

Detekce biogenních aminů v sýrech zrajících pod mazem

Eva Theimrová

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: **Eva THEIMROVÁ**
Osobní číslo: **T10081**
Studijní program: **B2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Chemie a technologie potravin**
Forma studia: **prezenční**

Téma práce: **Detekce biogenních aminů v sýrech zrajících pod mazem**

Zásady pro vypracování:

I. Teoretická část

1. Charakteristika sýrů zrajících pod mazem.
2. Technologický postup výroby sýrů zrajících pod mazem.
3. Mikrobiologie sýrů zrajících pod mazem.
4. Biogenní aminy v sýrech zrajících pod mazem.

II. Praktická část

1. Mikrobiologická analýza sýrů zrajících pod mazem.
2. Detekce biogenních aminů v sýrech zrajících pod mazem.
3. Vyhodnocení mikrobiologických analýz a chromatografické analýzy biogenních aminů.
4. Diskuse získaných výsledků a formulace závěrů práce.

Rozsah bakalářské práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

[1] BAMFORTH, CH. W. Food, fermentation and micro-organisms. Ames, Iowa: Blackwell Science. 2005. 216 p. ISBN 06-320-5987-7.

[2] LAW, B. A., TAMIME, A. Y. Technology of cheesemaking. 2nd ed. Malden, MA: Blackwell. 2010, 482 p. ISBN 978-140-5182-980.

[3] Microbial ecology of food commodities. 2nd ed. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers. 2005, 763 p. ISBN 0-306-48675-X.

[4] FOX, P. F., McSWEENEY, P. L. H., COGAN, T. M., GUINEE, T. P. Cheese: chemistry, physics and microbiology. 3rd ed. Amsterdam: Elsevier. 2004, 434 p. ISBN 0-1226-3653-82.

[5] ADAMS, M. R., MOSS, M. O. Food microbiology. Third edition. Cambridge, UK: RSC Publishing. 2008, 463 p. ISBN 08-540-4284-9.

Vedoucí bakalářské práce:

doc. RNDr. Leona Buňková, Ph.D.

Ústav inženýrství ochrany životního prostředí

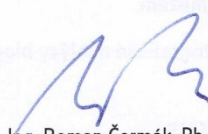
Datum zadání bakalářské práce:

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: THEIMROVÁ EVA.....

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 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 ..14..5..2013

.....Theimrová.....

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 nevydávající 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, užíje-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 vzdělávacímu 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 užit 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 přihlídí k výši výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

ABSTRAKT

Bakalářská práce se zabývá problematikou sýrů zrajících pod mazem. Teoretická část je zaměřena na charakteristiku, technologický postup výroby a mikrobiologii těchto sýrů. Dále jsou zde popsány biogenní aminy nacházející se v těchto sýrech. V praktické části byla u jednotlivých vzorků sýrů provedena mikrobiologická analýza, kdy byly sledovány celkové počty mikroorganismů, enterobakterie, enterokoky, mléčné bakterie, kvasinky a plísně. Následně byla stanovena přítomnost biogenních aminů v testovaných vzorcích sýrů. Ke stanovení biogenních aminů byla použita vysokoúčinná kapalinová chromatografie.

Klíčová slova: biogenní aminy, sýry zrající pod mazem, mikroorganismy

ABSTRACT

The bachelor thesis deals with the problematic of smear-ripened cheeses. The theoretical part is focused on the characteristics, technological process of production and microbiology of these cheeses. There are also described biogenic amines found in these cheeses. In the practical part was done the microbiological analysis of the individual samples of cheeses, when were observed total numbers of microorganisms, enterobacteria, enterococci, lactic bacteria, yeasts and mould. Then was determined the presence of biogenic amines in cheese samples tested. For the determination of biogenic amines was used high-performance liquid chromatography.

Keywords: biogenic amines, smear cheese, microorganisms

Poděkování

Na tomto místě bych chtěla poděkovat vedoucí své bakalářské práce doc. RNDr. Leoně Buňkové, Ph.D. za cenné rady, připomínky, metodické vedení praktické i teoretické práce, trpělivost a čas, který mi věnovala při zpracování mé bakalářské práce.

Dále bych chtěla poděkovat laborantkám Lence Machálkové, Bc. Veronice Kučabové a Ing. Ludmile Zálešákové za ochotu a pomoc při zpracování praktické části této bakalářské práce. Poděkování patří i mé rodině a přátelům za jejich neustálou podporu.

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

OBSAH

ÚVOD	10
I TEORETICKÁ ČÁST	11
1 SÝRY	12
1.1 CHARAKTERISTIKA SÝRŮ ZRAJÍCÍCH POD MAZEM.....	12
1.2 TECHNOLOGICKÝ POSTUP VÝROBY SÝRŮ ZRAJÍCÍCH POD MAZEM.....	13
1.2.1 Požadavky na mléko	13
1.2.2 Úprava mléka před zpracováním	14
1.2.3 Sýření	14
1.2.4 Zpracování sýřeniny.....	15
1.2.5 Formování sýrů	15
1.2.6 Solení sýrů.....	15
1.2.7 Zrání sýrů	16
2 MIKROBIOLOGIE SÝRŮ ZRAJÍCÍCH POD MAZEM	18
2.1 VNITŘNÍ PARAMETRY OVLIVŇUJÍCÍ MIKROFLÓRU.....	18
2.1.1 Obsah živin.....	18
2.1.2 pH.....	18
2.1.3 Vodní aktivita.....	18
2.1.4 Oxidačně-redukční potenciál	19
2.2 VNĚJŠÍ FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ MIKROFLÓRU.....	19
2.2.1 Teplota skladování	19
2.2.2 Relativní vlhkost prostředí	19
2.2.3 Přítomnost a koncentrace plynů	20
2.3 ŽÁDOUCÍ MIKROFLÓRA	20
2.3.1 Koryneformní bakterie	21
2.4 PATOGENNÍ MIKROFLÓRA.....	21
2.4.1 <i>Listeria monocytogenes</i>	21
2.4.2 <i>Staphylococcus aureus</i>	22
2.4.3 <i>Escherichia coli</i>	22
3 BIOGENNÍ AMINY	23
3.1 CHARAKTERISTIKA BIOGENNÍCH AMINŮ.....	23
3.2 BIOGENNÍ AMINY V SÝRECH ZRAJÍCÍCH POD MAZEM	23
3.2.1 Histamin	25
3.2.2 Tyramin	25
II PRAKTICKÁ ČÁST	27
4 CÍL PRÁCE	28
5 PRACOVNÍ POSTUPY A MATERIÁL	29
5.1 ANALYZOVANÉ VZORKY	29
5.1.1 Charakteristika analyzovaných vzorků	29
5.2 MATERIÁL.....	29
5.2.1 Přístroje a pomůcky.....	29
5.2.2 Živné půdy použité pro kultivaci vzorků	30

5.3	MIKROBIOLOGICKÁ ANALÝZA SÝRŮ.....	31
5.4	PŘÍPRAVA VZORKŮ PRO DETEKCI BIOGENNÍCH AMINŮ (CHROMATOGRFICKÁ DETEKCE BIOGENNÍCH AMINŮ)	31
6	VÝSLEDKY A DISKUZE	33
6.1	MIKROBIOLOGICKÉ TESTY.....	33
6.2	DETEKCE BIOGENNÍCH AMINŮ	37
7	ZÁVĚR.....	45
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	46
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....	50
	SEZNAM OBRÁZKŮ	51
	SEZNAM TABULEK.....	52
	SEZNAM PŘÍLOH.....	53

ÚVOD

Sýry představují velkou a relativně různorodou skupinu mléčných výrobků. Jsou vyráběny téměř na celém světě a tvoří nedílnou součást stravy člověka. Patří mezi nepostradatelné zdroje nutričně cenných látek, jakými jsou plnohodnotné bílkoviny a vápník. Dalšími významnými složkami jsou minerální látky a vitaminy. Výroba sýrů je nejstarším odvětvím zpracování mléka. Člověk poznal sýry před více než 8000 lety. Počátek výroby sýrů v Čechách spadá do 10. století, a to díky rozvoji chovu hospodářských zvířat pro produkci mléka [1, 2].

Sýry zrající pod mazem jsou měkké sýry charakteristické vytvořením povrchové vrstvy z kvasinek a bakterií. Tyto sýry mají své typické aroma a chuť. V současnosti existuje více než 3000 druhů sýrů. Odhaduje se, že právě sýry zrající pod mazem tvoří 5 - 15 % celkového evropského trhu sýrů. Spotřeba sýrů (bez tvarohu) se v České republice pohybuje okolo 16 kg/osoba/rok [2, 3, 4].

Biogenní aminy jsou látky známé více než 100 let. Jedná se o nízkomolekulární dusíkaté látky bazické povahy vykazující značnou biologickou aktivitu. Vyskytují se v buňkách rostlinných a živočišných tkání, kde zajišťují řadu důležitých funkcí. V nadměrném množství však mohou způsobovat nežádoucí až toxické účinky. K hlavním příznakům při konzumaci vysokého množství biogenních aminů patří zvracení, dýchací potíže, pocení, bušení srdce, hypotenze a hypertenze či migrény. V potravinách vznikají především dekarboxylací přirozených aminokyselin působením bakteriálních dekarboxylas, kterými jsou vybaveny četné druhy hnilobných bakterií, ale také řada druhů bakterií mléčného kvašení. K tvorbě biogenních aminů dochází při zrání sýrů nedodržováním dostatečné hygieny nebo vlivem kontaminující mikroflóry. Nejvyšší zastoupení v sýrech zrajících pod mazem mají biogenní aminy histamin, tyramin, putrescin a kadaverin [5, 6, 7].

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 SÝRY

Sýry jsou jedny z nejdůležitějších mléčných výrobků [1]. Dle vyhlášky 77/2003 Sb. je sýrem mléčný výrobek vyrobený vysrážením mléčné bílkoviny z mléka působením syřidla nebo jiných vhodných koagulačních činidel, prokysáním a oddělením podílu syrovátky [8]. Jejich složení je z hlediska nutriční hodnoty velmi dobré. Jsou významným zdrojem bílkovin, vápníku, fosforu a vitaminů skupiny B. U tučných sýrů jsou přítomny i vitaminy A, D. Sýry rozdělujeme dle různých vlastností [1]:

- a) Podle typu srážení na sýry sladké a kyselé.
- b) Podle použité suroviny na sýry přírodní, tavené nebo sýry s náhradou mléčného tuku rostlinným.
- c) Podle obsahu vody v tukuprosté sušině na sýry extra tvrdé, tvrdé, polotvrdé a měkké.
- d) Podle obsahu tuku na vysokotučné, plnotučné, polotučné, nízkotučné a odtučněné.
- e) Podle způsobu zrání na sýry čerstvé, sýry zrající v celé hmotě, zrající od povrchu dovnitř hmoty a sýry plísňové.

