BA řadí mezi kontaminanty a mohou být příčinou alimentárních otrav [10,27].

3.1 Vznik biogenních aminů

Proces tvorby biogenních aminů je katalyzován mikrobiálními enzymy (dekarboxylázami), kdy působením těchto enzymů dochází k uvolnění CO_2 z karboxylové skupiny aminokyselin za vzniku biogenních aminů, například dekarboxylací lyzinu vzniká kadaverin, z histidinu histamin, z tyrozinu tyramin, aj. [3].

Nezbytnými podmínkami pro vytvoření biogenních aminů jsou:

- a) přítomnost volných aminokyselin v daném substrátu,
- b) přítomnost mikroorganismů s dekarboxylázovou aktivitou – pozitivní dekarboxylázová aktivita byla detekována jak u řady rodů gramnegativních bakterií (*Citrobacter*, *Klebsiella*, *Escherichea* aj.), tak i u grampozitivních bakterií rodu *Bacillus*, či bakterií mléčného kvašení z rodů *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, avšak produkce biogenních aminů je vlastnost specifická spíše pro určité kmeny bakterií než vlastnost typická pro daný druh – různé kmeny téhož druhu se mohou lišit ve schopnosti produkovat biogenní aminy [10,18].
- c) podmínky okolního prostředí – tyto vnější faktory mají především vliv na samotný růst mikroorganismů s pozitivní dekarboxylázovou aktivitou, např. teplota, pH prostředí, přítomnost kyslíku, dostupnost zdrojů uhlíkatých sloučenin, fáze růstu buněk, koncentrace NaCl, apod. [3,28,29].

3.2 Vliv biogenních aminů na lidský organismus

Biogenní aminy lze rozdělit vzhledem k účinkům na lidský organismus na látky psychoaktivní, které působí na nervový systém a vazoaktivní, které působí na cévní systém. Mezi psycho-

aktivní biogenní aminy můžeme zařadit histamin, putrescin a kadaverin, a mezi vazoaktivní tyramin [29].

Zdravý jedinec je přirozeně chráněn proti negativním účinkům příjmu vyšších koncentrací BA pomocí detoxikačního mechanismu (aminooxidáz). Jejich účinek je však přirozeně snižován s rostoucím věkem, popřípadě může být ovlivněn působením jejich inhibitorů (alkohol, některé léčiva – např. psychofarmaka). Nadměrný příjem BA z potravy nebo snížená schopnost organismu detoxikovat BA může mít nežádoucí účinky na lidský organismus, jako je například hypertenze, hypotenze, bolesti hlavy vedoucí až k migrénám, bušení srdce, pocení, dýchací potíže, zvracení, průjem, aj., v extrémním případě anafylaktický šok až smrt. Horní hranice, kdy se BA stávají toxickými, není přesně stanovena, protože toxická dávka je silně závislá na účinnosti detoxikačních mechanismů každého jedince. Příjem nad 40 mg BA z jednoho pokrmu se považuje za potencionálně toxickou dávku, ovšem ne všechny BA jsou stejně toxické [30]. Záleží tedy na individuálních rozdílech mezi jedinci, zastoupení a množství BA v dané potravíně, množství konzumované potraviny a přítomnosti jiných složek inhibujících účinek aminooxidáz. Velmi rizikovou potravinou s vyšším obsahem biogenních aminů jsou i fermentované alkoholické nápoje (pivo, víno) nejen díky přítomnosti inhibitorů aminooxidáz (alkohol), ale i během poměrně krátké doby dochází k velké spotřebě dané potraviny [10,18,31,32]. Česká legislativa do roku 2004 zahrnovala legislativní limity pro vybrané BA v rybách, sýrech, pivu a vínu, ale dnes je v ČR platný jen hygienický limit pro histamin v rybách a výrobcích z ryb uváděný v Nařízení komise (ES) č. 2073/2005 ve výši 100 mg.kg^{-1} . Tento limit může být ve dvou vzorcích z devíti z jedné šarže překročen až o 100 % [33,34].

Jedny z nejzávažnějších negativních účinků mají především tyramin a histamin. Vyšší hladiny tyraminu v organismu mohou vést ke vzniku hypertenze, migrén, ale také mohou vyvolat krvácení do mozku, či selhání srdce [31,35]. Podle Komprdy [36] je toxická dávka tyraminu asi $20 - 80 \text{ mg.kg}^{-1}$ potraviny. Nadměrný příjem histaminu může způsobit kopřivku, hypotenzi, bolesti hlavy, návaly horka, břišní křeče aj. Vyšší hladiny byly nalezeny především v sýrech typu gouda [31,35]. Avšak putrescin a kadaverin mohou mít za následek zvyšování účinků histaminu a tyraminu v důsledku ovlivnění detoxikačního mechanismu [10]

3.3 Výskyt biogenních aminů

Biogenní aminy jsou v nízkých koncentracích přirozenou složkou mnohých potravin. Vyšší koncentrace BA lze předpokládat zejména ve fermentovaných výrobcích (zralé sýry, fermentované alkoholické nápoje – pivo, víno, fermentované masné výrobky, fermentovaná zelenina aj.), kde vznikají činností dekarboxyláza pozitivních mikroorganismů. V nefermentovaných výrobcích (ryby, maso mléko, ovoce aj.) vznikají BA ve vyšších koncentracích především díky činnosti kontaminující mikroflóry, tudíž vyšší koncentrace BA mohou být náznakem kažení potravin. Například obsah kadaverinu a putrescinu v čerstvém vepřovém mase je do 7 mg.kg^{-1} , zatímco v mase zkaženém jejich obsah může být 60 mg.kg^{-1} a více [37].

Sýry, jakožto fermentované výrobky, představují ideální prostředí pro vznik BA. Obsah a druh BA obsažených v sýrech je závislý především na druhu sýra, respektive na druhu mikroorganismů v nich zastoupených. Obecně lze říci, že velmi často detekovanými BA v sýrech jsou histamin, tyramin, putrescin a kadaverin [10,32].

Doeglas [38] ve své literatuře popisuje několik případů otrav histaminem ze sýrů, mezi které patří například Gouda, u které byl detekován histamin v množství 85 mg na 100 g sýra. V rámci jiné studie [14] bylo zjištěno, že vznik histaminu v sýru Gouda může být primárně ovlivněn hodnotou pH, teplotou zrání a koncentrací soli, přičemž množství histaminu bylo vždy přímo úměrné velikosti pH, koncentraci soli i teplotě skladování [14].

Chambers a Staruszkiewicz [39] uvádí, že vyšší hladiny biogenních aminů jsou detekovány v sýrech vyrobených z pasterizovaného mléka než z mléka syrového, z čehož lze usuzovat, že bakterie zodpovědné za tvorbu biogenních aminů jsou v mléce přítomny v důsledku sekundární kontaminace nebo vznikají činností zákysových bakterií s pozitivní dekarboxylázovou aktivitou. Ovšem proti tomu existuje tvrzení, že vyšší koncentrace biogenních aminů lze nalézt zejména v sýrech vyrobených ze syrového mléka [25], z čehož tedy vyplývá, že tepelné ošetření mléka před výrobou může být rozhodující stejně jako přítomnost specifických skupin mikroorganismů. Během zrání sýrů pak obsah biogenních aminů zpravidla stoupá, přičemž jejich rozdělení v hmotě sýra je nerovnoměrné. Nejvyšší celkový obsah biogenních aminů v polotvrdých sýrech je dle dosavadních studií nejnižší uprostřed sýra, nejvyšší na okraji [10], což podle Bintsise a kol. může být způsobeno mikroflórou komerční solanky, jež se používá k solení sýrů. Tato mikroflóra se pak stává součástí povrchu sýrů, kde tedy může její činností vznikat vyšší koncentrace BA [40].

II. PRAKTICKÁ ČÁST

4 CÍL PRÁCE

Cílem teoretické části této bakalářské práce bylo:

- popsat výrobu a mikroflóru sýrů holandského typu,
- charakterizovat biogenní aminy.

Cílem praktické části této bakalářské práce bylo:

- založit experimenty s vyrobenými modely vzorků s přídavkem a bez přídavku dekarboxyláza pozitivního kmene,
- sledovat v průběhu zrání sýrů zastoupení vybraných skupin mikroorganismů a biogenních aminů.

5 MATERIÁL A METODIKA

5.1 Charakteristika vzorků

Cílem této práce byla výroba sýrů holandského typu za přídavku komerční smetanové kultury Milcom, a.s. (A výroba), obsahující kmeny *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* a *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* var. *diacetylactis* a zkoumání jejího vlivu na přítomnost a množství biogenních aminů v sýrech, která byla porovnávána s výrobou sýrů za přídavku dekarboxyláza pozitivního kmene *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* (B výroba), jež byl přidán v poměru 1 : 1 se smetanovou kulturou.

Celkem byly vyrobeny dvě série sýrů, přičemž jedna série představuje výrobu A a výrobu B. Pro výrobu A, tzv. kontrolní výroba, byl použit provozní zákys v množství 2 x 50 ml připravený ze smetanové kultury Milcom, a.s. Výroba B byla vyrobena ze dvou provozních zákysů 1 x 50 ml provozního zákysu za použití smetanové kultury Milcom, a.s. a 1 x 50 ml zákysu s přídavkem mikroorganismů s pozitivní dekarboxylázovou aktivitou. Provozní zákysy byly připravovány vždy v rozmezí 16 – 20 hodin před výrobou a byly nechány k prokysání při teplotě 25 ± 2 °C v inkubátoru. Analýza provozních zákysů pro detekci BA a počet mikroorganismů byla vždy provedena ihned po přípravě zákysu (tzv. před prokysáním) (u výroby A označení vzorku – Az1, u výroby B z čistého bujónu – *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* označení vzorku – BzB1), dále po prokysání bezprostředně před výrobou (u výroby A vzorek Az2, u výroby B ze zákysu připraveného pouze ze smetanové kultury BzA2 a u zákysu s přídavkem bujónu BzB2).

Mikrobiologická, chemická analýza a detekce BA u vyrobených sýrů byla provedena vždy 1. (před solením), 30. a 60. den ode dne výroby. Značení vzorků je uvedeno v tabulce č. 1.

5.2 Výroba sýrů

Před samotnou výrobou sýrů byly nejprve vyrobeny zákysy. Mléko pro výrobu zákysů v množství 2 x 50 ml pro každou výrobu bylo ponecháno 0,5 hodiny ve vařící vodní lázni. Po vychladnutí bylo 50 ml mléka zaočkováno 0,15 g smetanové kultury (v případě výroby A), a 1 x 50 ml zaočkováno 0,15 g smetanové kultury a 1 x 50 ml bujónem v množství 5 ml (v případě výroby B). Takto připravené provozní zákysy byly ponechány k prokysání 16 – 20 hodin v inkubátoru při teplotě 25 ± 2 °C.

Celkem z 20 l pasterizovaného kravského mléka (10 l čerstvé mléko selské 1,5 % a 10 l čerstvé mléko selské 3,5 %, Olma a.s., Česká republika) bylo vyrobeno 24 bloků sýrů. Průměrná hmotnost každého bloku byla 90 ± 3 g.