1.1 Charakteristika sýrů zrajících pod mazem

Sýry zrající pod mazem řadíme do skupiny přírodních sladkých měkkých sýrů. Základní surovinou pro jejich výrobu je mléko. Jedná se o měkké zrající sýry, kdy během zrání dochází k proteolýze bílkovin, což se výrazně projeví na jejich chuti, vůni a konzistenci. Termín sladké sýry vyjadřuje, že ke srážení mléka se používají syřidla obsahující srážecí enzymy. Hlavní změny během zrání způsobují přítomné mikroorganismy zracích druhotných kultur, z nichž nejdůležitější je *Brevibacterium linens*, která společně s kvasinkami vytváří na povrchu sýra postupně žlutooranžový maz, který je typický pro sýry zrající pod mazem (SZPM) [2]. Tyto druhotné sýrařské kultury výrazně přispívají k vzhledu a rozvoji aroma těchto sýrů. Způsobují často sirný až amonný zápach. Kromě druhotných kultur ovlivňují aroma a vzhled také fyzikální a chemické parametry mléka a startovací kultury použité při výrobě sýrů. Pro vznik povrchové vrstvy je nezbytné zachovat dostatečnou hygienu a vytvořit vhodné podmínky pro růst dané mikroflóry během zrání. [3]. Zrání probíhá od povrchu dovnitř a trvá poměrně dlouhou dobu. Konzistence těchto sýrů je měkká a soudržná, protože během zpracování nedochází k přehřívání ani dosoušení sýřeniny jako u sýru tvrdých [9].

Výroba těchto sýrů má v Evropě dlouholetou tradici [4]. Často jsou vyráběny v Rakousku, Belgii, Německu a Francii. Méně jsou produkovány v anglicky mluvících zemích [10].

V současné době se odhaduje, že právě SZPM tvoří 5 - 15 % celkového evropského trhu sýrů [4].

SZPM tvoří velký sortiment sýrů lišících se tvarem a hmotností. Typickými představiteli těchto sýrů jsou u nás Romadur, Romadůžek a Dezertní sýr. V zahraničí pak Limburger, německý Münster, francouzský Livarot či Saunt Paulin [2, 9].

Za zmínku stojí, že romadur, příbuzný belgickému limburgeru, má také svůj původ v Belgii. V podstatě se jedná o tučnější a pikantnější variantu limburgeru. V současnosti mají oba sýry rozdílnou chuť i velikost. Jelikož má romadur menší hmotnost a zraje stejně dlouho jako limburger, je jeho aroma pikantnější [11].

Zvláštním druhem SZPM jsou olomoucké tvarůžky. Řadíme je mezi kyselé sýry, což znamená, že se při srážení bílkovin mléka nepoužívají syřidla obsahující srážecí enzymy. Mléko se sráží pouze kyselinou mléčnou, která vzniká z laktosy působením bakterií čistých mlékařských kultur, které se přidávají do mléka ve formě zákysů. Základní surovinou pro jejich výrobu je průmyslový tvaroh, který vznikne tak, že se z vysráženého mléka odloučí syrovátka samovolným odkapáváním a lisováním. Kyselé sýry tvoří poměrně malou skupinu sýrů a řadí se k historicky nejstarším [2].

1.2 Technologický postup výroby sýrů zrajících pod mazem

Základní surovinou pro výrobu sýrů zrajících pod mazem je syrové mléko. O kvalitě sýrů rozhoduje především kvalita mléka použitého k jejich výrobě. Kvalitu mléka ovlivňuje zdravotní stav dojnice, způsob krmení, podmínky dojení a ošetření mléka po nadojení [2].

1.2.1 Požadavky na mléko

Jakost mléka použitého pro výrobu sýrů musí odpovídat požadavkům vyhlášky 287/1999 Sb. [1]. Kromě všeobecných požadavků musí mléko splňovat i speciální požadavky, jako je syřitelnost, prokysávací schopnost a jeho mikrobiologická čistota. Syřitelnost je podmíněna obsahem vápníku v mléce, množstvím kaseinu a zastoupením jeho frakcí v kaseinové micelle, hodnotou pH mléka a dalšími vlastnostmi. Dobrá prokysávací schopnost mléka zajišťuje dobrý růst čistých mlékařských kultur potřebných pro průběh všech mikrobiologických procesů zajišťujících výsledné vlastnosti sýra [9]. Z mikroflóry by měly v mléce převažovat kyselinotvorné bakterie. Nežádoucí jsou sporotvorné, hnilobné a plynotvorné bakterie a psychrotrofní mikroorganismy (MO) [1]. Hygiena získávání a ošetřování mléka má na jeho mikrobiologickou čistotu významný vliv [9].

1.2.2 Úprava mléka před zpracováním

Nadojené mléko musí před zpracováním projít různými úpravami, musí být mlékárensky ošetřeno. Toto ošetření spočívá v mechanickém vyčištění mléka a jeho tepelné úpravě. K odstranění hrubých nečistot slouží filtry zabudované do potrubí na přívodu mléka. Dočištění probíhá na odstředivkách, kde se působením odstředivé síly na základě vyšší hmotnosti oddělí od mléka nečistoty. Dále se musí standardizovat obsah tuku v mléce v závislosti na obsahu kaseinu, aby bylo dosaženo požadovaného obsahu tuku v sušině sýrů. Následuje tepelná úprava. Používá se šetrná pasterace, což je záhřev na teplotu alespoň 71,7 °C po dobu působení 15 - 20 sekund [2]. Pasterací dochází k usmrcení vegetativních forem MO, zejména patogenní a toxinogenní mikroflóry a inaktivaci části enzymů. Při pasteraci by měly být co nejméně změněny fyzikální, chemické a biologické vlastnosti mléka [9]. Při šetrné pasteraci přechází syrovátkové bílkoviny do syrovátky, což umožňuje dosáhnout požadovanou sušinu sýrů. Pasterací dochází v důsledku změny rozpustné a koloidní fáze minerálních látek ke zhoršení syřitelnosti mléka, proto se do mléka přidává chlorid vápenatý zlepšující syřitelnost. Chlorid vápenatý musí být přidán v určitém množství, protože vyšší dávky způsobují hořknutí sýrů [1].

Velmi důležitý je přídavek čistých mlékařských kultur. Jako primární se používají mesofilní kultury, které zajišťují prokysání mléka i sýrů a uvolňují enzymy podílející se na tvorbě chuti a vůně sýrů. Uplatňují se bakterie rodů *Lactococcus*, *Leuconostoc* a *Lactobacillus*. Jako sekundární kultura se používá mazová kultura *Brevibacterium linens* spolu s kvasinkovými kulturami. Před syřením se upraví teplota mléka na teplotu 30 - 35 °C [9].

1.2.3 Syření

Jak již bylo zmíněno, používá se sladké syření pomocí syřidlových enzymů. Jedná se o proteolytické enzymy s optimem působení v kyselé oblasti. Dříve se používala chymosinová syřidla získaná extrakcí ze slezů sajících mláďat (telat), ale pro jejich nedostatek byla syřidla nahrazována jinými typy proteinas živočišného či mikrobiálního původu. V současné době se používá jako syřidlo vepřový či hovězí pepsin [1].

V důsledku proteinové destabilizace vzniká při syření koagulát [1]. Přidává se tolik syřidla, aby syření při teplotě 29 - 32 °C proběhlo za 40 – 90 minut. Dávku syřidla nelze zvyšovat libovolně. Při vysokých dávkách syřidla sice dosáhneme rychlejšího srážení a vyšší tuhosti syřeniny, ale může vzniknout až kožovitá a špatně zpracovatelná syřenina. Také je obtížnější dosáhnout požadované sušiny sýrů v důsledku většího podílu zadržené syrovátky

a sýry mohou hořknout [9]. První fází sýření je proteolýza, kdy dochází vlivem syřidla k destabilizaci kaseinových micel hydrolyzou κ -kaseinu mezi fenylalaninem v pozici 105 a metioninem v pozici 106 na para- κ -kasein [12]. V této fázi je hydrolyzováno asi 80 - 90% veškerého κ -kaseinu. Ve druhé fázi dochází pomocí Ca iontů k agregaci para-kaseinových micel a synerezi, což je smršťování gelu sýřeniny za současného uvolňování syrovátky. Vzniklá sýřenina se dále zpracovává [1].

1.2.4 Zpracování sýřeniny

Uvnitř sýřeniny jsou uzavřeny tukové kuličky a gel obsahuje velké množství vody. Cílem sýření je odstranění této přebytečné vody ze sýřeniny a vznik sýrového zrna vhodného pro následné formování. Krájením sýřeniny se odstraňuje volná voda [9]. Krájení se provádí ve výrobních soustavou plochých nebo strunných nožů, které jsou uloženy v rámech a otáčejí se. Sýřenina se následně drobí na velké zrno velikosti lískového ořechu [1]. Po rozkrájení sýřeniny na syrová zrna dojde k postupnému uvolňování syrovátky a zrna se zpevňují. Během tohoto procesu se celý obsah opatrně promíchává a dochází k vytužení zrna [2]. Doba míchání je důležitá pro konečný obsah sušiny v sýru [1]. Část vyloučené syrovátky se dle potřeby odčerpá. Následuje formování sýrů [2].

1.2.5 Formování sýrů

Formování probíhá v tvořítkách, které mají různý tvar a velikost, podle požadovaného tvaru a velikosti sýru a mohou být kovová, plastová, případně s kovovou výztuží. Sýrové zrno se do tvořítka nalévá společně se syrovátkou a dochází k samovolnému odkapávání syrovátky. Odkapávání probíhá obvykle 16 - 20 hodin. Během formování se tvořítka několikrát obrací, aby byl jednodušší odtok syrovátky a sýry měly pravidelný tvar a stejnou konzistenci [2]. Konečný tvar získají sýry tlakem vytvořeným vlastní hmotností [9]. Během odkapávání syrovátky dochází současně vlivem čistých mlékařských kultur k prokysání sýru na požadovanou kyselost. Následuje solení sýrů [2].

1.2.6 Solení sýrů

Při solení se vytváří slaná chuť, dochází ke zpevnění sýrů, zlepšuje se konzistence a je umožněn další odtok syrovátky. Sůl je také dobrým konzervačním prostředkem, protože potlačuje činnost nežádoucí mikroflóry [9]. Solení probíhá tak, že se sýry ponoří do solné lázně, což je roztok definovaných parametrů (koncentrace NaCl, teploty, pH, doba solení). Koncentrace NaCl v solné lázni se pohybuje mezi 16 - 23 % a teplota se volí dle typu sýrů,

většinou 10 - 15 °C. Doba solení je různá. Obvykle trvá několik hodin, ale může probíhat až 5 dnů [2, 9]. Vhodná kyselost roztoku (pH) je 4,8 - 5 [1]. Při solení dochází k difúzi NaCl dovnitř sýrů a do solné lázně přechází část syrovátky a rozpustných solí. Nasolené sýry se nechají 1 - 2 dny oschnout a bez obalů se dopravují do zracích sklepů [2, 9].

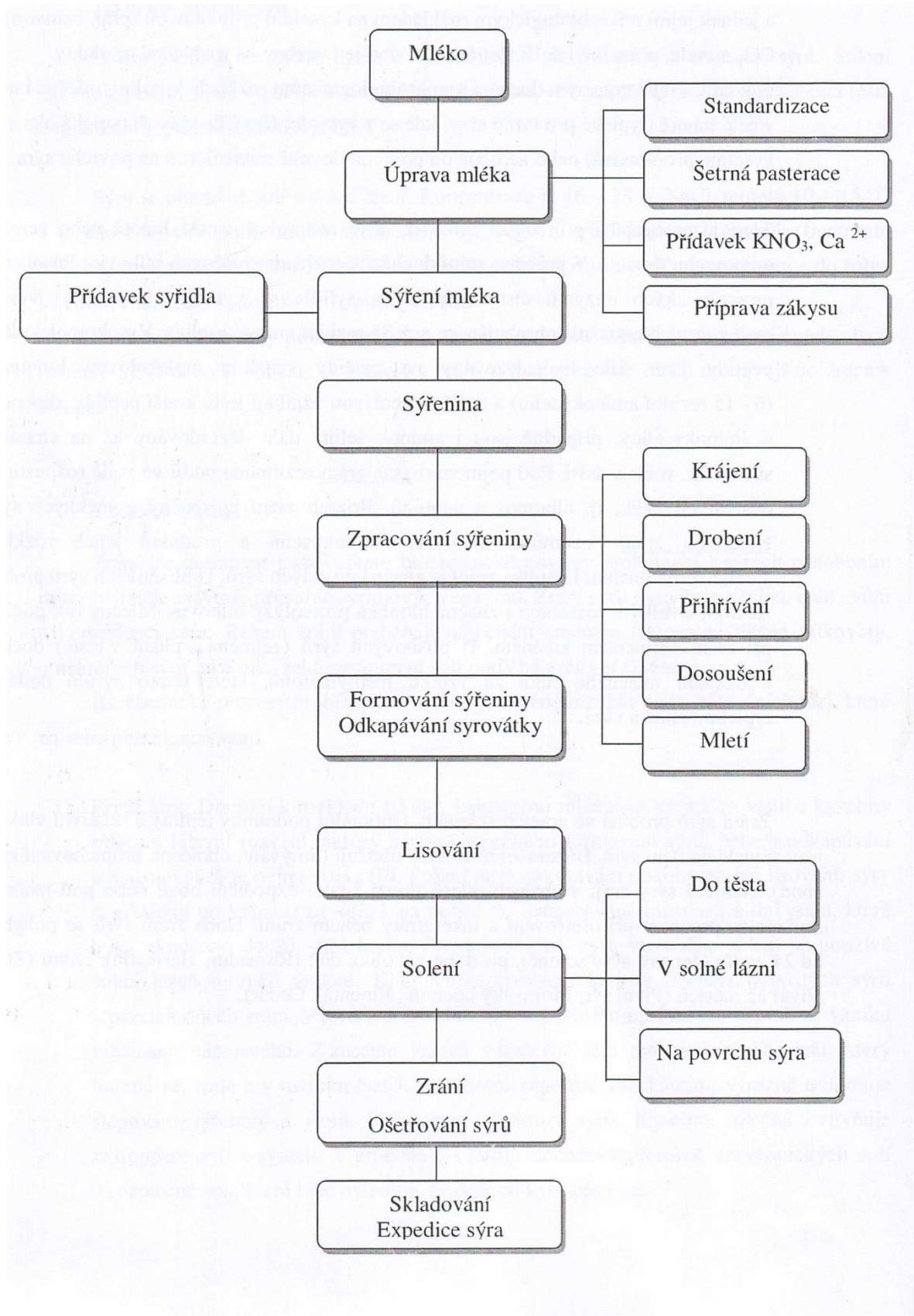
1.2.7 Zrání sýrů

Zrání probíhá ve zracích sklepech, což jsou klimatizované místnosti, které mají přesně definovanou teplotu a relativní vlhkost vzduchu [2]. Teplota zrání se pohybuje mezi 14 a 16 °C a relativní vlhkost vzduchu je 90 - 95 %. Během zrání dochází k různým změnám způsobeným enzymatickou činností mléčných kultur, syřidlových enzymů a ostatních MO přítomných ve zracích kulturách. Ty se na sýry nastříkávají během zrání nebo se sýry omývají v roztocích těchto kultur. Nejprve dochází pomocí bakterií mléčného kvašení ke zbytkovému rozkladu laktosy na kyselinu mléčnou, která uvolňuje z kaseinu vápník za vzniku vápenaté soli - mléčnanu vápenatého. Tato sůl je důležitá pro homogenní konzistenci sýrů. Kyselina mléčná je následně rozkládána povrchovou mikroflórou aerobně od povrchu dovnitř. Působením syřidel a proteolytických enzymů čistých kultur dochází k proteolýze bílkovin, čímž se dosáhne požadované kyselosti a vznikají peptidy o vysoké molekulové hmotnosti, které jsou dále hydrolyzovány až na aminokyseliny. Ty mohou být dále degradovány až na amoniak či sirovodík [9].

V první fázi se na povrch nastříkne kvasinková kultura *Candida mycoderma*, která zvýší pH do neutrální oblasti a tím zabrání růstu nežádoucích plísní a vytvoří vhodné podmínky pro rozvoj mazové kultury [1]. Následně se sýry ošetřují mazovou kulturou *Brevibacterium linens*, která vytváří na povrchu sýrů typický žlutooranžový maz [2].

Zrání trvá přibližně 2 až 3 týdny a sýry jsou během něj obraceny tak, aby prozrávaly stejnoměrně. Před koncem zrání se sýry balí a skladují v chladu. Zrací proces je nutné ukončit tak, aby byly sýry vhodné ke konzumaci [2].

Po zrání jsou sýry baleny, skladovány a expedovány do obchodních řetězců.



Obr. 1. Schéma výroby sladkých sýrů [13]

2 MIKROBIOLOGIE SÝRŮ ZRAJÍCÍCH POD MAZEM

Pro SZPM je typická charakteristická komplexní mikroflóra [14]. Tuto mikroflóru můžeme rozdělit na žádoucí a nežádoucí. Důležité je vhodné nastavení parametrů ovlivňujících růst a množení MO. Tyto parametry se vzájemně ovlivňují a můžeme je rozdělit na vnitřní a vnější [15].

2.1 Vnitřní parametry ovlivňující mikroflóru

2.1.1 Obsah živin

Mikroorganismy využívají různé složky potravy pro svůj metabolický preparát. Mezi hlavní živiny jsou řazeny sacharidy, minerální látky, vitaminy, dusíkaté sloučeniny, tuky a další růstové faktory [15, 16]. SZPM využívají jako substrát laktosu, která je rozkládána pomocí bakterií mléčného kvašení na kyselinu mléčnou. Kyselina mléčná může být dále rozštěpena na další kyseliny, např. kyselinu octovou, citrónovou. Dále využívají jako živiny bílkoviny, které jsou štěpeny na aromatické a chuťové látky sýra [14]. Jednoduché látky mohou MO využívat přímo, proto se spotřebovávají jako první a následně dochází k rozkladu složitějších látek [16].

2.1.2 pH

Hodnota pH je důležitá pro zdárný průběh enzymových reakcí MO. Každý MO vyžaduje pro svůj optimální růst určitou hodnotu pH. Většina bakterií roste nejlépe v prostředí, které se blíží neutrálnímu pH. Některé bakterie snášejí i nižší pH, avšak hraniční hodnota pro většinu bakteriálních buněk je pH 3,5 [16]. SZPM mají zpočátku zrání pH 4,8 - 5,0, které se postupně zvyšuje vlivem kvasinkové kultury k neutrální oblasti. Neutrální hodnota pH je vhodná pro růst mazové kultury *Brevibacterium linens* a bakterie rodu *Micrococcus* [17]. Kromě hodnoty pH záleží i na složení jednotlivých kyselin [15]. Nevhodná hodnota pH v určitém rozmezí nepůsobí mikrobicidně, ale naruší pouze vitalitu buňky. Při optimalizaci pH může dojít k dalšímu růstu a množení buněk [16].

2.1.3 Vodní aktivita

Vodní aktivita je důležitá pro látkovou přeměnu MO a značí se a_w . Může nabývat hodnot od 0 - 1. Optimální hodnota a_w pro růst bakterií je 0,99 - 0,91, pro kvasinky 0,91 - 0,88.

SZPM obsahují poměrně vysokou koncentraci NaCl. Bakterie rostoucí v prostředí se značným množstvím NaCl (více než 15 %), tzv. halofilní, rostou i při hodnotách a_w 0,75 [15].

2.1.4 Oxidačně-redukční potenciál

Oxidačně-redukční potenciál označován někdy jako redox-potenciál spočívá ve dvou důležitých procesech: oxidací, kdy dochází k odevzdání elektronů a redukcí, kdy jsou elektrony přijímány. Podle hodnoty oxidačně-redukčního potenciálu dělíme MO na aerobní, anaerobní, fakultativně anaerobní a mikroaerofilní [15]. V SZPM se vyskytují nejvíce fakultativně anaerobní MO, mezi které patří koryneformní bakterie, patogenní kmeny bakterie *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* a kvasinky [18]. Fakultativně anaerobní MO rostou jak za přítomnosti, tak nepřítomnosti kyslíku [15].

2.2 Vnější faktory ovlivňující mikroflóru

2.2.1 Teplota skladování

Každý MO roste v určitém rozmezí teplot a nejlépe rostou při tzv. optimální teplotě. Dle toho je lze dělit na psychofilní, mezofilní a termofilní. Psychofilní MO mají optimální teplotu růstu do 20 °C, ale rostou i při nízkých chladírenských teplotách (0 - 5 °C) [15]. V SZPM se můžou vykytovat psychofilní bakterie rodu *Micrococcus* a psychofilní kvasinky rodu *Candida* [19]. Většina MO se řadí do skupiny mezofilních, kde se uplatňuje optimální teplota růstu mezi 20 až 40 °C [15]. Mezi mezofilní bakterie vyskytující se v SZPM patří *Brevibacterium linens*, mesofilní kultury *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* a *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* [14]. Nejvyšší teplotu pro svůj růst vyžadují termofilní MO, kde je optimální teplota růstu vyšší jak 45 °C. Tyto bakterie se v SZPM nevyskytují [15].

2.2.2 Relativní vlhkost prostředí

Relativní vlhkost prostředí (RVP) závisí na skladovací teplotě. Platí, že čím vyšší je skladovací teplota, tím nižší musí být relativní vlhkost prostředí a naopak. RVP by měla být taková, aby nezvyšovala vodní aktivitu potraviny na hodnotu, při které by docházelo k množení MO [15]. U SZPM je relativní vlhkost prostředí během zrání vysoká, asi 90 %, aby neosychal povrch sýra a docházelo k rozmnožování vhodné mikroflóry *Brevibacterium linens* a kvasinek [14].

2.2.3 Přítomnost a koncentrace plynů

Důležitou roli hraje obal potraviny. Nejčastěji jsou baleny do nepropustných fólií s vhodným složením plynů pro danou potravinu. Většinou se používá kyslík, dusík nebo oxid uhličitý. Pro delší údržnost potravin se používá vakuové balení, ve kterém díky nepřítomnosti kyslíku nerostou aerobní bakterie [15]. SZPM se balí do propustných obalových materiálů (podlepená hliníková fólie bez hermetického uzavření) [2].

2.3 Žádoucí mikroflóra

Důležité pro zrání sýrů jsou mesofilní kultury bakterií mléčného kvašení *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*, *L. lactis* ssp. *cremoris* produkující kyselinu mléčnou a aromatické látky. Mesofilní kultury jsou do mléka přidávány záměrně a rychlost jejich přidávání musí být regulována pro zajištění požadované účinnosti a vhodné konzistence produktu [20]. Dalším typickým aspektem pro zrání je mazová kultura obsahující bakterie a kvasinky, které byly izolovány z povrchu sýrů během zrání. Kvasinky *Candida lipolytica*, *Debaryomyces hansenii*, *Geotrichum candidum* rozkládají kyselinu mléčnou. Tím způsobí odkyselení povrchu, což je žádoucí pro růst mazových bakterií. Kvasinky dokáží syntetizovat vitaminy (riboflavin, niacin a kyselinu pantotenovou) nezbytné pro růst bakterie *Brevibacterium linens* a kromě toho deaminují aminokyseliny za vzniku amoniaku, který proniká dovnitř sýrů a snižuje kyselost uvnitř. Na začátku zrání tvoří kvasinky dominantní mikroflóru (až 10^9 KTJ/cm²) a s časem se jejich počet snižuje a začínají převládat vlastní proteolytické bakterie. Hlavní proteolytickou bakterií je halotolerantní, gram-pozitivní, krátká tyčinka *Brevibacterium linens*. Její optimální teplota růstu je 21 °C a pH prostředí 6 až 9,8. Roste i v prostředí s obsahem 15 % NaCl. Za přítomnosti vzdušného kyslíku vytvoří za 4-5 dní na povrchu sýru žlutooranžový maz. Mezi další bakterie přispívající k tvorbě mazu patří *Micrococcus* spp., *Corynebacterium* spp. a *Arthrobacter* spp. Mazové bakterie a příslušné kvasinky rostou zpočátku v koloniích, ale omýváním se rozírají po celém povrchu sýrů [14]. Tyto sekundární startovací kultury potlačují růst nežádoucí mikroflóry [19]. V SZPM se mohou vyskytovat non-startérové bakterie mléčného kvašení, zejména mesofilní bakterie rodu *Lactobacillus*. Dále se v SZPM mohou vyskytovat enterokoky, které jsou schopny produkovat antibakteriální látky proti nežádoucím patogenům. Z povrchu sýrů byly izolovány i některé druhy stafylokoků a mikrokoků [10].