Dvacet litrů mléka bylo zahřáno na 32 °C, po dosažení teploty bylo mléko inokulováno předem připraveným zákysem a přídatkem 10 ml 36% roztoku CaCl_2 (Milcom a.s., Česká republika). Inokulace probíhala po dobu 30 minut za občasných promíchání. Poté bylo přidáno 1,5 ml syřidla Fromase 750TL (DSM Food Specialties, Francie) v desetinásobku vody pro jeho lepší rozptýlení po celém objemu mléka. Po důkladném promíchání a zastavení hladiny probíhalo 40 minut sýření. Následovalo pokrácení sýřeniny a ponechání 10 minut v klidu, po kterých byla sýřenina míchána 20 minut ručně. Dále byla odebrána část syrovátky, která byla nahrazena prací vodou o teplotě 80 °C, která byla postupně přidávána v takovém množství, aby byla dosažena teplota sýřeniny 41 °C, při které bylo sýrařské zrno dohříváno po 60 minut. Po uplynutí doby sýření byla sýřenina slévána do velkých forem vyložených sýrařskou plachetkou. Ve velkých formách docházelo k samovolnému odtoku syrovátky tzv. předlisování po dobu 30 minut, kde po každých 10 minutách byla sýřenina otáčena. Předlisovaná sýřenina byla pokrácena na stejné díly, které byly upěchovány do malých sýrařských forem vyložených plachetkou. V těchto formách byla sýřenina lisována 1,5 hodiny, kdy se každých 30 minut tlak lineárně zvyšoval až do konce lisování. Vyvinuté tlaky během lisování na jednotlivé formy byly 8,5 – 25,5 kPa. Vylisovaná sýřenina byla inkubována ve zrací komoře k prokysání do druhého dne při laboratorní teplotě 21 ± 2 °C. Druhý den byly sýry soleny v solném roztoku o koncentraci 20 %. Jedna polovina sýrů (12 bloků) byla solena po dobu 60 minut, kdy otáčení bloků sýrů proběhlo po 30 minutách. Takto bylo dosaženo obsahu soli 2,5 %, kterému ve značení vzorků odpovídá písmeno H (high concentration). Druhá polovina sýrů (12 bloků) byla solena po dobu 30 minut a bloky byly otáčeny po 15 minutách, čímž bylo dosaženo 1,5 % soli, kterému ve značení vzorků odpovídá písmeno L (low concentration). Po okapání sýrů byly bloky na pár vteřin ponořeny do DelvociduDiP (DSM Food Specialties, Francie), osušeny a baleny pomocí potravinářského vosku žlutého (DSM Food Specialties, Francie), přičemž vosk byl vytemperován na teplotu 65 °C. Takto připravené bloky byly uskladněny ve zracích komorách po dobu 2 měsíců při teplotě 10 ± 2 °C.

B výroba byla vyrobena obdobným způsobem, avšak 1 x 50 ml smetanového zákyse bylo nahrazeno zákysem s přídatkem dekarboxyláza pozitivního kmene.

Tabulka 1: Značení vzorků sýrů

Den odběrů	Obsah soli (%)	A výroba		B výroba	
		1. série	2. série	1. série	2. série
1. den	0	1A1	2A1	1B1,	2B1
30. den	2,5	1A2H	2A2H	1B2H	2B2H
	1,5	1A2L	2A2L	1A2L	2A2L
60. den	2,5	1A3H	2A3H	1A3H	2A3H
	1,5	1A3L	2A3L	1A3L	2A3L

Kde: A – kontrolní výroba; B – výroba s přidavkem dekarboxyláza pozitivního kmene; 1 až 3 – označuje den odběrů; H – vyšší koncentrace soli; L – nižší koncentrace soli

5.3 Základní chemická analýza

Celkový obsah sušiny byl stanovován sušením v sušárně při 102 ± 2 °C a to až do konstantních hmotnostních úbytků podle normy ISO 5534:2004 [41]. Hodnota pH byla měřena pomocí vpichového pH metru (Spear – Eutech, Nizozemsko) s přesností $\pm 0,01$. Obsah soli ve vzorcích byl stanoven metodou podle Indra a Mizera [42]. Při této metodě je činidlem dusičnan stříbrný a indikátor chroman draselný, jenž v bodě ekvivalence vytváří hnědočervenou sraženinu chromanu stříbrného. Všechny výše uvedené parametry byly stanovovány celkem třikrát u každého bloku sýra a vždy byly analyzovány 2 bloky sýra z každého typu.

5.4 Extrakce a stanovení biogenních aminů

Extrakce biogenních aminů byla provedena podle Buňkové a kol. [10] z lyofilizátů, které byly předem připraveny v lyofilizátoru ALPHA1 – 4 LSC (Christ, Německo) za teploty - 40 °C, tlaku ~ 12 Pa po dobu dvou dnů. Jeden gram lyofilizátu byl navážen do 15 ml zkumavek a k tomuto bylo přidáno 10 ml HCl. Směs byla homogenizována po dobu 30 minut a poté odstředována v odstředivce EBA 21 (HettichZENTRIFUGEN, Německo) po dobu 20 minut při 6000 ot./min. Směs byla převedena do odměrné 25 ml baňky. Vzniklý sediment byl obdobným způsobem 2x reextrahován, avšak za přídatku 7 ml 0,1M HCl. Poté byla odměrná baňka doplněna po rysku 0,1 M HCl, směs byla přefiltrována a připravena k derivatizaci.

Derivatizace byla provedena pomocí reakčního činidla dansylchloridu, kdy byl odpipetován 1 ml extraktu do derivatizační nádoby, ke kterému byl přidán 1,5 ml uhličitanového pufru o pH 11,0 – 11,1. Následně byly přidány 2 ml čerstvě připraveného roztoku dansylchloridu

o koncentraci 5 g/l v acetonu a po dobu 20 hodin byla směs třepána ve tmě na třepačce. Poté bylo přidáno 200 µl roztoku prolinu a třepáno na třepačce 1 hodinu. Dále byly přidány 3 ml heptanu a 3 minuty ručně třepáno. 1 ml z heptanové vrstvy byl odpipetován do vialky, která byla při teplotě 60 °C odpařena do sucha pod proudem dusíku. Suchý odparek byl zředěn 1,5 ml acetonitrilu. Před samotnou analýzou byla směs přefiltrována přes stříkačkový filtr s porozitou 0,22 µm. Detekce biogenních aminů byla provedena pomocí UV/VIS detektoru HPLC sestavy Agilent Technologies za použití kolony AgilentEclipse Plus C18RRHD (Agilent Technologies, USA) o rozměrech 3,0 x 50 mm x 1,8 µm. Měření probíhalo při vlnové délce 254 nm a teplotě kolony 30 °C. Analýza byla zaměřena na detekci 8 biogenních aminů (tryptamin, phenylethylamin, putrescin, cadaverin, histamin, tyramin, spermidin a spermin) [19]. Použité standardy biogenních aminů byly od firmy Sigma Aldrich (St. Louis, USA)

5.5 Mikrobiologická analýza

Ke stanovení počtu jednotlivých skupin mikroorganismů byla použita různá kultivační média:

- a) M17 agar – médium určené ke kultivaci a stanovení mléčných koků, jako jsou streptokoky, laktokoky a leukonostoky,
- b) MRS agar – médium určené ke kultivaci a stanovení počtu mléčných tyčinek,
- c) PCA – neselektivní médium určené ke stanovení celkového počtu mikroorganismů (mezoofilní aerobní a fakultativně anaerobní mikroorganismy),
- d) SB agar – médium doporučené ke stanovení počtu enterokoků,
- e) ENDO agar – médium určené ke stanovení počtu bakterií čeledi *Enterobacteriaceae*.

Pro přípravu kultivačního média bylo vždy naváženo dané množství surovin dle návodu výrobce (viz Příloha I), které bylo rozpuštěno ve 400 ml destilované vody. Následně byla kultivační média autoklávována v autoklávu 135S Compact (VARIOKLAV[®], Německo) při teplotě 121,1 °C po dobu 20 minut. Výjimkou byl SB Agar, který byl pouze rozpuštěn ve vodní lázni. Poté byla média rozlita do Petriho misek, přičemž každá z misek obsahovala přibližně 15 – 20 ml média.

Z každého vzorku sýra bylo vždy sterilně odebráno přibližně 5 g, ke kterému bylo přidáno 45 ml fyziologického roztoku mikropipetou BIOHIT PROLINE (BIOHIT OY, Finsko). Směs byla homogenizována v homogenizátoru Masticator Silver (Biotech, Česká republika) po do-

bu tří minut. Ze vzniklé suspenze bylo připraveno desetinásobné ředění, a to odpipetováním 0,5 ml suspenze a jejím smícháním se 4,5 ml ředícího roztoku (sterilní fyziologický roztok), čímž bylo získáno ředění 10^{-2} . Obdobným postupem bylo postupováno až po ředění 10^{-8} .

Po izolaci ze vzorků sýrů a zákysů byly jednotlivé kmeny bakterií očkované na kultivační média vždy v množství 0,1 ml. Podmínky kultivace jednotlivých médií jsou uvedeny v Tabulce 3.

Tabulka 2: Podmínky kultivace jednotlivých typů půd

Typ půdy	Teplota kultivace	Doba kultivace
M17	37 °C	24 – 48 hodin
MRS	37 °C	24 – 48 hodin
PCA	37 °C	24 hodin
SB	37 °C	24 hodin
ENDO	37 °C	24 hodin

6 VÝSLEDKY A DISKUZE

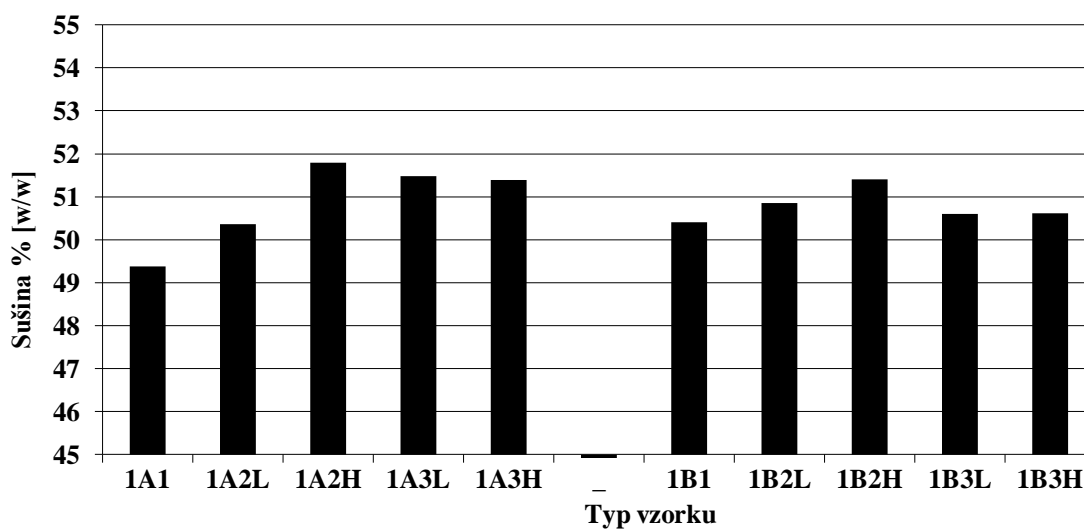
6.1 Základní chemická analýza

Obsah sušiny byl ze všech vzorků sýrů nejnižší vždy před solením a pohyboval se v rozmezí $48,14 \pm 0,45$ % u vzorku 2B1 až $50,40 \pm 0,65$ % u vzorku 1B1. V prvních 30 dnech zrání došlo k nárůstu obsahu sušiny, přičemž vyšší hodnoty byly zaznamenány u sýrů s vyšším obsahem soli (označení H) a to jak u A výroby tak i u B výroby. Analýzou po 2 měsících zrání bylo zjištěno, že u většiny sýrů bez rozdílu koncentrace NaCl došlo k poklesu sušiny oproti hodnotám naměřených 30. den zrání sýrů. Konečné hodnoty sušiny naměřené po 60. dnech ode dne výroby se pohybovaly v rozmezí $50,02 \pm 0,58$ – $51,59 \pm 0,17$ %, přičemž nebyly zjištěny významné rozdíly mezi sýry s různou koncentrací NaCl (obsahy sušiny jsou znázorněny v Grafu 1 – 2).

Naměřené hodnoty pH u vzorků A výroby první série byla hodnota pH před solením $4,71 \pm 0,02$. Během zrání sýrů došlo u vzorků výroby A k počátečnímu poklesu hodnot pH, kde vyšší hodnoty pH byly naměřeny u vzorků s nižší koncentrací soli, avšak po 60. dnech zrání hodnoty pH vzrostly na $4,79 \pm 0,02$ – $4,85 \pm 0,02$ (u vzorků 1A3H a 1A3L) bez významného rozdílu u sýrů s různou koncentrací soli. Obdobný trend byl zpozorován i u výroby B první série (1B), přičemž konečné naměřené hodnoty pH byly $4,80 \pm 0,09$ – $4,81 \pm 0,02$. U druhé série výrob (2A, 2B) pH rostlo po celou dobu skladování, přičemž vyšší hodnoty byly naměřeny u vzorků s vyšším obsahem soli, a to u výroby jak kontrolní (A), tak i u výroby s přidavkem dekarboxyláza pozitivního kmene (B). Konečné naměřené hodnoty pH byly nad hodnotou 5,0. Hodnoty pH jsou znázorněny v Grafech 3 – 4.