2.3.1 Koryneformní bakterie

Tato skupina bakterií je velmi rozšířená a můžeme se s nimi setkat v běžném životě. Často jsou součástí životního prostředí. *Corynebacterium* spp., *Arthrobacter* spp., *Brevibacterium linens* patří do skupiny koryneformních bakterií. Tyto bakterie patří do gram-pozitivní, fakultativně anaerobní a chemoorganotrofní skupiny, hrají velmi důležitou roli při zrání sýrů. Produkci pigmentů vytváří typickou barvu povrchového mazu. *B. linens* obsahuje proteolytické a lipolytické enzymy způsobující biochemické změny během zrání a ovlivňující konečné vlastnosti sýrů [10].



Obr. 2. *Brevibacterium linens* [21]

2.4 Patogenní mikroflóra

Kvůli vhodným podmínkám se v SZPM mohou vyskytovat i nežádoucí patogenní bakterie, mezi které lze zařadit *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* a patogenní kmeny *Escherichia coli* [22].

2.4.1 *Listeria monocytogenes*

Listeria monocytogenes je gram-pozitivní, fakultativně anaerobní, psychrotrofní, osmotolerantní bakterie, která tvoří krátké, rovné tyčinky, které rostou v rozmezí pH 5 až 9. Díky schopnosti růstu při nízkých teplotách a nízkých hodnotách a_w jsou sýry ideálním prostředím pro jejich množení [18]. Tento patogen roste výlučně na povrchu sýrů [22] a je příčinou alimentární listeriózy, kdy jsou napadeny buňky imunitního systému a dochází v nich k pomnožení *L. monocytogenes*. Kontaminace může nastat i při domácím skladování v chladničkách. Hlavní prevencí před výskytem je dodržování sanitárního řádu během výroby. [10, 18]

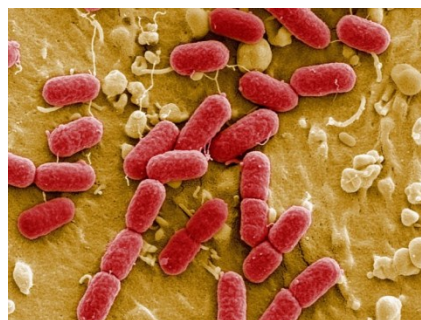
Obr. 3. *Listeria monocytogenes* [23]

2.4.2 *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus tvoří gram-pozitivní, fakultativně anaerobní, mezofilní, kataláza-pozitivní, halotolerantní, osmotolerantní, nepohyblivé koky. Toxigenní *S. aureus* produkuje enterotoxin, který způsobuje alimentární intoxikaci, která ohrožuje lidské zdraví a může způsobit otravy. Enterotoxin může být produkován během výroby, zrání nebo skladování sýrů díky vhodným podmínkám. *S. aureus* je schopen produkovat enterotoxin v širokém rozmezí teplot a to i při nízkých teplotách, v poměrně širokém rozmezí pH 4,2 – 9,3, při vysoké koncentraci NaCl (až 10 %) a při nízké vodní aktivitě. Naopak přítomností nepatogenní mikroflóry, dobrou kysací aktivitou zákysových kultur je produkce enterotoxinu inhibována [10, 18].

2.4.3 *Escherichia coli*

E. coli je přirozenou součástí střevní mikroflóry člověka a teplokrevných zvířat. Její přítomnost v potravinách ukazuje na špatnou úroveň hygieny a sanitačního režimu. Jedná se o gram-negativní, fakultativně anaerobní, mezofilní MO. Patogenní kmeny *E. coli* často způsobují průjemová onemocnění a jiné infekce. Inhibiči jejich růstu způsobují zákysové kultury s rychlou prokysávací schopností. Tyto kultury inhibují i růst také ostatních patogenů, proto se je snažíme do výrobků co nejvíce používat [18].

Obr. 4. *Escherichia coli* [24]

3 BIOGENNÍ AMINY

3.1 Charakteristika biogenních aminů

Biogenní aminy (BA) jsou nízkomolekulární organické sloučeniny vykazující biologickou aktivitu [5]. Jsou odvozené od bazických, aromatických nebo alifatických aminokyselin. Některé mají významné biologické vlastnosti. Jsou součástí některých živočišných tkání či rostlinných pletiv, kde vykonávají důležité funkce. Jedná se o produkty běžné metabolické aktivity zvířat, rostlin i mikroorganismů [6].

V potravinách vznikají především dekarboxylací přirozených aminokyselin působením enzymů dekarboxylas, kterými jsou vybaveny četné druhy hnilobných bakterií, ale také řada bakterií mléčného kvašení [5]. Proto bývají tyto látky často spojovány s kazivostí a kvasnými procesy [25]. Biogenní aminy jsou pro člověka na jednu stranu nepostradatelné, avšak ve vysokých koncentracích se mohou projevit jako látky vasoaktivní a psychoaktivní. K hlavním příznakům při konzumaci vysokého množství biogenních aminů patří zvracení, dýchací potíže, pocení, bušení srdce, hypotense a hypertense či migrény [5]. Klinické příznaky se obvykle objevují mezi 30 minutami až několika hodinami po požití BA a obvykle vymizí během 24 hodin [7]. Zvýšený výskyt BA v potravinách je tedy nežádoucí. Kromě samotného toxického působení BA mohou navíc nitrosací sekundárních aminů vznikat toxické nitrosaminy [25]. Podle chemické struktury se biogenní aminy člení na aromatické, heterocyklické, alifatické a polyaminy [5].

3.2 Biogenní aminy v sýrech zrajících pod mazem

BA se vyskytují téměř ve všech potravinách jako produkty metabolismu mikroorganismů. Ve vyšším množství se vyskytují ve fermentovaných výrobcích, mezi které patří i SZPM. K tvorbě BA dochází při zrání sýrů nedodržením dostatečné hygieny nebo vlivem kontaminující mikroflóry [6].

V sýrech dochází k rozvoji BA během zrání, kdy vzniká proteolýzou kaseinu velké množství volných aminokyselin a z nich poté mohou pomocí dekarboxylas vznikat již zmíněné BA. Producenty dekarboxylas jsou některé druhy bakterií čeledi *Enterobacteriaceae* nebo rodů *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Micrococcus*, *Clostridium* a *Pseudomonas*. Nejvyšší zastoupení mají v sýrech BA tyramin, histamin, putrescin, kadaverin a tryptamin [25, 26]. Tyramin nebo histamin mohou mít přímý vliv na cévní a centrální nervovou soustavu. Pu-

trescin a kadaverin neprokazují přímé nebezpečí, ale podporují toxicitu tyraminu a histaminu [27].

Množství BA je ovlivněno různými faktory. Mezi hlavní faktory patří délka zrání sýrů a způsob skladování. Bylo prokázáno, že při skladování za vyšších teplot byla tvorba BA vyšší. Například u skladování sýrů při teplotě 5 °C byl pozorován nárůst BA za 3 týdny, kdežto u skladování při teplotě 20 °C byl pozorován nárůst za týden [27]. Tvorba BA může být dále ovlivněna vysokotlakým ošetřením sýrů během jejich zrání. Vysokotlaké ošetření je ošetření za zvýšeného tlaku než je tlak atmosferický (101 325 Pa) a ovlivňuje proteolýzu. Dojde ke zvýšené produkci peptidů a aminokyselin, která může následně způsobit zvýšenou produkci BA [28].

Zvýšený obsah BA v SZPM může být způsoben startérovými bakteriemi mléčného kvašení, non-startérovými bakteriemi mléčného kvašení a dalšími MO. Obsah BA v těchto sýrech je značný, jelikož obsahují velké množství bakterií, které jsou schopny je tvořit. Bakterie rodu *Lactobacillus* mají velkou schopnost produkce histaminu a putrescinu. Některé kmeny jako je *Lactobacillus brevis* se mohou podílet na tvorbě tyraminu. Enterokoky, které díky své odolnosti vůči vysoké teplotě a vysoké koncentraci NaCl tvoří velký podíl mikroflóry SZPM, se podílejí na dekarboxylaci tyrosinu za vzniku BA tyraminu. Významné korelace byly pozorovány mezi bakteriemi a aminokyselinami, mezi enterokoky a koncentrací fenylalaninu, laktokoky a koncentrací kadaverinu a tyrosinu, enterobakteriemi a koncentrací tryptofanu. V SZPM převažuje kadaverin, následuje tyramin, histamin a putrescin (viz. Tab. 1) [7].

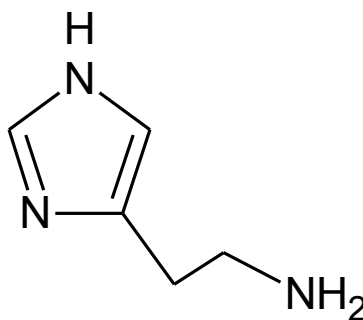
Tab. 1. Obsah biogenních aminů v různých druzích sýrů [7]

Sýr	Histamin [mg/kg]	Tyramin [mg/kg]	Putrescin [m/kg]	Kadaverin [mg/kg]	Fenyletylamin [mg/kg]
SZPM	168,3	247,6	31,3	748,2	ND
Čerstvé sýry	3,2-38,0	12,8-48,0	5,5-41,0	10,7-45,0	-
Ementál	23,5-117,5	52,5-64,5	3,9-38,0	98,3	ND
Tvaroh	51,3-55,0	335,0	449,0	628,0	-

ND – biogenní amin nedetekován/nenalezen, - neanalyzováno

3.2.1 Histamin

Histamin je považován za nejtoxičtější amin zjištěný v potravinách. Jeho toxikologické účinky závisí na jeho koncentraci, přítomnosti jiných aminů a na aktivitě aminoroxidas. Právně navržena horní hranice obsahu histaminu v potravinách je 100 mg/kg potraviny. Jelikož většina sýrů obsahuje nízké hladiny histidinu, obsahuje také malé množství histaminu. Největší dekarboxylasovou aktivitu přeměny histidinu na histamin mají heterofermentativní mezofilní bakterie rodu *Lactobacillus*. Kromě potravin je přítomen v poměrně velkém množství v bazofilních granulocytech. Jeho účinek nepůsobí na tělo, pokud se neuvolní do krve. V případě uvolnění se naváže na receptory buněčných membrán v kardiovaskulárním systému. Může přímo stimulovat srdce nebo smyslové neurony. Charakteristické příznaky působení histaminu jsou kožní vyrážky, kopřivky, edémy, zvracení, průjemy, bolesti hlavy, hypotenze, bušení srdce či nevolnost [25, 26, 29].

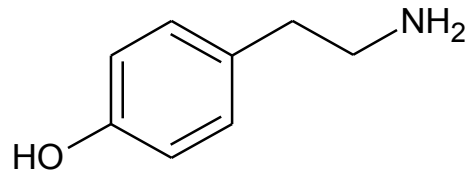


Obr. 5. Vzorec histaminu

(vytvořen v programu ChemSketch [22])

3.2.2 Tyramin

Tyramin je důležitý v potravinách kvůli jeho toxikologickému působení. Působí nepřímo tím, že uvolňuje hormon dřeně nadledvinek noradrenalin, který způsobuje zvýšení krevního tlaku a zvyšuje také činnost srdce. Může způsobit až krvácení do mozku nebo srdeční selhání. Právně navržena horní hranice obsahu tyraminu v potravinách je 100-800 mg/kg potraviny [25, 26].



Obr. 6. Vzorec tyraminu

(vytvořen v programu ChemSketch [26])

BA, které již jsou v potravině, lze odstranit velmi těžko. K částečnému snížení může dojít v tepelně opracovaných výrobcích díky jejich reakci s redukujícími cukry [26].

II. PRAKTICKÁ ČÁST

4 CÍL PRÁCE

Cílem práce bylo:

- V teoretické práci popsat sýry zrající pod mazem a charakterizovat biogenní aminy.
- V obchodní síti v České republice zakoupit sýry zrající pod mazem.
- U těchto sýrů provést mikrobiologický rozbor (celkový počet mikroorganismů, stanovení počtu enterobakterií, enterokoků, mléčných bakterií /koků a tyčinek/, kvasinek a plísní).
- U zakoupených sýrů zrajících pod mazem provést monitoring výskytu biogenních aminů.
- Na základě získaných výsledků formulovat závěry.

5 PRACOVNÍ POSTUPY A MATERIÁL

5.1 Analyzované vzorky

5.1.1 Charakteristika analyzovaných vzorků

Vzorky sýrů použité k analýze byly zakoupeny v obchodní síti ČR. Byly použity vzorky sýrů, které můžeme rozdělit do následujících skupin:

Kyselé sýry:

1. Kyselý sýr bez příchutě.
2. Kyselý sýr uzený.
3. Kyselý sýr s příchutí červené papriky.
4. Kyselý sýr s příchutí česneku.

Sýry zrající v chladu

5. Sýr zrající v chladu bez příchutě.
6. Sýr zrající v chladu s příchutí zeleného pepře.
7. Sýr zrající v chladu s příchutí vlašských ořechů.

Ochucené sýry zrající pod mazem (typu Romadur)

8. s příchutí česneku s bylinkami.
9. s příchutí chilli.

Sýry zrající pod mazem (typu Romadur) – celkem 6 různých sýrů (označeny 10 až 15).

5.2 Materiál

5.2.1 Přístroje a pomůcky

- Automaticke mikropipety Biohit, Finsko.
- Chladnička ERB3046 Elektrolux, Švédsko.
- Předvážky, KERN 440-47N (max 2000g, d=0,1g), Německo.
- Digitální váha, KB800-2- Kern & Sohn GmbH, Německo.
- Analytické váhy A&D GH-200 EC, Mettler Toledo, ČR.

- Vortex Heidolph Reax top, Německo.
- Autokláv 135 S, H+P VARIOKLAV /H+P Labortechnik AG Německo/.
- Biologický termostat BT 120 /Laboratorní přístroje Praha/.
- Laboratorní třepačka LT2, Kavalierglass, ČR.
- Odstředivka EBA 21, Hettich ZENTRIFUGEN, Německo.
- pH metr EUTECH INSTRUMENTS pH510, Nizozemí.
- Termoblok BENCHMARK DIGITAL BLOCK, USA.
- Systém HPLC (binární pumpa LabAlliance, USA, autosampler LabAlliance, USA, kolona s termostatem; UV/VIS DAD detektor ($\lambda = 254 \text{ nm}$); a degaser 1260 Infinity, Agilent Technologies).
- Hlubokomrazicí box MDF-U3286S, SANYO, Japonsko.
- Lyofilizátor ALPHA 1-4 LSC, CHRIST, Německo.
- Eppendorfkové mikrozkuhavky.
- Laboratorní sklo a plasty.
- Filtry s porozitou $0,45 \mu\text{m}$.

5.2.2 Živné půdy použité pro kultivaci vzorků

- a) PCA – Plate Count Agar (HiMedia, Indie)
- b) Endo Agar (HiMedia, Indie)
- c) SBM Agar – Slanetz & Bartley Agar (HiMedia, Indie)
- d) M17 – M17 Agar (Oxoid, Velká Británie)
- e) MRS – De Man Rogosa Sharpe Agar (HiMedia, Indie)
- f) CHYGA – Chloramfenikol Yeast Glukose Agar (HiMedia, Indie)

Příprava živných půd:

Bylo vypočítáno a naváženo dané množství živné půdy a rozpuštěno ve 400 ml vody. Směs byla důkladně promíchána a následně proběhla sterilace v autoklávu při teplotě $121 \text{ }^\circ\text{C}$ po dobu 20 minut. Sterilované půdy opět zamíchány a rozlity na Petriho misky a označeny.

Příprava fyziologického roztoku:

Bylo naváženo 8,5 g chloridu sodného (LachNer) a rozpuštěno v 1000 ml vody. Takto připravený fyziologický roztok byl sterilován v autoklávu při teplotě 121 °C po dobu 20 minut.

5.3 Mikrobiologická analýza sýrů

Z jednotlivých vzorků sýrů bylo do sterilních sáčků odebráno přiměřené množství (cca 5 g) a smícháno s fyziologickým roztokem v poměru 1:9. Odběr vzorku byl prováděn za aseptických podmínek pomocí sterilních pomůcek. Odebraný vzorek byl homogenizován ve stomacheru po dobu 5 minut a poté bylo provedeno potřebné desítkové ředění do zkumavek s fyziologickým roztokem. Vzorky byly následně roztěrem (100 µl) naočkovány na Petriho misky s příslušnými půdami, které byly předem připraveny. Mezi tyto půdy patří PCA – Plate Count Agar pro stanovení celkového počtu aerobních a fakultativně anaerobních mesofilních mikroorganismů, ENDO Agar pro stanovení enterobakterií, SBM – Slanetz & Bartley Agar pro stanovení enterokoků, M17 – M17 Agar pro stanovení mléčných koků, MRS – MRS Agar pro stanovení mléčných tyčinek (laktobacilů), CHYGA - Chloramfenicol Yeast Glucose Agar (agar s chloramfenikolem, glukosou a kvasničným extraktem) pro stanovení kvasinek a plísní.

Zaočkované misky byly kultivovány při příslušné teplotě (dle analyzovaných mikroorganismů) po určitou dobu. Misky s půdami PCA, MRS, M17 a SBM byly kultivovány při teplotě 30 °C po dobu 48 hodin, misky s Endo Agarem při teplotě 37 °C po dobu 24 hodin a misky s půdou CHYGA byly inkubovány při teplotě 20 °C po dobu 5 dnů. Po uplynulé době byly spočítány kolonie narostlé na půdách a přepočteny na CFU/g.

5.4 Příprava vzorků pro detekci biogenních aminů (chromatografická detekce biogenních aminů)

Vzorky sýrů byly vyjmuty z mrazničky, ve které byly uloženy v období mezi mikrobiologickou analýzou a stanovením biogenních aminů. Částečně rozmrazený vzorek byl nakrájen na menší kousky a lyofilizován.

Po lyofilizaci byl na analytických váhách navážen 1 g rozmělněného vzorku do 15 ml zkumavky a bylo přidáno 10 ml 0,6 M HClO₄ (Sigma). Zkumavka byla promíchána a třepána na třepačce asi 30 minut. Následně byla 20 minut odstředována (3000 ot/min) a po odstředění byl horní podíl přelit do 25 ml odměrné baňky. K usazenému vzorku bylo znovu přilito 7 ml 0,6 M HClO₄ a vše bylo opakováno ještě 2 krát. Následně byla provedena filtrace přes papírový filtr. Z přefiltrované suspenze byl odebrán 1 ml do derivatizační nádoby, bylo přidáno 100 µl 1,7-heptandiaminu (Sigma) v koncentraci 500 mg/l a 1,5 ml karbonátového pufru o pH 11,1-11,2. Pro přípravu pufru bylo nejprve naváženo potřebné množství hydrogenuhličitanu sodného (Merck), který má pH asi 8,5 a následně k němu byl přidáván uhličitan sodný (Merck), který má vyšší pH a tímto bylo upraveno pH. Po přidávku pufru byly přidány 2 ml čerstvě připraveného roztoku dansylchloridu (Sigma) o koncentraci 5 g/l v acetonu (Merck). Derivatizační nádoby byly dobře uzavřeny a třepány v temnu asi 20 hodin. Po uplynulé době bylo ke vzorkům přidáno 200 µl prolinu (Sigma) a třepáno další hodinu. Byly přidány 3 ml heptanu (Sigma) a všechny nádoby byly ručně třepány asi 3 minuty.

Do vialky byl odpipetován 1 ml heptanové vrstvy, obsah vialky byl odpařen do sucha pod proudem dusíku při teplotě 60 °C. Suchý odparek byl zředěn 1,5 ml acetonitrilu (Sigma). Vzorky byly uloženy v mrazničce při teplotách cca -18 °C. Před analýzou byly vzorky přefiltrovány přes stříkačkový filtr s porozitou 0,22 µm a dávkovány do chromatografického systému. Výsledky výskytu biogenních aminů byly vyhodnoceny pomocí mobilní a stacionární fáze na koloně Agilent Eclipse Plus C18 RRHD a rozměry 3,0 x 50 mm. Průtok kolonou byl 0,45 ml/min a stanovení se provádělo při teplotě 30 °C a vlnové délce 254 nm. Metoda pro stanovení BA byla upravena dle Dadákové a kol [30].

6 VÝSLEDKY A DISKUZE

V praktické části bakalářské práce byly provedeny mikrobiologické testy u sýrů zrajících pod mazem skladovaných při chladírenské teplotě. Mikrobiologické testy byly provedeny 3 až 7 dnů před uplynutím minimální trvanlivosti uvedené na obalech výrobků.

6.1 Mikrobiologické testy

Mikrobiální rozbory byly provedeny u 15 vzorků sýrů. Výsledky stanovení CPM, enterobakterií, enterokoků, mléčných bakterií – koků a tyčinek, kvasinek a plísní u vzorků kyselých sýrů jsou uvedeny v Tabulce 2.

Tab. 2. Mikrobiologická analýza vzorků kyselých sýrů (v hodnotách KTJ/g)

Kyselé sýry	Bez příchutě	Uzené	S příchutí červené papriky	S příchutí česneku
CPM	$> 10^8$	$9,73 \cdot 10^7$	$1,14 \cdot 10^9$	$5,48 \cdot 10^8$
Enterobakterie	$> 10^5$	$> 10^5$	$> 10^5$	$> 10^5$
Enterokoky	< 10	$2,27 \cdot 10^5$	$> 10^5$	$> 10^5$
Mléčné bakterie - koky	$> 10^8$	$1,13 \cdot 10^8$	$1,87 \cdot 10^9$	$4,2 \cdot 10^8$
Mléčné bakterie – tyčinky	$> 10^8$	$1,64 \cdot 10^8$	$9,01 \cdot 10^7$	$1,36 \cdot 10^8$
Kvasinky a plísně	$> 10^6$	$4,18 \cdot 10^6$	$3,18 \cdot 10^6$	$6 \cdot 10^6$

Ze získaných hodnot dle Tabulky 2. lze vyhodnotit jednotlivé počty MO v KTJ/g u testovaných vzorků sýrů.