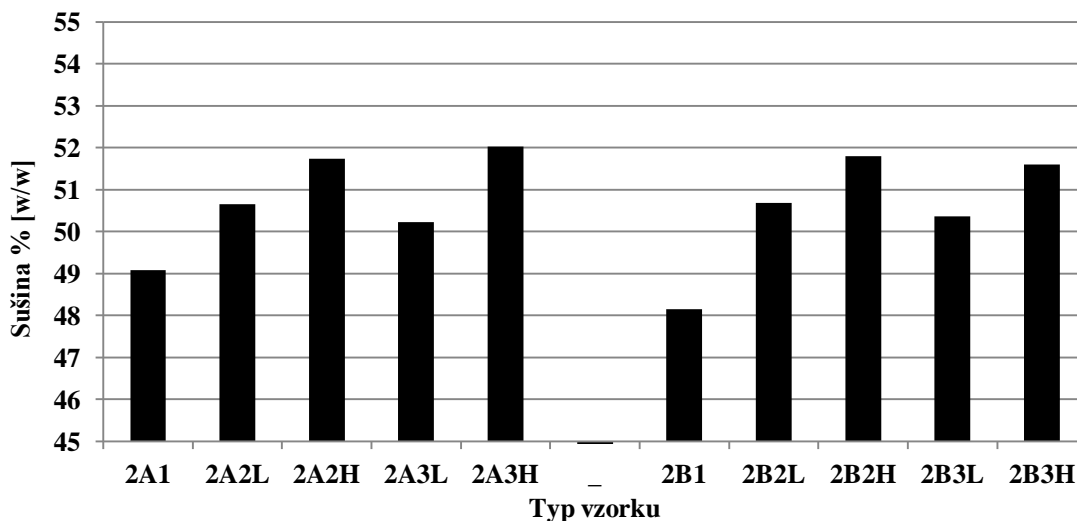
Obsah soli v sýrech byl před solením takřka zanedbatelný a pohyboval se v rozmezí $0,21 \pm 0,01$ – $0,26 \pm 0,01$ %. Po nasolení během 30 dnů zrání došlo k masivnímu nárůstu obsahu NaCl. Koncentrace NaCl byly u sýrů s nižším i s vyšším obsahem soli u obou výrob v průběhu zrání poměrně stálé. Větší změna byla pozorována u vzorku výroby B z první série, u kterého vzrostl obsah z $1,76 \pm 0,07$ % na konečnou hodnotu $2,05 \pm 0,13$ % NaCl (u vzorků 1B2L a 1B3L). Obsah NaCl znázorňují Grafy 5 – 6.

Graf 1: Vývoj obsahu sušiny v průběhu zrání u jednotlivých typů vzorků sýrů první série



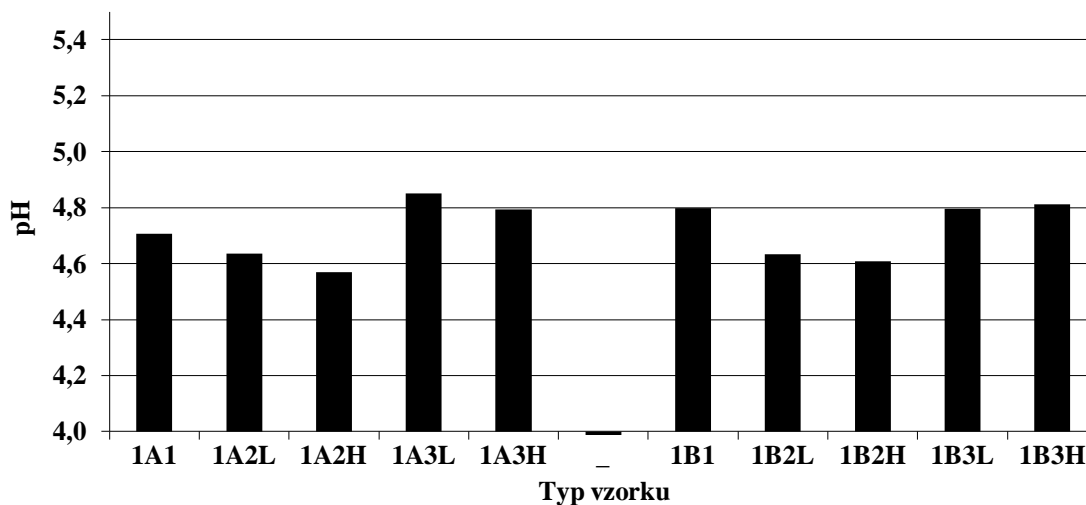
Kde: A – kontrolní výroba; B – výroba s přidavkem dekarboxyláza pozitivního kmene; 1 až 3 – den odběrů: 1 – 1. den, 2 – 30. den, 3 – 60. den; H – vyšší koncentrace soli; L – nižší koncentrace soli

Graf 2: Vývoj obsahu sušiny v průběhu zrání u jednotlivých typů vzorků sýrů druhé série



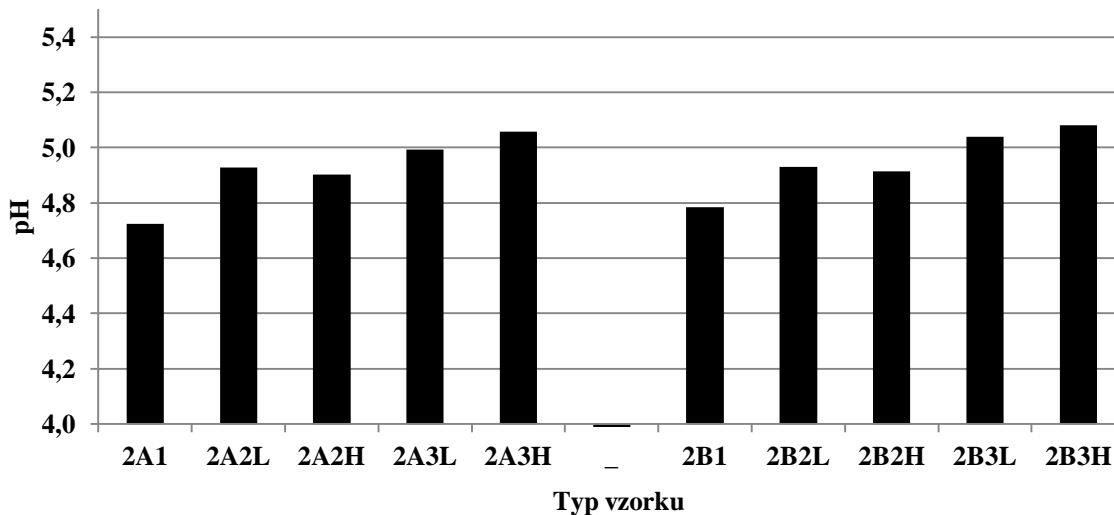
Kde: A – kontrolní výroba; B – výroba s přidavkem dekarboxyláza pozitivního kmene; 1 až 3 – den odběrů: 1 – 1. den, 2 – 30. den, 3 – 60. den; H – vyšší koncentrace soli; L – nižší koncentrace soli

Graf 3: Vývoj pH v průběhu zrání u jednotlivých typů vzorků sýrů první série



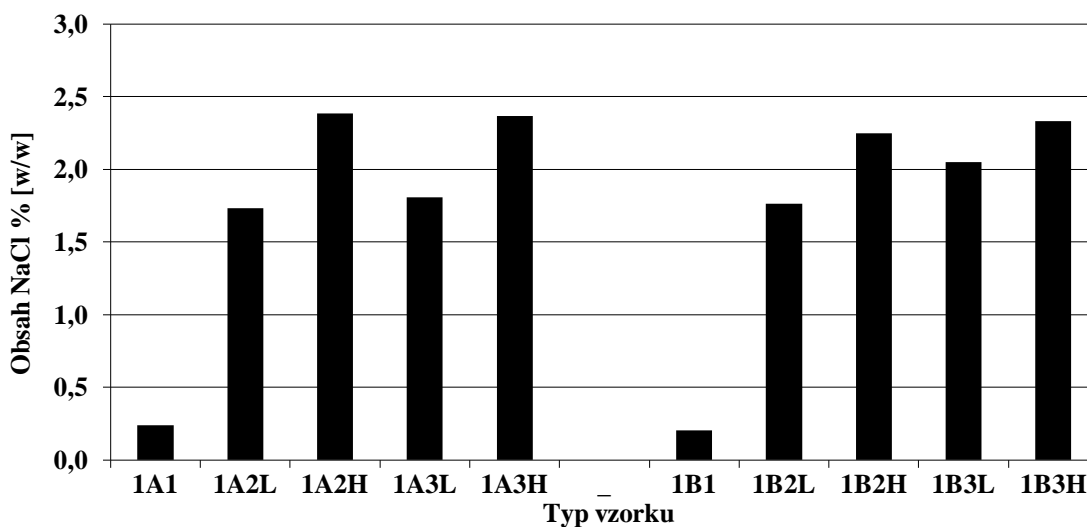
Kde: A – kontrolní výroba; B – výroba s přidavkem dekarboxyláza pozitivního kmene; 1 až 3 – den odběru: 1 – 1. den, 2 – 30. den, 3 – 60. den; H – vyšší koncentrace soli; L – nižší koncentrace soli

Graf 4: Vývoj pH v průběhu zrání u jednotlivých typů vzorků sýrů druhé série



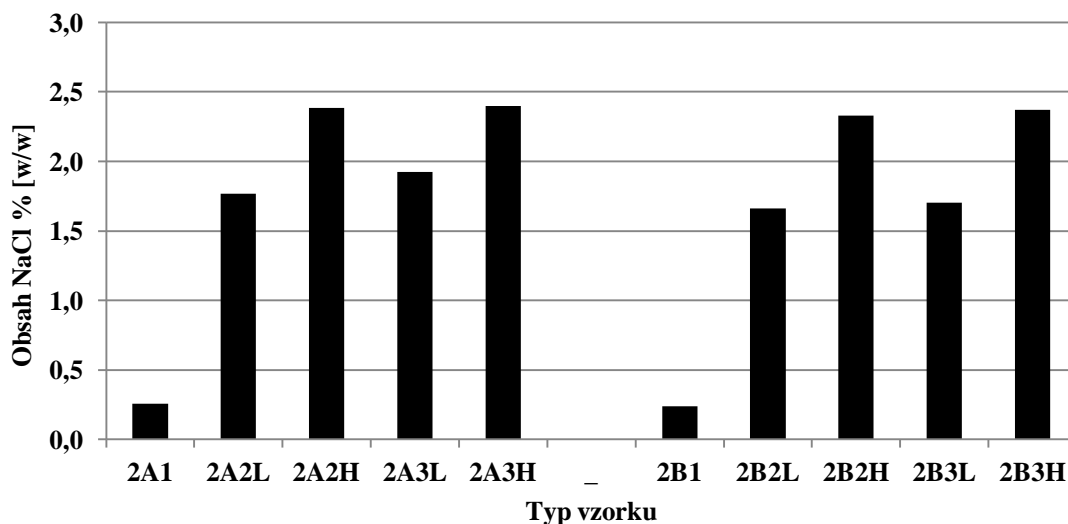
Kde: A – kontrolní výroba; B – výroba s přidavkem dekarboxyláza pozitivního kmene; 1 až 3 – den odběru: 1 – 1. den, 2 – 30. den, 3 – 60. den; H – vyšší koncentrace soli; L – nižší koncentrace soli

Graf 5: Koncentrace NaCl v průběhu zrání u jednotlivých typů vzorků sýrů první série



Kde: A – kontrolní výroba; B – výroba s přidáním dekarboxylázy pozitivního kmene; 1 až 3 – den odběru: 1 – 1. den, 2 – 30. den, 3 – 60. den; H – vyšší koncentrace soli; L – nižší koncentrace soli

Graf 6: Koncentrace NaCl v průběhu zrání u jednotlivých typů vzorků sýrů druhé série



Kde: A – kontrolní výroba; B – výroba s přidáním dekarboxylázy pozitivního kmene; 1 až 3 – den odběru: 1 – 1. den, 2 – 30. den, 3 – 60. den; H – vyšší koncentrace soli; L – nižší koncentrace soli

6.2 Analýza obsahu biogenních aminů

Celková koncentrace biogenních aminů v zákysech určených pro výrobu první série sýrů byla u jednotlivých zákysů značně rozdílná. U smetanového zákysu před prokysáním (1Az1) nebyly koncentrace biogenních aminů detekovány, stejně jako u zákysu vyrobeného ze smetanové kultury pro výrobu B (1BzA1), avšak po prokysání obsahoval smetanový zákys pro výrobu A (1Az2) $8,6 \pm 0,2 \text{ mg.l}^{-1}$ a zákys vyrobený ze smetanové kultury pro výrobu B (1BzA2) $2,1 \pm 0,2 \text{ mg.l}^{-1}$. Čistý bujón pro výrobu B obsahoval před prokysáním (1BzB1) $1991,9 \pm 0,2 \text{ mg.l}^{-1}$ BA a po jeho prokysání (1BzB2) $113,7 \pm 0,2 \text{ mg.l}^{-1}$ (Tabulka 3).

Sýry vyrobené v první sérii obsahovaly nejméně BA vždy první den výroby v rozmezí $7,4 \pm 0,2 \text{ mg.kg}^{-1}$ u vzorku 1A1 a $10,8 \pm 0,2 \text{ mg.kg}^{-1}$ u vzorku 1B1. Analýzou sýrů 30. den bylo zjištěno, že sýry s nižší koncentrací soli obsahují více BA oproti sýrům s vyšší koncentrací soli u A i B výroby a v průběhu zrání docházelo ke zvýšení obsahu BA u všech sýrů v obou typech solení. Konečné koncentrace BA byly v rozmezí $356,6 \pm 0,2 \text{ mg.kg}^{-1}$ až $729,3 \pm 0,2 \text{ mg.kg}^{-1}$ (u vzorků 1B3H a 1A3L) (Graf 7).

Koncentrace biogenních aminů v zákysech určených pro výrobu druhé série byla opět nejnižší před prokysáním. U smetanového zákysu pro výrobu A, stejně jako u zákysu vyrobeného ze smetanové kultury pro výrobu B byla koncentrace BA $6,3 \pm 0,2 \text{ mg.l}^{-1}$. Po prokysání byl u obou zákysů pozorován rostoucí trend, na rozdíl od zákysu vyrobeného jen z bujónu, u kterého došlo po prokysání ke snížení obsahu BA z původních $1805,5 \pm 0,2 \text{ mg.l}^{-1}$ na $3,7 \pm 0,2 \text{ mg.l}^{-1}$ (Tabulka 4).

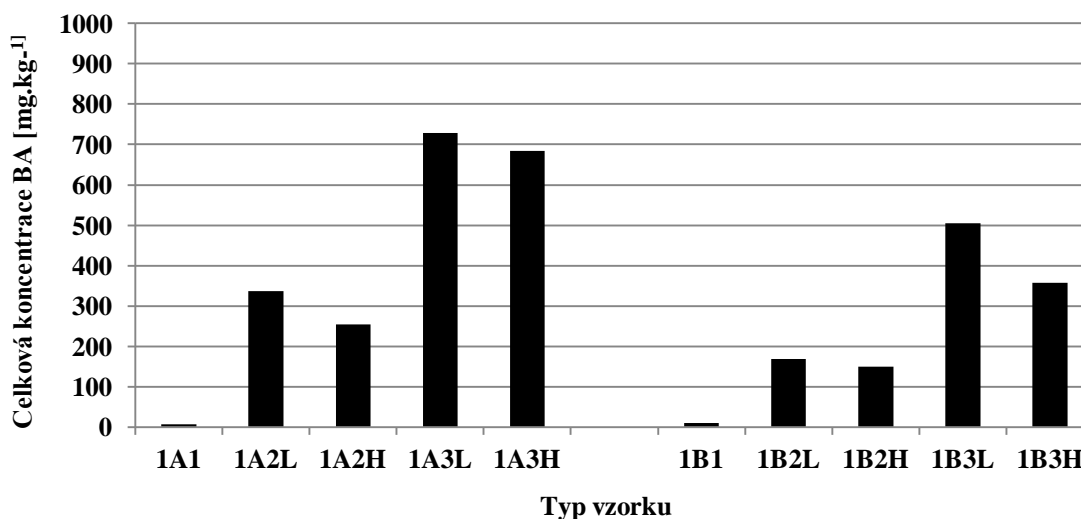
Sýry z druhé série obsahovaly nejméně biogenních aminů vždy první den výroby v rozmezí $6,3 \pm 0,2 \text{ mg.kg}^{-1}$ u vzorku 2A1 a $97,5 \pm 0,2 \text{ mg.kg}^{-1}$ u vzorku 2B1. V prvních 30 dnech zrání došlo k nárůstu obsahu BA, přičemž jejich hladina kolísala mezi $331,8 \pm 0,2 \text{ mg.kg}^{-1}$ u vzorku 2A2H a $645,7 \pm 0,2 \text{ mg.kg}^{-1}$ u vzorku 2B2H. Analýzou po 2 měsících zrání bylo zjištěno, že u většiny sýrů bez rozdílu koncentrace NaCl došlo k nárůstu obsahu BA vůči hodnotám naměřených 30. den zrání sýrů, přičemž vyšších hodnot bylo dosaženo u výroby B (Graf 8).

Tabulka 3: Koncentrace biogenních aminů v zákysích první série

zákysy před prokysáním	koncentrace BA [mg.l ⁻¹]	zákysy po prokysání	koncentrace BA [mg.l ⁻¹]
1Az1	-	1Az2	8,6 ± 0,2
1BzA1	-	1BzA2	2,1 ± 0,2
1BzB1	1991,9 ± 0,2	1BzB2	113,7 ± 0,2

Kde: AZ – smetanový zákys; BZA – smetanový zákys pro B výrobu; BZB – bujónový zákys; 1 – odběr před prokysáním; 2 – odběr po prokysání

Graf 7: Celkové koncentrace biogenních aminů u jednotlivých vzorků sýrů první série



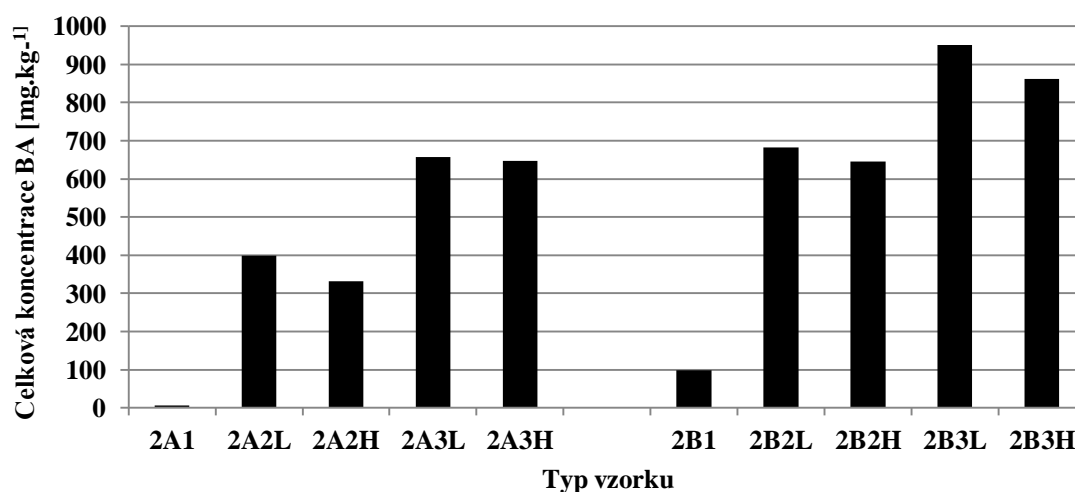
Kde: A – kontrolní výroba; B – výroba s přidavkem dekarboxyláza pozitivního kmene; 1 až 3 – den odběrů: 1 – 1. den, 2 – 30. den, 3 60. den; H – vyšší koncentrace soli; L – nižší koncentrace soli

Tabulka 4: Koncentrace biogenních aminů v zákysích druhé série

zákysy před prokysáním	koncentrace BA [mg.l ⁻¹]	zákysy po prokysání	koncentrace BA [mg.l ⁻¹]
2Az1	6,3 ± 0,2	2Az2	7,7 ± 0,2
2BzA1	6,3 ± 0,2	2BzA2	43,6 ± 0,2
2BzB1	1805,4 ± 0,2	2BzB2	3,7 ± 0,2

Kde: Kde: AZ – smetanový zákys; BZA – smetanový zákys pro B výrobu; BZB – bujónový zákys; 1 – odběr před prokysáním; 2 – odběr po prokysání

Graf 8: Celková koncentrace biogenních aminů u jednotlivých vzorků sýrů druhé série



Kde: A – kontrolní výroba; B – výroba s přidavkem dekarboxyláza pozitivního kmene; 1 až 3 – označuje den odběrů: 1 – první den, 2 – třicátý den, 3 – šedesátý den; H – vyšší koncentrace soli; L – nižší koncentrace soli

6.3 Mikrobiologická analýza

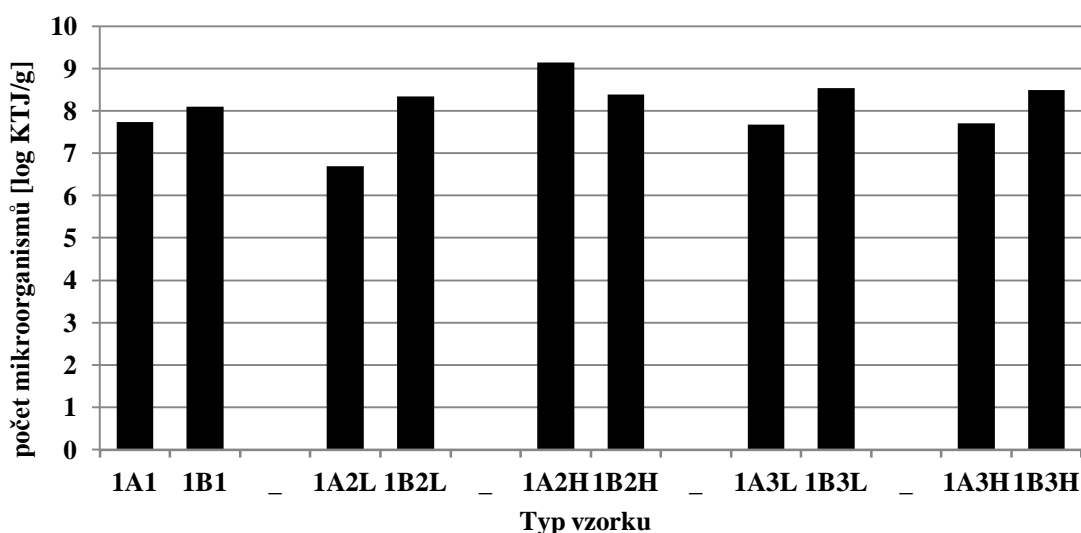
Cílem mikrobiologické analýzy bylo zjistit, jak se v průběhu zrání sýrů mění zastoupení vybraných skupin mikroorganismů u sýrů vyrobených z komerčního smetanového zákysu, v porovnání se sýry, k jejichž výrobě byl použit zákys za přidavku dekarboxyláza pozitivního kmene.

6.3.1 Výsledky stanovení celkového počtu mikroorganismů

U A výroby bylo mikrobiologickým rozbořem zjištěno, že celkový počet mikroorganismů (CPM) u sýrů s nižším obsahem soli zpočátku klesá a poté opět roste, kdežto u sýrů s vyšším obsahem soli téže výroby tomu bylo naopak. U B výroby CPM kolísal v rozmezí $(1,3 \pm 0,2) \cdot 10^8$ KTJ.g⁻¹ u vzorku 1B1 až $(3,5 \pm 0,2) \cdot 10^8$ KTJ.g⁻¹ u vzorku 1B3L po celou dobu skladování. Koncentrace soli neměla na CPM vliv (Graf 9).