Celkový počet mikroorganismů

V ČSN 56 9606 není uveden limit pro celkový počet mikroorganismů v sýrech zrajících pod mazem [31]. Limit není určen nejspíše z důvodu, že v těchto sýrech dochází záměrně k přidavku kulturní mikroflóry v různých dávkách podle typu zrajících sýrů a během zrání dochází k rozvoji MO, které se výrazně podílí na tvorbě aroma. Normy se rovněž často zaměřují na stanovení mikroorganismů, které by mohly u lidí způsobit onemocnění, nebo mikroorganismů, které by mohly významně poškodit, respektive znehodnotit výsledný produkt. Výskyt takových mikroorganismů se u sýrů obecně neočekává (nebo se případně

vyskytují v nízkém počtu), a to z toho důvodu, že je přerostou mikroorganismy, které jsou součástí zákysových kultur.

U sledovaných vzorků byly zjištěny hodnoty celkového počtu mikroorganismů (CPM) mezi 10^5 - 10^9 KTJ/g. Nejvíce MO bylo zjištěno u vzorků kyselých sýrů, následují sýry ochucené a nezařazené a nejméně bylo u vzorků sýrů zrajících v chladu (viz. Tabulka 2., 3., 4., 5.). Tyto zjištěné počty mohou zahrnovat mezofilní zákysové kultury rodů *Lactococcus* a *Leuconostoc*, bakterie *Brevbacterium linens*, koryneformní bakterie, stafylokoky a kvasinky [14]. Na druhou stranu lze však říci, že mnohé bakterie mléčného kvašení, podobně jako koryneformní bakterie, jsou kultivačně náročnější, a proto na půdě PCA nebyly zachyceny. Z tohoto důvodu lze předpokládat, že na půdě PCA byly zachyceny mikroorganismy, které nemají specifické kultivační nároky, a které lze mnohdy zařadit mezi kontaminující mikroflóru (aniž by však způsobily výraznější změny výsledného produktu).

Tab. 3. Mikrobiologická analýza sýrů zrajících v chladu (v hodnotách KTJ/g)

Sýry zrající v chladu	Bez příchutě	S příchutí zeleného pepře	S příchutí vlašských ořechů
CPM	$2,55 \cdot 10^6$	$7,34 \cdot 10^7$	$7,75 \cdot 10^7$
Enterobakterie	< 10	< 10	< 10
Enterokoky	< 10	$8,9 \cdot 10^4$	< 10
Mléčné bakterie - koky	$2,87 \cdot 10^6$	$3,67 \cdot 10^7$	$1,05 \cdot 10^8$
Mléčné bakterie – tyčinky	$1,66 \cdot 10^6$	$3,07 \cdot 10^7$	$5,17 \cdot 10^7$
Kvasinky a plísně	$1 \cdot 10^5$	$4,55 \cdot 10^5$	$5,46 \cdot 10^6$

Enterobakterie

Enterobakterie jsou gramnegativní nesporelující fakultativně anaerobní tyčinkovité bakterie. Mezi potravinářsky nejvýznamnější enterobakterie můžeme zařadit rody *Escherichia*, *Shigella*, *Salmonella*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Yersinia*. Při výskytu v potravinách ukazují na nedodržení hygienických požadavků při výrobě [13]. Přítomnost enterobakterií byla zjištěna u dvanácti vzorků sýrů z patnácti (Tabulka 2 – 5). V sýrech zrajících v chladu nebyly enterobakterie detekovány. Počet enterobakterií v kyselých sýrech pokaždé přesahoval hodnotu 10^5 KTJ/g. V nezařazených vzorcích sýrů typu Romadur bez příchutě, Lim-

burger bez příchutě byl počet enterobakterií $>10^3$ KTJ/g a u ochucených sýrů se pohyboval v rozmezí $10^4 - 10^5$ KTJ/g. Ve srovnání s výsledky uvedenými v diplomové práci Stratilové Jermářové [32] byl zjištěn o něco větší obsah enterobakterií v kyselých sýrech a v sýrech nezařazených. Zatímco v uvedené DP byl počet koliformních bakterií v rozmezí $10^2 - 10^4$ KTJ/g, ve vzorcích sýrů testovaných v rámci této bakalářské práce přesahovaly počty enterobakterií hodnotu 10^5 KTJ/g. Tyto rozdíly mohou být způsobeny tím, že v uvedené DP práci byl stanoven počet koliformních bakterií, které tvoří skupinu bakterií zařazených mezi enterobakterie (jsou jejich podmnožinou), kdežto v této práci byly stanoveny všechny enterobakterie. Vyšší hodnoty mohou poukazovat na to, že při výrobě sýrů nebyla dodržována dostatečná hygiena.

Tab. 4. Mikrobiologická analýza ochucených sýrů (v hodnotách KTJ/g)

Ochucené sýry	S příchutí česneku s bylinkami	S příchutí chilli
CPM	$1,06 \cdot 10^8$	$1,32 \cdot 10^8$
Enterobakterie	$6,33 \cdot 10^4$	$1,24 \cdot 10^5$
Enterokoky	$1,24 \cdot 10^6$	$4,72 \cdot 10^5$
Mléčné bakterie - koky	$1,33 \cdot 10^8$	$1,48 \cdot 10^8$
Mléčné bakterie - tyčinky	$1,99 \cdot 10^7$	$7,38 \cdot 10^6$
Kvasinky a plísně	$8,36 \cdot 10^6$	$8,18 \cdot 10^6$

Enterokoky

Enterokoky jsou běžně přítomny v různých prostředích. V sýrech se vyskytují velmi často a hrají zde velmi důležitou roli při zrání, kdy vytváří typické aroma sýrů. I když přítomnost enterokoků byla dříve považována za známku špatné hygieny, bylo zjištěno, že četné kmeny enterokoků jsou schopny produkovat různé antibakteriální proteiny proti patogenním MO jako například *Listeria monocytogenes*. Enterokoky rovněž mohou jako non-starterové mikroorganismy přispívat k rozvoji chutě a vůně sýrů [10, 33].

Enterokoky byly detekovány u deseti vzorků sýrů, kde se jejich počet pohyboval nejčastěji v rozmezí $10^3 - 10^6$ KTJ/g (Tabulka 2 – 5). Nejvíce enterokoků bylo nalezeno u kyselých sýrů s příchutí, kde počet přesahoval hodnotu $>10^5$ KTJ/g. Vysoký počet $>10^3$ KTJ/g byl stanoven u vzorků sýru typu Limburger a Romadur bez příchutě, což je v souladu se studií Bockelmanna a kol. [35], kteří stanovili výskyt enterokoků u sýru typu Limburger, Romadur v množství $>10^4$ KTJ/g.

Tab. 5. Mikrobiologická analýza nezařazených sýrů (v hodnotách KTJ/g)

Nezařazené sýry	10	11	12	13	14	15
CPM	$11 \cdot 10^5$	$3,85 \cdot 10^5$	$3,11 \cdot 10^7$	$> 10^7$	$4,43 \cdot 10^7$	$1,76 \cdot 10^7$
Enterobakterie	$8,9 \cdot 10^3$	$> 10^3$	$> 10^3$	$> 10^3$	$> 10^3$	$> 10^3$
Enterokoky	< 10	$> 10^3$	$> 10^3$	< 10	$> 10^3$	$2,4 \cdot 10^3$
Mléčné bakterie - koky	$8,73 \cdot 10^5$	$7,44 \cdot 10^7$	$2,71 \cdot 10^7$	$5,48 \cdot 10^7$	$5,09 \cdot 10^5$	$1,24 \cdot 10^7$
Mléčné bakterie - tyčinky	$2,36 \cdot 10^5$	$3,13 \cdot 10^7$	$1,31 \cdot 10^6$	$> 10^7$	$> 10^7$	$4,4 \cdot 10^5$
Kvasinky a plísňe	$1,24 \cdot 10^6$	$5,95 \cdot 10^6$	$1,36 \cdot 10^5$	$3,64 \cdot 10^4$	$6,64 \cdot 10^5$	$1 \cdot 10^5$

Mléčné bakterie – koky a tyčinky

Mléčné bakterie tvoří velkou skupinu nepohyblivých nesporulujících kataláza-negativních mikroaerofilních až fakultativně anaerobních grampozitivních koků a tyčinek fermentujících sacharidy za vzniku kyseliny mléčné. Patří sem některé druhy bakterií rodů *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* a *Lactobacillus* [13].

Nejčastěji se mléčné bakterie vyskytovaly v sýrech v rozmezí $10^6 - 10^8$ KTJ/g (Tabulka 2 – 5). U vzorků kyselých sýrů byl počet v rozmezí $10^7 - 10^9$ KTJ/g, u nezařazených sýrů byl jejich počet v rozmezí $10^5 - 10^7$ KTJ/g. Dle Bockelmanna a kol. [3] se pohyboval počet mléčných bakterií v rozmezí $10^2 - 10^7$ KTJ/g v závislosti na vzorku sýru. U některých

vzorků sýrů přesahoval počet mléčných bakterií hodnotu 10^7 KTJ/g [3]. K podobným výsledkům jsme rovněž dospěli v této studii.

Kvasinky a plísně

V sýrech zrajících pod mazem lze nalézt vysoký počet kvasinek, jelikož patří mezi základní MO, díky kterým dostává sýr typické aroma a chuť. Kvasinky jsou heterotrofní eukaryotické fakultativně anaerobní organismy, které jsou schopny zkvašovat monosacharidy, popřípadě disacharidy na ethanol a oxid uhličitý [35]. V SZPM se vyskytují zejména tyto kvasinky: *Candida lipolytica*, *Debaryomyces hansenii*, *Geotrichum candidum* [14].

Obsah kvasinek a plísní ve vzorcích se pohyboval mezi hodnotami $10^4 - 10^6$ KTJ/g (Tabulka 2 – 5). Ve srovnání s DP Stratilové Jermářové [32] se počet kvasinek a plísní zjištěných v testovaných vzorcích sýrů zrajících pod mazem výrazněji nelišil. Zjištěné hodnoty počtu kvasinek a plísní se ve výše uvedené diplomové práci [32] pohybovaly v rozmezí $10^3 - 10^7$ KTJ/g.