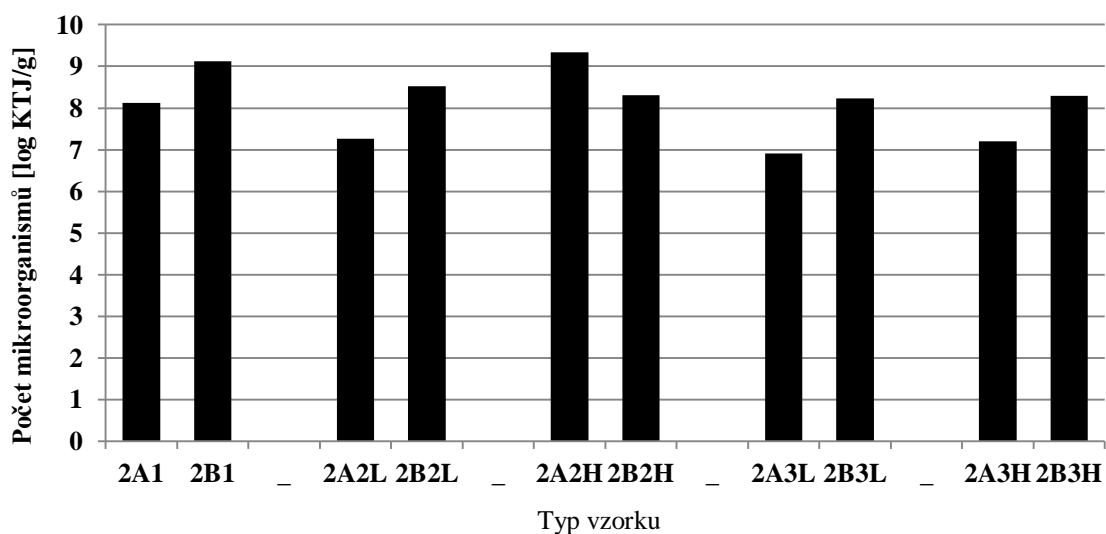
U A výroby druhé série byl pozorován obdobný trend jako u A výroby první série. U B výroby došlo pouze ke snížení CPM u obou typů solení a od 30. dne skladování byl CPM v rozmezí $(3,3 \pm 0,2) \cdot 10^8$ – $(1,7 \pm 0,2) \cdot 10^8$ KTJ.g⁻¹ (Graf 10).

Graf 9: Grafické znázornění změn CPM v jednotlivých typech vzorků sýrů první série



Kde: A – kontrolní výroba; B – výroba s přidavkem dekarboxyláza pozitivního kmene; 1 až 3 – den odběrů: 1 – 1. den, 2 – 30. den, 3 – 60. den; H – vyšší koncentrace soli; L – nižší koncentrace soli

Graf 10: Grafické znázornění změn CPM v jednotlivých typech vzorků sýrů druhé série



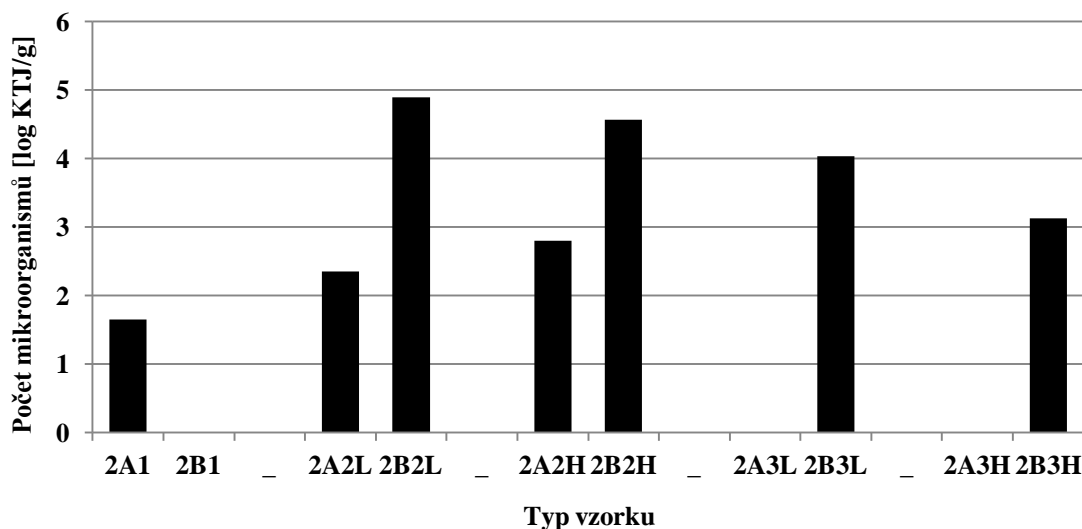
Kde: A – kontrolní výroba; B – výroba s přidavkem dekarboxyláza pozitivního kmene; 1 až 3 – den odběrů: 1 – 1. den, 2 – 30. den, 3 – 60. den; H – vyšší koncentrace soli; L – nižší koncentrace soli

6.3.2 Výsledky stanovení počtu enterokoků a koliformních bakterií

U první série výrob byly enterokoky stanoveny pouze první den odběru u A výroby v množství $(8,0 \pm 0,2) \cdot 10^2$ KJT.g⁻¹. V ostatních vzorcích během skladování nebyly enterokoky detekovány. Koliformní bakterie byly stejně jako enterokoky detekovány pouze první den odběru A výroby v množství $(2,5 \pm 0,2) \cdot 10^3$ KJT.g⁻¹, ale také u B výroby v množství $(6,4 \pm 0,2) \cdot 10^2$ KJT.g⁻¹.

U druhé série výrob nebyly enterokoky první den detekovány u žádné z výrob, avšak po měsíci zrání byly detekovány u vzorku 1A2L v množství $(1,8 \pm 0,2) \cdot 10^2$ KJT.g⁻¹, které po dalším měsíci zrání vzrostlo na $(7,7 \pm 0,2) \cdot 10^3$ KJT.g⁻¹. Koliformní bakterie byly detekovány první den u výroby A. Po 30 dnech skladování došlo k nárůstu množství koliformních bakterií. Na konci doby skladování již nebyly koliformní bakterie u vzorku A detekovány. Opačný trend byl pozorován u B výroby, u které byly koliformní bakterie poprvé detekovány po 30 dnech skladování v rozmezí $(7,9 \pm 0,2) \cdot 10^4$ – $(3,7 \pm 0,2) \cdot 10^4$ KJT.g⁻¹ u vzorku 2B2L a 2B2H, avšak další dobou skladování došlo k poklesu jejich počtu (Graf 11).

Graf 11: Grafické znázornění změn počtu koliformních bakterií v jednotlivých typech vzorků sýrů druhé série



Kde: A – kontrolní výroba; B – výroba s přidavkem dekarboxyláza pozitivního kmene; 1 až 3 – den odběru: 1 – 1. den, 2 – 30. den, 3 – 60. den; H – vyšší koncentrace soli; L – nižší koncentrace soli

6.3.3 Výsledky stanovení počtu mléčných koků

U smetanového zákysu z první série výrob nebyly mléčné koky před prokysáním detekovány. Po prokysání byly přítomny v množství $(1,7 \pm 0,2) \cdot 10^8$ KTJ.g⁻¹. U zákysu s přidavkem dekarboxyláza pozitivního kmene došlo po prokysání ke snížení jejich počtu (Graf 12).

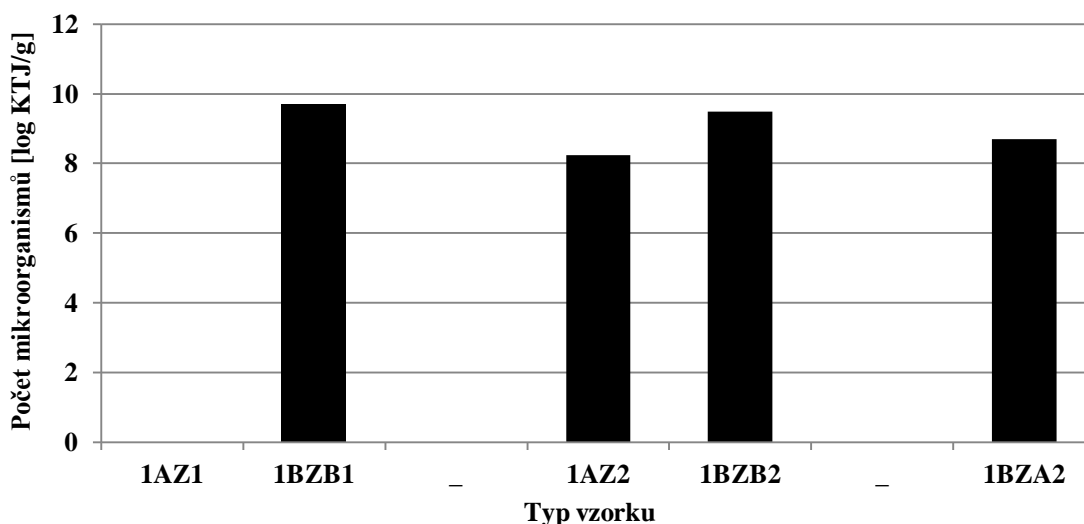
Analýzou vzorků sýrů první série bylo zjištěno, že největší množství mléčných koků bylo 1.den odběru, které bylo v rozmezí $(2,1 \pm 0,2) \cdot 10^8$ – $(3,3 \pm 0,2) \cdot 10^8$ KTJ.g⁻¹ (u vzorku 1A1 a 1B1). Během skladování docházelo u A výroby k poklesu počtu, přičemž u sýrů s vyšším obsahem soli byly počty vyšší. Konečné počty mléčných koků byly v rozmezí $(1,4 \pm 0,2) \cdot 10^6$ – $(5,5 \pm 0,2) \cdot 10^6$ KTJ.g⁻¹. U B výroby během skladování nedošlo k výraznému snížení. Počet mléčných koků kolísal v rozmezí $(9,3 \pm 0,2) \cdot 10^7$ – $(4,1 \pm 0,2) \cdot 10^8$ KTJ.g⁻¹ (Graf 13).

Analýzou zákysů určených k výrobě druhé série sýrů bylo zjištěno, že množství mléčných koků bylo celkově vyšší (před i po prokysání) u zákysu s přidavkem dekarboxyláza pozitivního kmene. Po prokysání došlo u obou typů zákysů ke snížení počtu mléčných koků (Graf 14).

U sýrů z druhé série byl první den počet mléčných koků v rozmezí $(5,0 \pm 0,2) \cdot 10^7$ – $(1,8 \pm 0,2) \cdot 10^8$ KTJ.g⁻¹ (u vzorku 2B1 a 2A1). U B výroby došlo následně k navýšení jejich

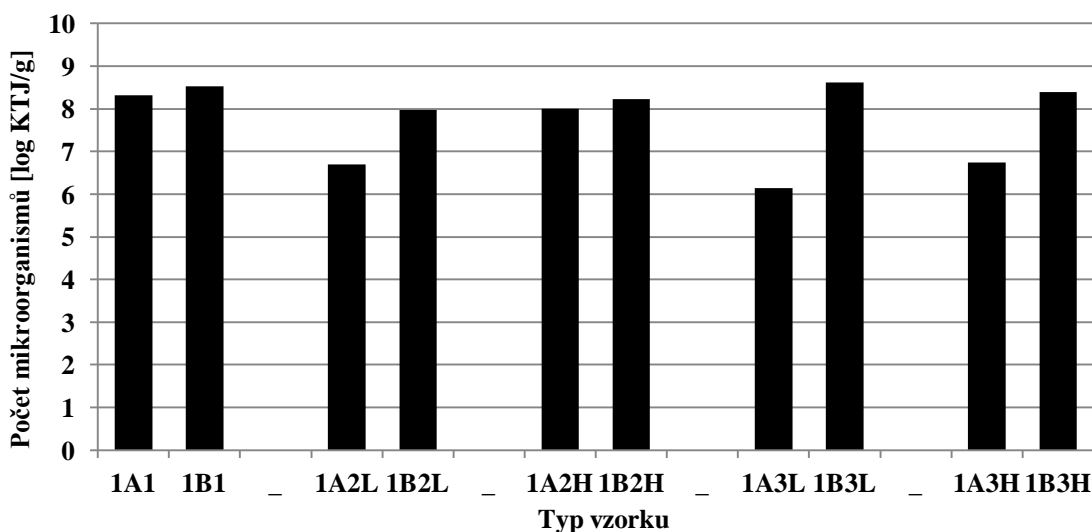
počtu, který byl po celou dobu skladování v rozmezí $(1,7 \pm 0,2) \cdot 10^8 - (2,5 \pm 0,2) \cdot 10^8$ KTJ.g⁻¹. U sýrů A výroby docházelo s délkou skladování ke snižování počtu (Graf 15).

Graf 12: Grafické znázornění změn v počtu mléčných koků v jednotlivých typech vzorků zákysů první série



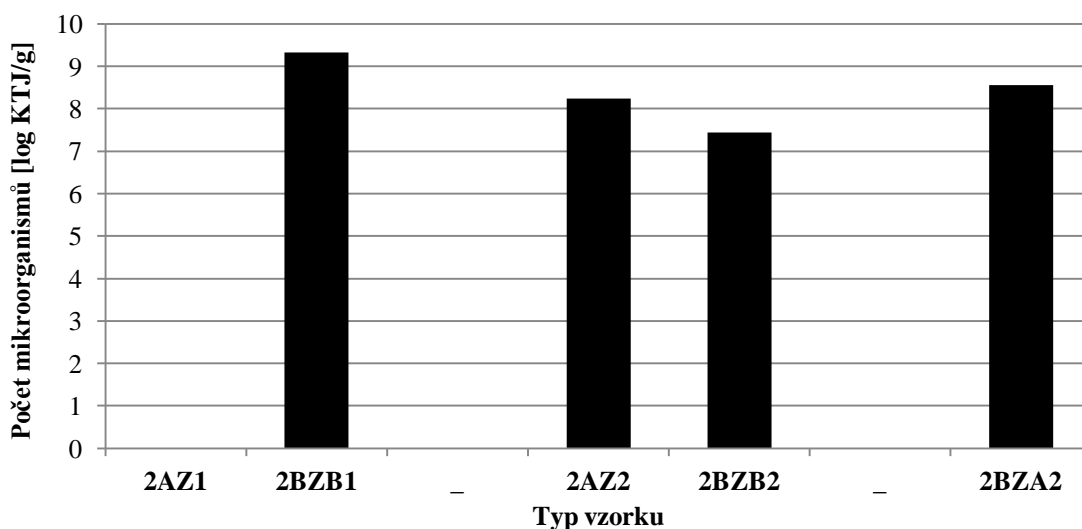
Kde: AZ – smetanový zákys; BZB – bujónový zákys; BZA – smetanový zákys pro B výrobu; 1 – odběr před prokysáním; 2 – odběr po prokysání

Graf 13: Grafické znázornění změn v počtu mléčných koků v jednotlivých typech vzorků sýrů první série



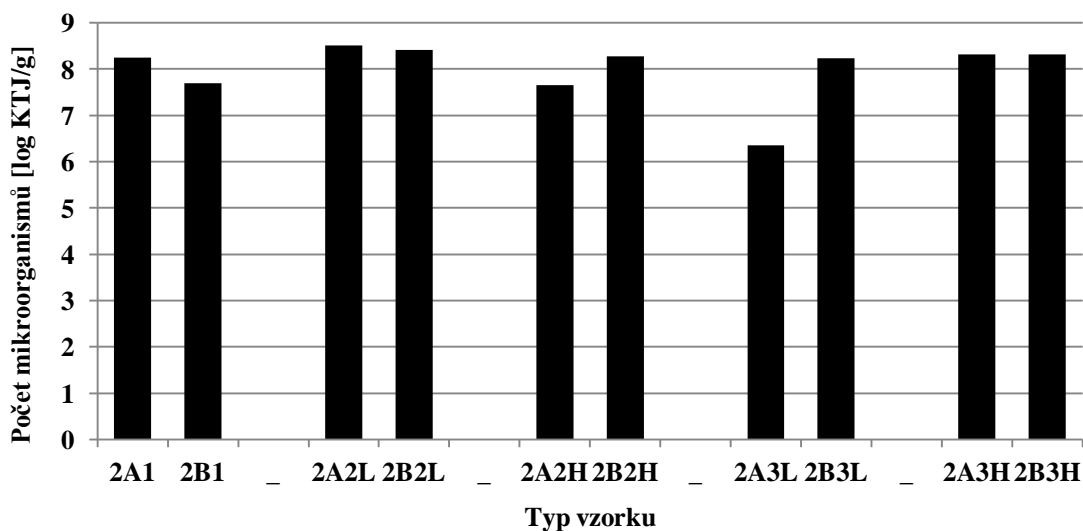
Kde: A – kontrolní výroba; B – výroba s přidavkem dekarboxyláza pozitivního kmene; 1 až 3 – den odběrů: 1 – 1. den, 2 – 30. den, 3 – 60. den; H – vyšší koncentrace soli; L – nižší koncentrace soli

Graf 14: Grafické znázornění změn v počtu mléčných koků v jednotlivých typech vzorků zákysů druhé série



Kde: AZ – smetanový zákys; BZB – bujónový zákys; BZA – smetanový zákys pro B výrobu; 1 – odběr před prokysáním; 2 – odběr po prokysání

Graf 15: Grafické znázornění změn v počtu mléčných koků v jednotlivých typech vzorků sýrů druhé série



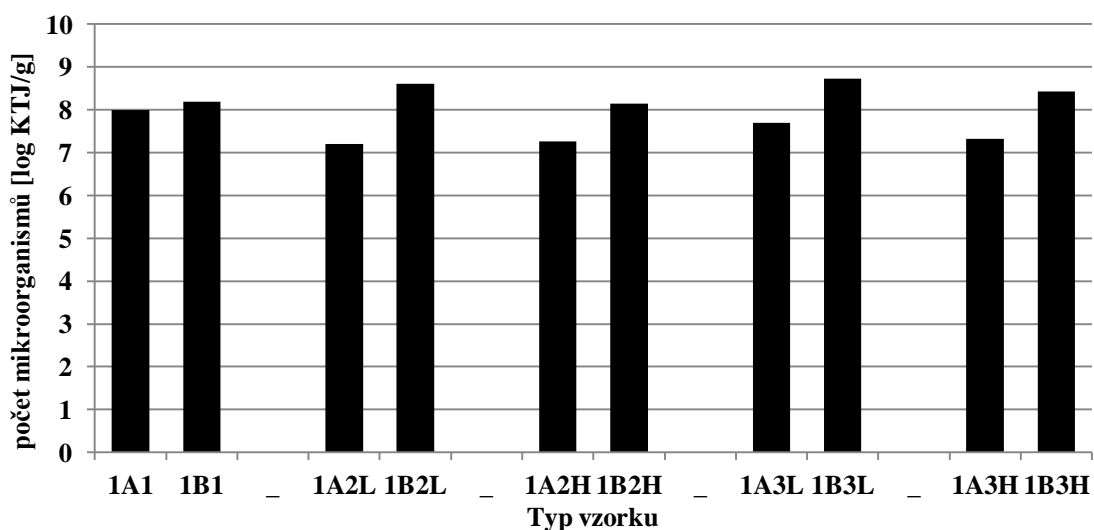
Kde: A – kontrolní výroba; B – výroba s přidavkem dekarboxyláza pozitivního kmene; 1 až 3 – den odběrů: 1 – 1. den, 2 – 30. den, 3 – 60. den; H – vyšší koncentrace soli; L – nižší koncentrace soli

6.3.4 Výsledky stanovení počtu bakterií rostoucích na MRS agaru

U sýrů z první série byl počáteční počet bakterií v rozmezí $(1,0 \pm 0,2) \cdot 10^8 - (1,5 \pm 0,2) \cdot 10^8$ KTJ.g⁻¹ (u vzorku 1A1 a 1B1). U A výroby došlo v průběhu skladování k mírnému snížení počtu bakterií, který kolísal v rozmezí $(1,6 \pm 0,2) \cdot 10^7 - (5,0 \pm 0,2) \cdot 10^7$ KTJ.g⁻¹, přičemž počet bakterií byl nižší u sýrů s vyšším obsahem soli. U B výroby zůstal řádově počet bakterií po celou dobu skladování stejný (Graf 16).

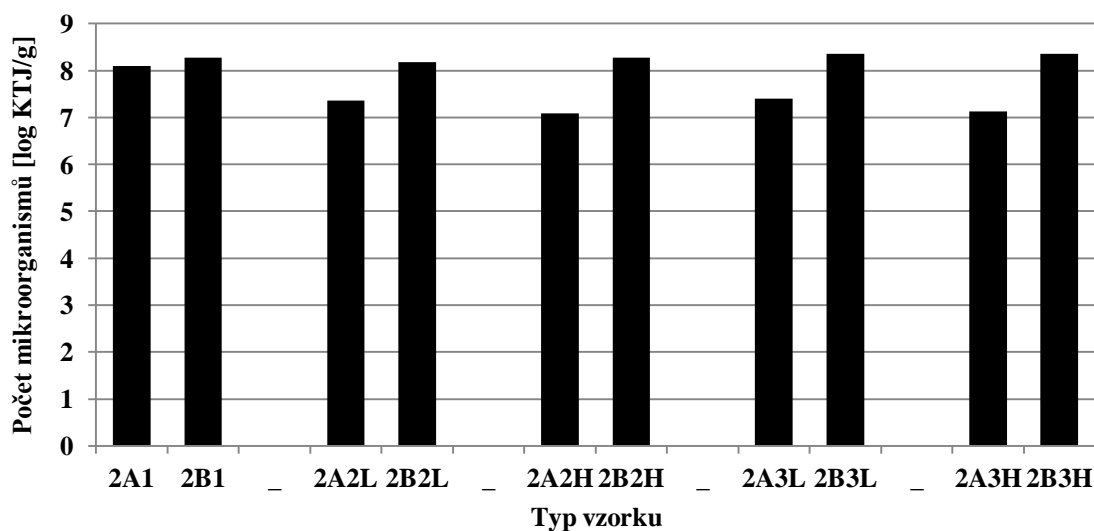
U A výroby druhé série byl pozorován obdobný trend jako u A výroby první série. Stejně tomu tak bylo v případě výroby B (Graf 17).

Graf 16: Grafické znázornění změn v počtu bakterií rostoucích na MRS agaru v jednotlivých typech vzorků sýrů první série



Kde: A – kontrolní výroba; B – výroba s přidavkem dekarboxyláza pozitivního kmene; 1 až 3 – den odběrů: 1 – 1. den, 2 – 30. den, 3 – 60. den; H – vyšší koncentrace soli; L – nižší koncentrace soli

Graf 17: Grafické znázornění změn v počtu bakterií rostoucích na MRS agaru v jednotlivých typech vzorků sýrů druhé série



Kde: A – kontrolní výroba; B – výroba s přidavkem dekarboxyláza pozitivního kmene; 1 až 3 – den odběrů: 1 – 1. den, 2 – 30. den, 3 – 60. den; H – vyšší koncentrace soli; L – nižší koncentrace soli

6.4 Souhrnná diskuze

Během zrání sýrů holandského typu byly sledovány změny obsahu vybraných skupin mikroorganismů (mezofilní aerobní a fakultativně anaerobních mikroorganismy (CPM), koliformní bakterie a enterokoky, mléčné koky a bakterie rostoucí na MRS agaru) u sýrů vyrobených ze smetanového zákysu a u sýrů vyrobených ze zákysu s přidavkem dekarboxyláza pozitivního kmene *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* a současně byl zkoumán jejich vliv na tvorbu biogenních aminů.