6.2 Detekce biogenních aminů

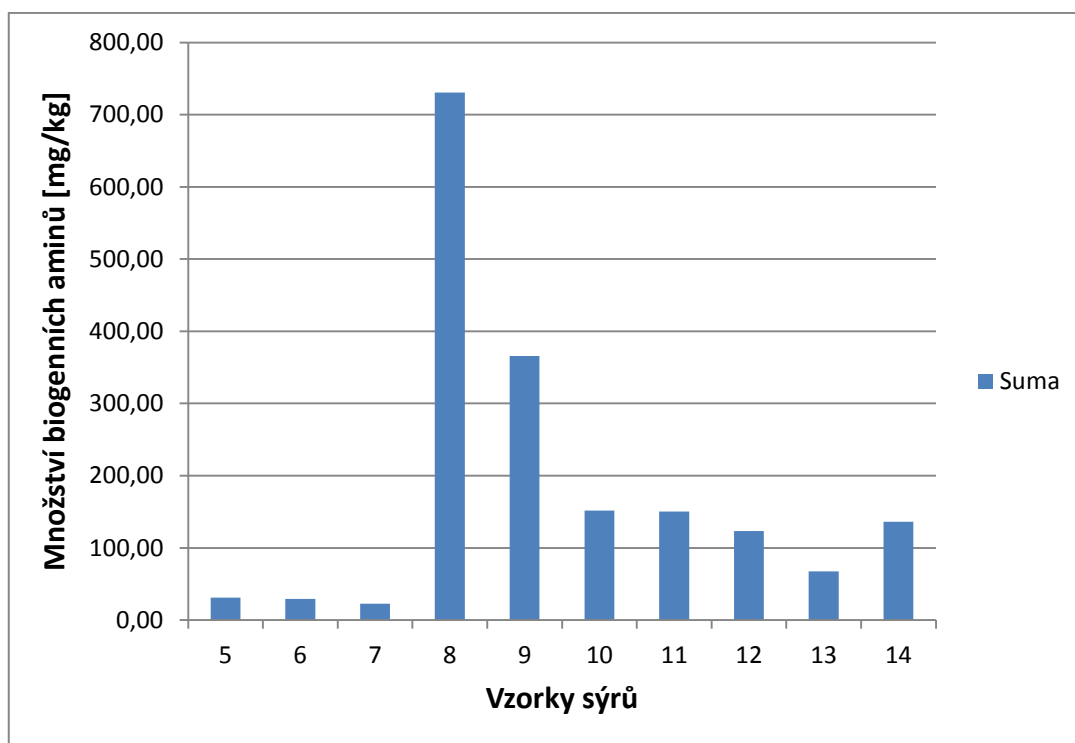
V bakalářské práci byl u testovaných sýrů zrajících pod mazem rovněž zkoumán výskyt osmi biogenních aminů – tryptaminu, fenyletylaminu, putrescinu, kadaverinu, histaminu, tyraminu, spermidinu a sperminu. Obsah jednotlivých biogenních aminů byl určen pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie.

V každém vzorku testovaných sýrů byla zjištěna přítomnost biogenních aminů, přičemž celkové množství BA kolísalo od 22,72 mg/kg až po 6064,12 mg/kg (Příloha I).

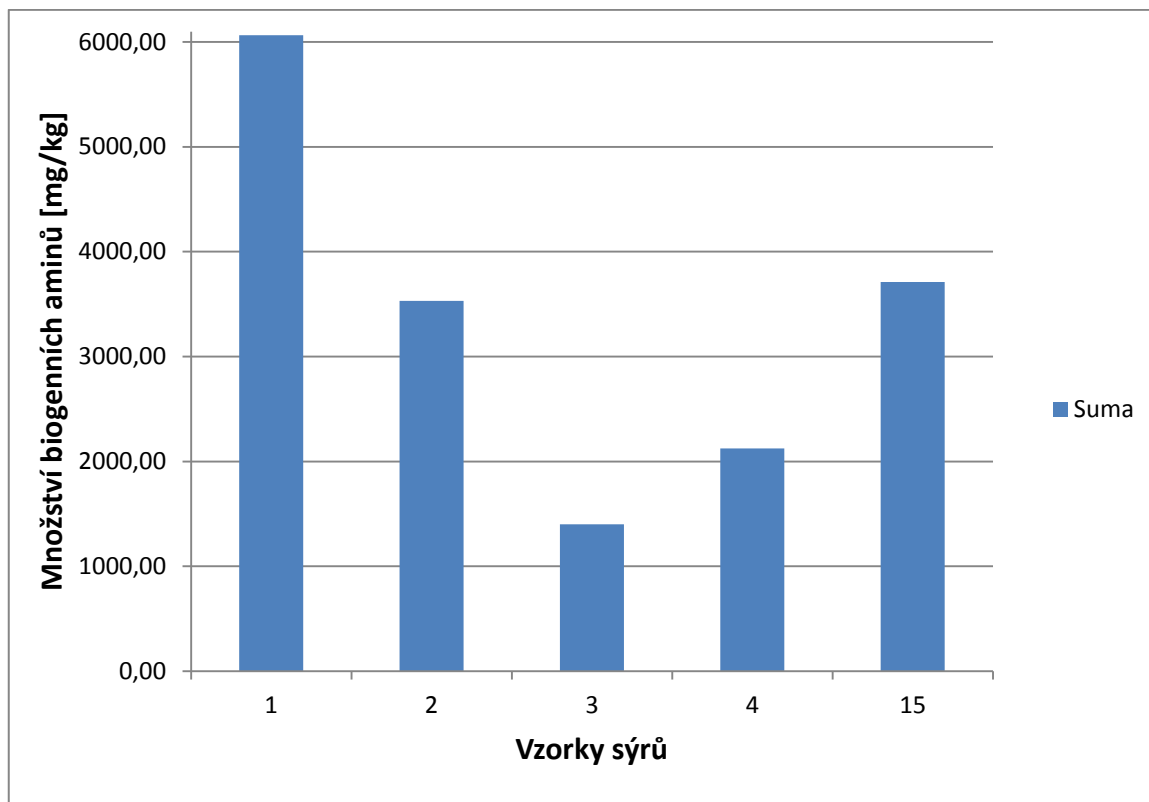
V každém vzorku sýru byl detekován určitý biogenní amin, s výjimkou tryptaminu, který nebyl nalezen u žádného z testovaných vzorků sýrů. Tyramin a spermin byly pozorovány u všech analyzovaných vzorků sýrů. Malé množství BA bylo detekováno u vzorků sýrů zrajících v chladu. Nejvíce BA se naopak vyskytovalo ve vzorcích kyselých sýrů a následně v sýrech ochucených (vzorky číslo 1, 2, 3, 4, 8, 9). U třech vzorků sýrů byly detekovány dva BA – tyramin a spermin. U pěti vzorků sýrů byly nalezeny tři BA. U tří z nich (vzorky číslo 11, 13, 14) byly detekovány BA tyramin, spermidin a spermin. U zbývajících dvou (vzorky číslo 8, 12) byl místo spermidinu kadaverin a putrescin. Více než tři BA byly detekovány u sedmi vzorků sýrů (vzorky číslo 1, 2, 3, 4, 9, 10, 15), avšak v žádném vzorku z

testovaných sýrů se nevyskytovaly všechny analyzované BA. Nejvíce bylo detekováno sedm BA, a to u vzorku sýru číslo 1.

Tryptamin nebyl detekován u žádného z testovaných vzorků sýrů (Příloha I). Množství tryptaminu v kyselých sýrech bylo dle Standartové a kol. [36] poměrně malé. Při teplotě skladování sýrů 5 °C se množství pohybovalo se v rozmezí 5 - 19 mg/kg.



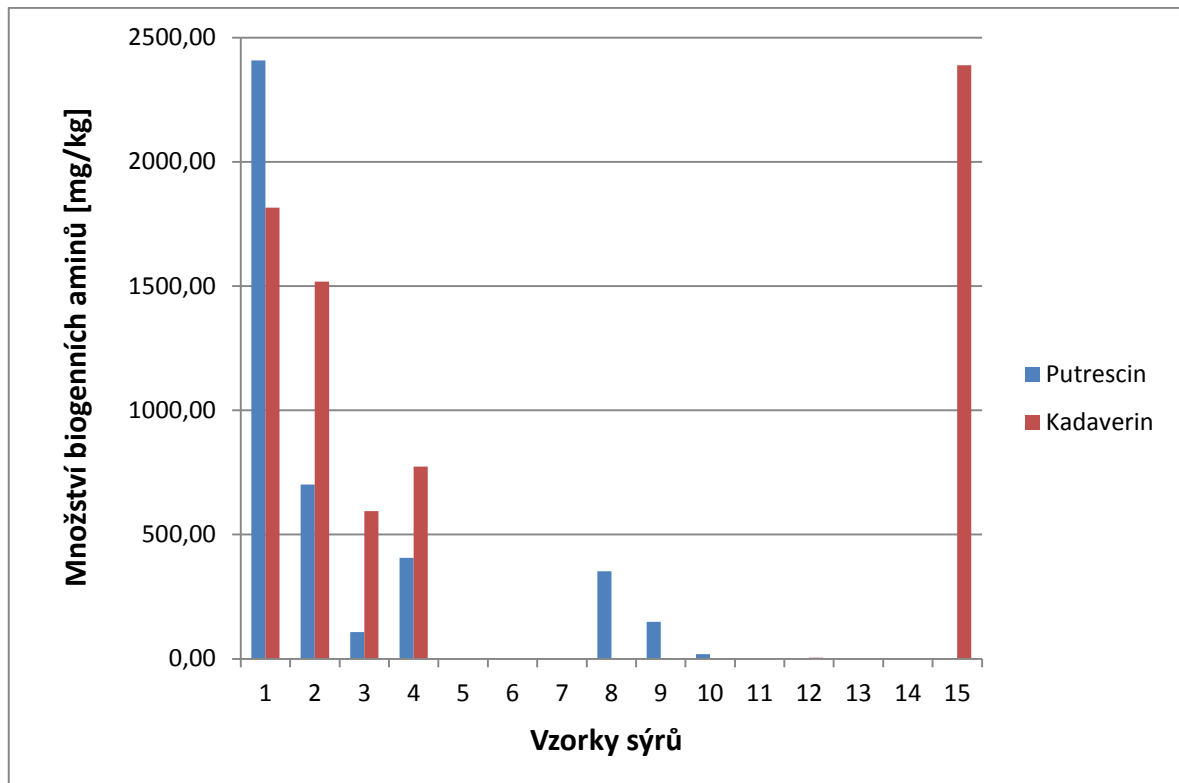
Obr. 7. Celkové množství biogenních aminů (v mg/kg) ve vzorcích sýrů, u kterých byl detekován celkový obsah biogenních aminů nižší než 1000 mg/kg



Obr. 8. Celkové množství biogenních aminů (v mg/kg) ve vzorcích sýrů, u kterých byl detekován celkový obsah biogenních aminů vyšší než 1000 mg/kg

Fenyletylamin byl nalezen u dvou vzorků sýrů (Příloha I) a to ve vzorku kyselého sýru bez příchutě, kde bylo jeho množství $11,60 \pm 0,85$ mg/kg a nezařazeném vzorku sýru typu Romadur v množství $254,84 \pm 14,55$ mg/kg. Dle Loizza a kol. [28] nebyl v sýrech zrajících pod mazem fenyletylamin detekován.

Putrescin byl nalezen u sedmi vzorků sýrů (Obr. 9, Příloha I). Nejvyšší množství ($2408,53 \pm 53,41$ mg/kg) bylo nalezeno v kyselém sýru bez příchutě. Velké množství bylo detekováno u vzorku kyselého sýru uzeného ($407,05 \pm 13,25$ mg/kg) a u kyselého sýru s příchutí česneku ($701,28 \pm 14,41$ mg/kg). Ve vzorcích sýrů zrajících v chladu a nezařazených sýrů typu Limburger a Romadur bez příchutě nebyl putrescin detekován. Dle Loizza a kol. [28] bylo množství putrescinu v SZPM 31,3 mg/kg a v kyselých sýrech 532,2 mg/kg. Pro srovnání v sýrech ementálského typu bylo množství putrescinu v rozmezí 3,9 – 38 mg/kg [28]. Dle Standarové a kol. [36] bylo množství putrescinu v kyselých sýrech při teplotě skladování 5 °C a délce skladování 4 týdny 212 mg/kg.