Čerstvě vyrobené sýry prokysávaly při laboratorní teplotě 21 ± 2 °C do druhého dne. Pravděpodobně v důsledku vyšší teploty došlo k jejich překysání o čemž svědčí hodnota pH pohybující se okolo 4,7 – 4,8. Optimální hodnota po prokysání by pak měla být okolo pH 5,0, při které jsou bakterie rodu *Lactococcus* ještě schopny růstu. V důsledku překysání může dojít k inaktivaci některých enzymů, podílejících se na procesech zrání, což může mít vliv na výslednou strukturu sýrů (mohou vznikat sýry až drobné konzistence), či jejich senzoryckou jakost [21].

Smetanové zákysy určené k výrobě obsahovaly po prokysání $10^7 - 10^8$ KTJ.ml⁻¹ bakterií mléčného kvašení, přičemž vyšší počty byly zaznamenány u zákysu s přidavkem dekarboxyláza – pozitivního kmene. Dle dostupné literatury se počet BMK v provozních zákysyech po-

hybuje zpravidla v rozmezí $10^6 - 10^8$ KTJ.ml⁻¹ [6]. Počty BMK v sýrech byly první den ode dne výroby okolo 10^8 KTJ.g⁻¹ u všech vzorků, což s literaturou koresponduje. Ta uvádí množství BMK 10^8 KTJ.g⁻¹ a více [14].

U sýrů vyrobených ze smetanového zákysu (sýry A) počet BMK v průběhu zrání klesal, avšak vyšší počty byly detekovány u sýrů s vyšším obsahem soli. Stejný trend popisuje i Fox a kol. [2]. Oproti tomu se liší výroba B (sýry vyrobené s přidavkem dekarboxyláza pozitivního kmene), u nichž nebyl zaznamenán výrazný klesající trend. V průběhu zrání se počet BMK pohyboval okolo 10^8 KTJ.g⁻¹.

Klesající trend (z počátečního počtu 10^9 na 10^7 KTJ.g⁻¹) byl zaznamenán stanovením bakterií rostoucích na MRS agaru u sýrů vyrobených ze smetanového zákysu (výroba A), oproti sýrům vyrobených s přidavkem dekarboxyláza pozitivního kmene (výroba B), u kterých se tento počet v průběhu zrání téměř neměnil. Podle McSweeneyho a kol. [43] jsou některé laktobacily pasterací inaktivovány, avšak jiné kmeny přežívají pasteraci a tyto se pak v průběhu zrání množí, tudíž by měl být zaznamenán rostoucí trend. Klesající trend je možné vysvětlit nižšími hodnotami pH u A výroby, zpravidla pod pH 4,8 téměř neměnnému počtu laktobacilů u B výroby odpovídá vyšší pH, které bylo okolo 5.

Enterokoky byly detekovány jen v ojedinělých případech a v nízkém počtu. Přítomnost enterokoků byla zjištěna zejména u vzorků se sníženým počtem laktobacilů. Tímto byly potvrzeny jisté studie, ve kterých bylo zjištěno, že některé kmeny rodu *Lactobacillus* brání růstu enterokoků v sýrech v důsledku omezení živin [14].

Chromatografickou analýzou byla stanovena celková koncentrace biogenních aminů. U smetanového zákysu první série nebyly před prokysáním detekovány BA, stejně jako nebyly detekovány mléčné koky, které v době mikrobiologické analýzy pravděpodobně nebyly ještě aktivní, přičemž tento jev se dal předpokládat. Po prokysání smetanových zákysů byly celkové koncentrace BA zanedbatelné (< 10 mg.l⁻¹). Zákys vyrobený z bujónu obsahoval BA v koncentraci 1991,9 mg.l⁻¹. Tato vysoká hodnota je dána dekarboxylázovou aktivitou kmene *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, která v průběhu prokysávání klesla, z důvodu nižší koncentrace živin, zejména aminokyselin, čímž klesl i obsah BA na 113,7 mg.l⁻¹. Obdobný trend byl i u zákysů druhé série.

Celková koncentrace BA u A výroby první série byla vyšší než hodnoty biogenních aminů u B výroby, což je výsledek opačný oproti předpokládanému. Tato výroba (výroba 1A) byla pravděpodobně sekundárně kontaminována během procesu laboratorní výroby sýrů. Pro minimalizaci sekundární kontaminace by bylo vhodné použití germicidní lampy, ochranných

pomůcek během procesu výroby, zejména roušky, rukavice, či pokrývky hlavy. Dále u obou výrob bylo upozorováno, že vyšší koncentrace BA byly zejména u vzorků s nižším obsahem soli. Vliv koncentrace NaCl na celkový obsah BA však nelze jednoznačně označit, vždy záleží na vztahu konkrétního biogenního aminu s konkrétní mikroflórou. U druhé série výrob byla celková koncentrace BA vyšší u B výroby. U obou výrob byl v průběhu zrání pozorován rostoucí trend koncentrace BA. Rostoucí koncentraci BA v průběhu zrání lze vysvětlit například vznikem volných aminokyselin probíhající prostřednictvím biochemických procesů. Z těchto volných AMK pak činností dekarboxyláza pozitivních mikroorganismů biogenní aminy vznikají [18].

Z osmi analyzovaných biogenních aminů byl nejvíce zastoupen tyramin. U všech výrob byl v průběhu zrání zaznamenán rostoucí trend koncentrace tyraminu a jeho vyšší hladiny byly detekovány zejména u sýrů s nižším obsahem soli, tedy do 2 %. Ze studie od Buňkové a kol. [47] vyplývá, že produkce tyraminu byla zjištěna i u technologicky významných BMK jako je zejména *Lc. lactis* subsp. *lactis* a *Lc. lactis* subsp. *cremoris*, u nichž byla zjištěna vyšší produkce tyraminu v prostředí do 2 % NaCl [3], což koresponduje s našimi výsledky. Tato koncentrace je běžně využívána jak pro výrobu sýrů holandského typu, tak i pro švýcarské sýry. Vysoká koncentrace tyraminu mohla být dále způsobena nezákysovými BMK, zejména u A výroby první série. U sýrů holandského typu jsou pak často izolovány kmeny rodu *Lb. curvatus* u kterých byla prokázána dekarboxylázová aktivita. Tyto bakterie jsou schopny produkovat za vhodných podmínek tyramin a putrescin v množství vyšším než 100 mg.l^{-1} [10], což také vysvětluje vyšší koncentrace putrescinu u A výroby, jež dosahovaly hodnot až $257,7 \pm 2 \text{ mg.kg}^{-1}$.

Histamin byl detekován v zanedbatelných koncentracích u všech analyzovaných sýrů, přestože publikace od Komprdy a kol.[31] popisuje histamin jako biogenní amin v sýrech se hojně vyskytující.

Vysoké koncentrace kadaverinu byly zaznamenány zejména u B výroby druhé série, které měly rostoucí trend. Z počátečních $62,9$ až na $364,4 \text{ mg.kg}^{-1}$. Greif a kol. [45] uvedl, že některé kmeny rodu *Enterobacter* produkují více kadaverin a histamin v prostředí s 1,2 až 3,0 % NaCl. U této výroby, jakožto jediné, byly detekovány koliformní bakterie, čímž může být vysoká koncentrace kadaverinu vysvětlena. U ostatních analyzovaných vzorků byly tyto koncentrace nízké, což je pro sýry holandského typu typické [32]

Spermin a sperminin nebyly u žádné z výrob detekovány. Tyto polyaminy jsou přirozenou součástí mléka, proto se jejich produkce obvykle nepřipisuje přítomným mikroorganismům, ale předpokládá se, že pochází z původního materiálu [46].

ZÁVĚR

V rámci bakalářské práce byl založen experiment, jehož cílem bylo porovnat zastoupení jednotlivých skupin mikroorganismů a obsah biogenních aminů ve vyrobených sýrech holandského typu za přídavku dekarboxyláza pozitivního kmene *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* se sýry vyrobených ze smetanové kultury.

Praktická část zahrnovala zrací pokus sýrů holandského typu při teplotě skladování 10 ± 2 °C. V průběhu zrání sýrů byla prováděna mikrobiologická analýza vzorků, kterou bylo zjištěno následující:

- celkový počet bakterií mléčného kvašení se v průběhu zrání sýrů vyrobených ze smetanové kultury snižuje, zatímco u sýrů vyrobených za přídavku dekarboxyláza pozitivního kmene není klesající trend zřetelný
- počet bakterií rostoucích na MRS agaru a celkový počet mikroorganismů u sýrů vyrobených ze smetanové kultury v průběhu zrání klesá, kdežto u sýrů vyrobených za přídavku dekarboxyláza pozitivního kmene *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* je tento počet téměř konstantní,
- počet koliformní bakterií se v průběhu zrání snižuje, kdežto počet enterokoků v průběhu zrání kolísá, avšak v závěru zrání jsou hodnoty obou skupin zanedbatelné,
- celková koncentrace biogenních aminů v průběhu zrání roste u všech analyzovaných sýrů, přičemž konečné hodnoty by mohly mít negativní vliv na konzumentovo zdraví. Nejvíce detekovaným biogenním aminem byl dle očekávání tyramin, přičemž jeho nejvyšší detekované množství bylo $464,5 \pm 2$ mg.kg⁻¹

Závěrem bakalářské práce lze říci, že vyšší koncentrace BA jsou v důsledku vyššího množství detekovaných mikroorganismů, u kterých již dříve byla prokázána pozitivní dekarboxylázová aktivita. Tento jev byl prokázán zejména v druhé sérii výrob, kde celkové koncentrace BA u sýrů s přídavkem dekarboxyláza pozitivního kmene byly vyšší než u sýrů vyrobených za použití komerční smetanové kultury. Ačkoli značná pozitivní dekarboxylázová aktivita je dřívějšími studii prokázána i u běžně používané smetanové kultury a také u kontaminující mikroflóry, je nutné další zkoumání těchto mikroorganismů a jejich dekarboxylázové aktivity a pro samotnou výrobu zabezpečit vhodné hygienické podmínky a výběr mikroorganismů s pokud možno co nejnižší dekarboxylázovou aktivitou.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] CALLEC, CH. *Encyklopedie sýrů*. 1. vyd. Dobřejovice: Rebo Productions CZ, spol s.r.o., 2002. ISBN 80-7234-225-8.
- [2] FOX, P. F. a kol. *Fundamentals of Cheese Science*. 1. vyd. Gaithersburg: Aspen Publishers, 2000. ISBN 0-8342-1260-9.
- [3] BUŇKOVÁ, L. a kol. The effect of ripening and storage conditions on the distribution of tyramine, putrescine and cadaverine in Edam – cheese. *Food Microbiology*. 2010, č. 7, s. 880 – 888.
- [4] Vyhláška Ministerstva zemědělství č. 77/2003 Sb. (novelizována vyhláškou č. 124/2004 Sb. a vyhláškou 370/2008 Sb.) ze dne 6. března 2003, kterou se stanoví požadavky pro mléko a mléčné výrobky, mražené krémy a jedlé tuky a oleje. In *Sbírka zákonů České republiky*. 2003, částka 32, s. 2488 – 2516.
- [5] IBURG, A. *Lexikon sýrů*, 1.vyd. Praha: Soliter, 2004. ISBN 80-7234-379-3.
- [6] FOX, P.F. a P.L.H. McSWEENEY. *Dairy Chemistry and Biochemistry*. 1. vyd. London: Thomson Science, 1998. ISBN 0-412-72000-0.
- [7] BUŇKA, F. *Technologie mléka a mléčných výrobků*.(přednášky) Zlín: UTB, září – prosinec 2012
- [8] DRDÁK, M., STUDNICKÝ, J., MÓROVÁ, E., KAROVIČOVÁ, J. *Základy potravinářských technologií*. 1. vyd. Bratislava: MALÉ CENTRUM, 1996. ISBN 80-967064-1-1.
- [9] Nařízení Evropského parlamentu a rady (ES) č. 583/2004 ze dne 29. března 2004. In *Úřední věstník*. 2004, s. 15.
- [10] BUŇKOVÁ, L., BUŇKA, F., POLLAKOVÁ, E., PODEŠVOVÁ, T., DRÁB, V. 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*. 2011, č. 2, s. 112 – 119.
- [11] McSWEENEY, P. L. H., HAYALOGLU, A. A., O'MAHONY, J. A., BANSAL, N. Perspectives on cheese ripening. *Australian Journal of Dairy Technology*. 2006, č. 61, s. 69 – 77.
- [12] FLASAROVÁ, R. *Distribuce obsahu volných aminokyselin a biogenních aminů v přírodním sýru eidamského typu*. Zlín, 2011. Diplomová práce. Univerzita Tomáše Bati. Vedoucí práce doc. Ing. František Buňka.

- [13] CAPLICE E., FITZGERALD G. F. Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. *International Journal of Food Microbiology*. 1999, č. 50, s. 131–149.
- [14] FOX, F. P. at el. *Cheese – Chemistry, Physics and Microbiology* [online]. 2004 [cit. 2013-05-05]. ISBN 978-0-08-052343-9. Dostupné z: http://www.knovel.com.proxy/k.utb.cz/web/portal/browse/display?_EXT_KNOVEL_DISPLAY_bookid=1891&VerticalID=0.
- [15] JANŠTOVÁ, J. a kol. *Technologie mléka a mléčných výrobků* [online]. 2012 [cit. 2013-03-24]. ISBN 978-80-7305-637-7. Dostupné z: <http://cit.vfu.cz/ivbp/wp-content/uploads/2011/07/Janstova-skripta-web.pdf>.
- [16] FERNANDES, R. *Microbiology handbook dairy products* [online]. 2008 [cit. 2013-03-24]. ISBN 978-1-905224-62-3. Dostupné z: http://johnjhaddad.weebly.com/uploads/2/5/2/0/2520519/microbiology_handbook_dairy_products_leatherhead_2009.pdf.
- [17] ALEWIJN, M. *The formation of fat-derived flavour compounds during the ripening of Gouda-type cheese*. 1. vyd. Netherlands: Wageningen University, 2006. ISBN 90-8504-381-6.
- [18] SHALABY, R. A. Significance of biogenic amines to food safety and human health. *Food Research International*. 1996, č. 29, s. 675 – 690.
- [19] DADÁKOVÁ, E., KŘÍŽEK, M. a PELIKÁNOVÁ, T. Determination of biogenic amines in foods using ultra-performance liquid chromatography (UPLC). *Food Chemistry*. 2009, č. 119, 365–370.
- [20] BUŇKOVÁ, L. a kol. Vliv aerobního/anaerobního prostředí na dekarboxylázovou aktivitu vybraných bakterií mléčného kvašení. *Potravinářstvo*. 2010, roč. 4, č. 2, s. 3. Dostupné z: <http://www.potravinarstvo.com/journal1/index.php/potravinarstvo/article/viewFile/43/8>.
- [21] HUI, Y. H. *Dairy Science and Technology Handbook*. 1. vyd. USA: Eureka, 1992. ISBN 1-56081-078-5.
- [22] ČERNÍKOVÁ, M. a Z. VAŇÁTKOVÁ. *Praktická cvičení z potravinářské mikrobiologie*. 1. vyd. Zlín: UTB ve Zlíně, 2010. ISBN 978-80-7318-749-1.
- [23] SEDLÁČEK, I. *Taxonomie prokaryot*. 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita, 2007. ISBN 978-80-210-4207-0

- [24] KOLEKTIV AUTORŮ. *Potravinářská mikrobiologie I - Mikroorganismy v potravinářství* [online]. [cit. 2013-05-11]. Dostupné z: http://utbfies.cepac.cz/moduly/M0010_potravinarska_mikrobiologie/distančni_text/M0010_potravinarska_mikrobiologie_distančni_text.pdf.
- [25] KOLEKTIV AUTORŮ. *Microorganisms in foods*. 2. vyd. New York: Kluwer Academic, 2005. ISBN 0-7514-0430-6.
- [26] KLETER, G. The ripening of Gouda cheese made under strictly aseptic conditions. The comparison of activity of different starters and the influence of certain *Lactobacillus* strains. *Netherlands Milk Dairy*. 1977, č. 31, s. 177 – 187.
- [27] KVASNIČKOVÁ A. Bioaktivní aminy v zelené a pražené kávě. *Agronavigator* [online]. [cit. 2013-04-11]. Dostupný z: <http://www.agronavigator.cz/default.asp?ids=149&ch=13&typ=1&val=18051>.
- [28] BARDÓCZ, S.; WHITE, A. *Polyamines in health and nutrition*. USA: Springer, 1999. ISBN 0-412-82220-2.
- [29] AISHATH, N., FLINT, S., FLETCHER, G., BREMER, P. a MEERDINK, G. Control of Biogenic Amines in Food – Existing and Emerging Approaches. *Journal of Food Science* [online]. 2010, č. 12, s. 139 – 150 [cit. 2013-04-11]. Dostupné z: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1750-3841.2010.01774.x/full>.
- [30] VALSAMAKI, K., MICHAELIDOU, A., POLYCHTONIEADOU, A. Biogenic amine production in Feta cheese. *Food Chemistry*, 2000, č. 71, 259 – 266.
- [31] KOMPRDA, T. a kol. Some factors influencing biogenic amines and polyamines content in Dutch-type semi – hard cheese. *Eur Food Res Technol*. 2008, č. 27, s. 29 – 36.
- [32] STANDAROVÁ, E., BORKOVCOVÁ, I., VORLOVÁ, L. Obsah biogenních aminů v sýrech z české obchodní sítě. *Veterinářství*. 2008, č. 58, s. 735 – 739.
- [33] SUKOVÁ, I. Změny obsahu biogenních aminů během zrání sýrů. *Agronavigator* [online]. [cit. 2013-03-28]. Dostupné z: <http://www.agronavigator.cz/service.asp?act=print&val=121355>.
- [34] Nařízení komise (ES) č. 2073/2005 ze dne 15. listopadu 2005 o mikrobiologických kritériích pro potraviny. In *Úřední věstník Evropské unie*. 2005, s. 12.
- [35] HALÁSZ, A.; BARÁTH, Á.; SIMON-SARKADI, L.; HOLZAPFEL, W. Biogenic amines and their production by microorganism in food. *Trends in Food Science & Technology*. 1994, roč. 5, č. 2, s. 42 – 49.

- [36] KOMPRDA T. Biogenní aminy a polyaminy ve fermentovaných potravinách živočišného původu. *Veterinářství*. č. 10, s. 646 – 650.
- [37] VELÍŠEK J., HAJŠLOVÁ J.: *Chemie potravin II.* 3. vyd. OSSIS, Tábor, 2009. ISBN 978-80-86659-15-2.7.
- [38] DOEGLAS, H. M., HUISMAN, J., NATER, J. P. A Case of Histamine Poisoning Caused by Eating Cheese. *Nederlands Tijdschrift Voor Geneeskunde*. 1967, č. 35 s. 1526 – 1529.
- [39] CHAMBERS, T. L., STARUSZKIEWICZ, W. F. Fluorometric Determination of Histamine in Cheese. *Journal – Association of Official Analytical Chemists*. 1978, č. 5 s. 1092.
- [40] BINTSIS a kol. Microbiological Quality of White-brined Cheeses. *International Journal of Dairy Technology*. 2002, č. 55, s. 113 – 120.
- [41] *ISO Standard No. 5534:2004*. Cheese and processed cheese – Determination of the total solid content (Reference method). Geneva: International Organization for Standardization.
- [42] INDRA, Z., MIZERA, J. *Control methods for milk and milk products*. Prague: SNTL Publishing, (1992). (in Czech).
- [43] McSWEENEY, P.L.H. a kol. A procedure for the manufacture of Cheddar cheese under controlled bacteriological conditions and the effect of adjunct lactobacilli on cheese quality. *Irish Journal of Agricultural and Food Research*. 1994, č. 33, s. 183 – 192.
- [44] BUŇKOVÁ, L. a kol. Tyramine production of technological important strains of *Lactobacillus*, *Lactococcus* and *Streptococcus*. *Eur Food Res Technol*. 2009, č. 29, s. 533 – 5338.
- [45] GRIEF, G., GREIFOVÁ, M., KAROVIČOVÁ, J. Effects of NaCl concentration and initial pH value on biogenic amine formation dynamics by *Enterobacter* spp. bacteria in model conditions. *Journal of Food and Nutrition Research*. 2006, č. 45, s. 21 – 29.
- [46] BUŇKOVÁ, L. a kol. Monitoring výskytu biogenních aminů ve fermentovaných mléčných výrobcích v ČR. *Mlékařské listy*. 2012, č. 134, s. 1 – 3.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

BA	Biogenní aminy
BMK	Bakterie mléčného kvašení
CPM	Celkový počet mikroorganismů
ENDO	Endův agar
HPLC	Vysoce účinná kapalinová chromatografie (highperformance liquid chromatography)
<i>Lb.</i>	<i>Lactobacillus</i>
<i>Lc.</i>	<i>Lactococcus</i>
M17	M17 agar
MK	Mastné kyseliny
MRS	Rogosův a Sharpův agar
PCA	Plate count agar
SB	Slanetz – Bartley agar

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Glykolýza zprostředkovaná homofermentativními a heterofermentativními bakteriemi mléčného kvašení [13].....	17
Obrázek 2: Metabolismus kyseliny mléčné v průběhu zrání sýrů.....	17
Obrázek 3: Metabolismus citrátu pomocí citrát pozitivních kmenů <i>Lactococcus</i> spp. a <i>Leuconostoc</i> spp.....	19

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Značení vzorků sýrů	29
Tabulka 2: Podmínky kultivace jednotlivých typů půd	31
Tabulka 3: Koncentrace biogenních aminů v zákysech první série.....	37
Tabulka 4: Koncentrace biogenních aminů v zákysech druhé série	38

SEZNAM GRAFŮ

Graf 1: Vývoj obsahu sušiny v průběhu zrání u jednotlivých typů vzorků sýrů první série	33
Graf 2: Vývoj obsahu sušiny v průběhu zrání u jednotlivých typů vzorků sýrů druhé série	33
Graf 3: Vývoj pH v průběhu zrání u jednotlivých typů vzorků sýrů první série	34
Graf 4: Vývoj pH v průběhu zrání u jednotlivých typů vzorků sýrů druhé série	34
Graf 5: Koncentrace NaCl v průběhu zrání u jednotlivých typů vzorků sýrů první série ...	35
Graf 6: Koncentrace NaCl v průběhu zrání u jednotlivých typů vzorků sýrů druhé série ...	35
Graf 7: Celkové koncentrace biogenních aminů u jednotlivých vzorků sýrů první série	37
Graf 8: Celková koncentrace biogenních aminů u jednotlivých vzorků sýrů druhé série ...	38
Graf 9: Grafické znázornění změn CPM v jednotlivých typech vzorků sýrů první série	39
Graf 10: Grafické znázornění změn CPM v jednotlivých typech vzorků sýrů druhé série .	40
Graf 11: Grafické znázornění změn počtu koliformních bakterií v jednotlivých typech vzorků sýrů druhé série	41
Graf 12: Grafické znázornění změn v počtu mléčných koků v jednotlivých typech vzorků zákysů první série	42
Graf 13: Grafické znázornění změn v počtu mléčných koků v jednotlivých typech vzorků sýrů první série	42
Graf 14: Grafické znázornění změn v počtu mléčných koků v jednotlivých typech vzorků zákysů druhé série	43
Graf 15: Grafické znázornění změn v počtu mléčných koků v jednotlivých typech vzorků sýrů druhé série	43
Graf 16: Grafické znázornění změn v počtu bakterií rostoucích na MRS agaru v jednotlivých typech vzorků sýrů první série	44
Graf 17: Grafické znázornění změn v počtu bakterií rostoucích na MRS agaru v jednotlivých typech vzorků sýrů druhé série	45

SEZNAM PŘÍLOH

PŘÍLOHA I: SLOŽENÍ KULTIVAČNÍCH MÉDIÍ.....	59
--	----

PŘÍLOHA I: SLOŽENÍ KULTIVAČNÍCH MÉDIÍ

Půda	Navážka [g]	Voda [ml]	Ostatní přísady
SB	18,6	400	-
PCA	9,4	400	-
M17	15,7	400	Agar (6g) Laktóza (2g)
ENDO	16,6	400	-
MRS	20,06	400	Agar (6g)