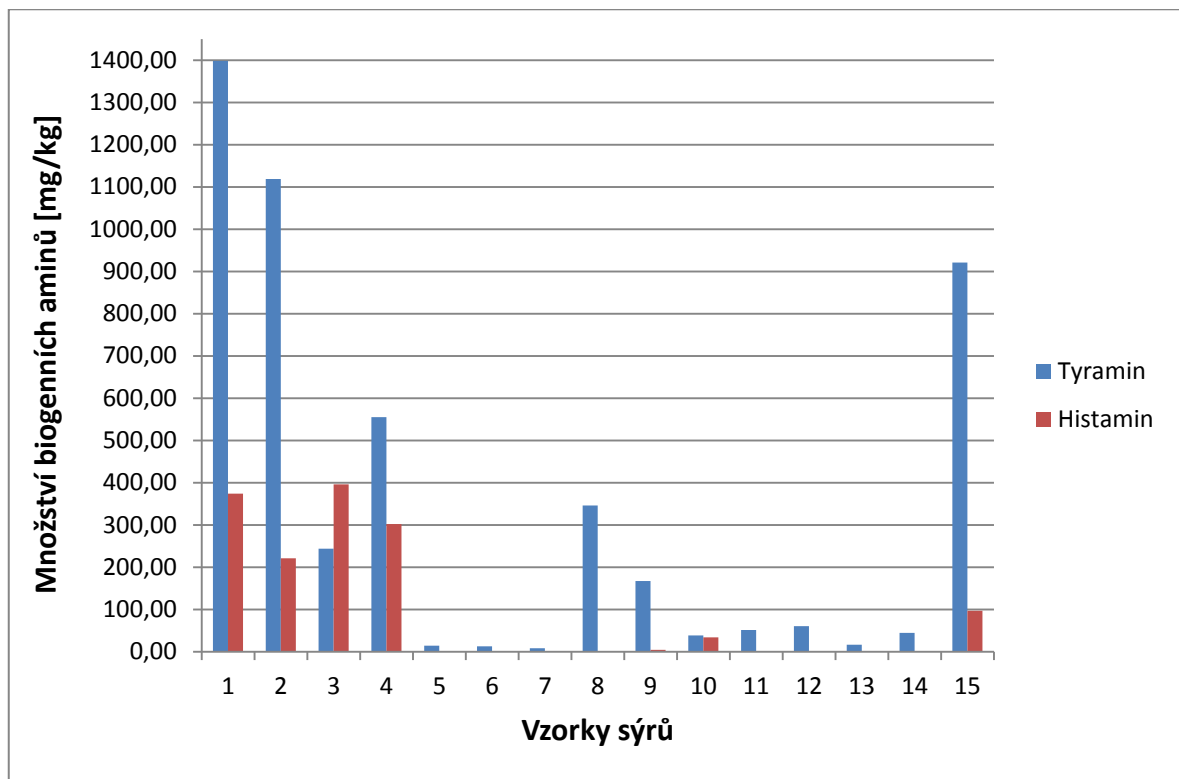


Obr. 9. Detekovaná množství putrescinu a kadaverinu (v mg/kg) v testovaných vzorcích sýrů

Kadaverin byl detekován u sedmi vzorků testovaných sýrů. Množství se pohybovalo v rozmezí $3,88 \pm 0,08$ - $2389,15 \pm 108,87$ mg/kg (Obr. 9, Příloha I). U kyselých sýrů byl obsah kadaverinu vysoký ($1816 \pm 45,93$ mg/kg, $1518 \pm 18,10$ mg/kg, $594,37 \pm 49,02$ mg/kg, $773,78 \pm 35,53$ mg/kg). Zanedbatelná množství kadaverinu byla detekována v sýrech zrajících v chladu a v nezařazených sýrech. Dle Loizza a kol. [28] byl obsah biogenních aminů v SZPM i v kyselých sýrech 748,2 mg/kg. Dle Standarové a kol. [36] bylo množství kadaverinu v kyselých sýrech při teplotě skladování 5 °C a délce skladování 4 týdny 452 mg/kg.

Tyramin byl společně se sperminem detekován ve všech analyzovaných vzorcích sýrů (Obr. 10, Příloha I). Vyskytoval se poměrně v širokém rozmezí ($7,79 \pm 0,73$ - $1398 \pm 76,97$ mg/kg). Nejvíce ho bylo nalezeno ve vzorcích kyselého sýru bez příchutě, kyselého sýru uzeného a u 15. vzorku nezařazeného sýru. Malá množství tyraminu byla naopak detekována v sýrech zrajících v chladu. Dle Loizza a kol. [24] byl obsah tyraminu v SZPM 246,7 mg/kg a v kyselých sýrech 479,7 mg/kg. Dle Standarové a kol. [36] bylo

množství tyraminu v kyselých sýrech při teplotě skladování 5 °C a délce skladování 4 týdny 217 mg/kg.

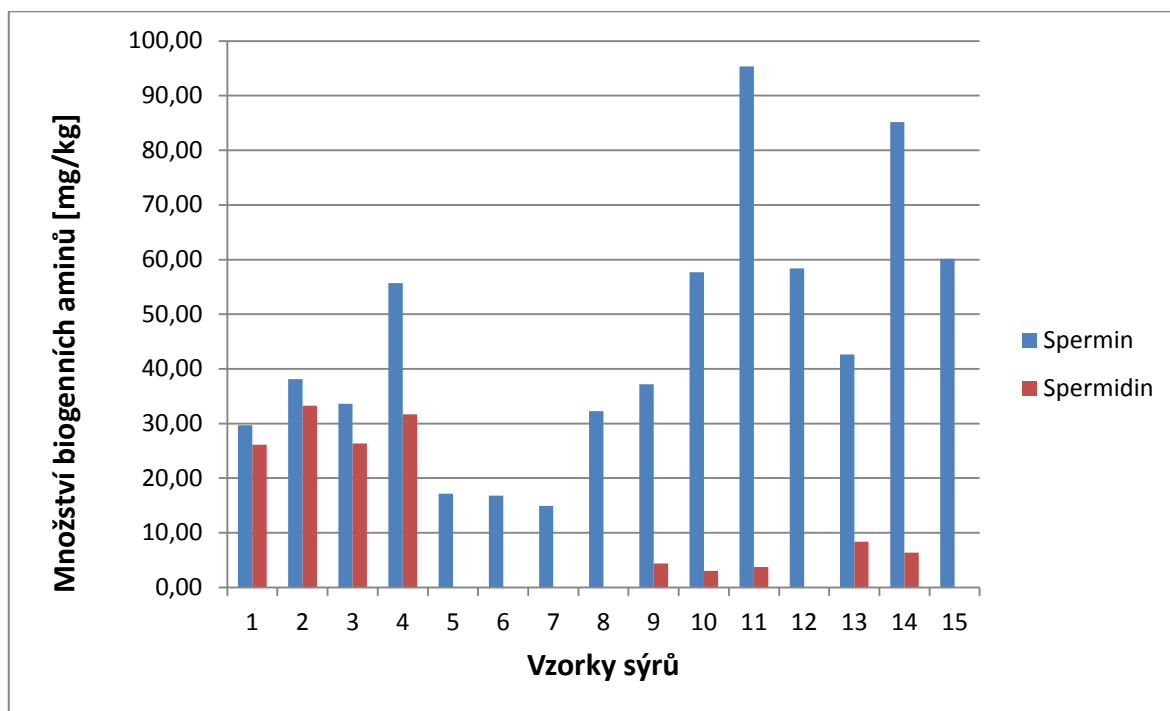


Obr. 10. Detekovaná množství tyraminu a histaminu (v mg/kg) v testovaných vzorcích sýrů

Množství histaminu se u testovaných vzorků sýrů pohybovalo v rozmezí $4,41 \pm 0,24$ - $396,06 \pm 28,21$ mg/kg (Obr. 10, Příloha I). Tento biogenní amin byl nalezen u sedmi testovaných vzorků sýrů. Nejvyšší obsah byl opět zaznamenán v kyselých sýrech. Histamin nebyl detekován v sýrech zrajících v chladu a ochucených sýrech. Z nezařazených vzorků byl detekován pouze u dvou vzorků ze šesti (vzorky číslo 10, 15). Obsah histaminu v SZPM je dle Loizza a kol. [28] 168,3 mg/kg a v kyselých sýrech 9,1 mg/kg. Dle Standarové a kol. [36] bylo množství histaminu v kyselých sýrech 216 mg/kg.

Spermin byl detekován ve všech testovaných vzorcích sýrů (Obr. 11, Příloha I). Nejvíce se vyskytoval v sýrech nezařazených typu Romadur. Ve vzorcích kyselých sýrů bylo množství ve srovnání s ostatními biogenními aminy nižší, v průměru okolo 40 mg/kg. Podobné množství jako ve vzorcích kyselých sýrů bylo zaznamenáno i u sýrů ochucených. V sýrech zrajících v chladu bylo nalezeno okolo 15 mg/kg sperminu. Dle Loizza a kol. [28] bylo množství sperminu v SZPM 18,5 mg/kg a v kyselých sýrech 16,6 mg/kg. Dle Standarové a

kol. [36] bylo množství sperminu v kyselých sýrech při teplotě skladování 5 °C a délce skladování 4 týdny 12,1 mg/kg.



Obr. 11. Detekovaná množství sperminu a spermidinu (v mg/kg) v testovaných vzorcích sýrů

Spermidin byl nalezen u devíti z patnácti vzorků analyzovaných sýrů (Obr. 11, Příloha I). Nejvíce byl obsažen ve vzorcích kyselých sýrů. Zanedbatelná množství byla nalezena u ochucených sýrů. U vzorků sýrů zrajících v chladu nebyl spermidin detekován. Ve srovnání s ostatními biogenními aminy bylo jeho množství ve vzorcích sýrů malé. Dle Loizza a kol. [28] bylo jeho množství v SZPM 16,6 mg/kg. Dle Standarové a kol. [36] bylo množství spermidinu v kyselých sýrech při teplotě skladování 5 °C a délce skladování 4 týdny 7,3 mg/kg.

Celkové množství BA by se v potravinách mělo vyskytovat dle Santose [25] do 1000 mg/kg. V naší analýze byla detekována množství biogenních aminů přesahující hodnotu 1000 mg/kg u pěti vzorků (vzorky číslo 1, 2, 3, 4, 15). Toto množství již může způsobovat zdravotní potíže, zejména u oslabených jedinců [26].

Množství tyraminu by mělo být vzhledem k jeho toxicitě dle Santose [25] v rozmezí 100 – 800 mg/kg. Tři vzorky sýrů (vzorky číslo 1, 2, 15) obsahovaly vyšší množství tyraminu, což znamená, že jejich konzumace ve zvýšeném množství může mít negativní vliv

na zdraví jedince. Nadměrné množství tyraminu může vyvolat zvracení, průjem, bolest hlavy či hypertenzi [25]. Nejvyšší detekované množství tyraminu bylo 1398 mg/kg, a to u vzorku sýru číslo 1.

Horní hranice množství histaminu by v potravinách měla být vzhledem k jeho toxicitě dle Santose [25] 100 mg/kg. V našem stanovení byla tato hodnota překročena u 4 vzorků sýrů (vzorky číslo 1, 2, 3, 4). Konzumace těchto sýrů ve větším množství může mít negativní vliv na zdraví jedince. Nadměrné množství histaminu může vyvolat, obdobně jako nadměrné množství tyraminu, zvracení, průjem, bolest hlavy či hypertenzi [25]. U ostatních vzorků byla detekovaná množství histaminu nízká nebo nulová.

V této studii bylo v SZPM detekováno velké množství BA oproti jiným druhům sýrů. Dle Loizza a kol. [28] bylo například v camembertu detekováno celkové množství BA 392 mg/kg, goudě 42 mg/kg a parmezánu 160 mg/kg. Dle Mayera a kol. [27] bylo v ementálu detekováno celkové množství BA 301 mg/kg, camembertu 357 mg/kg, goudě 49,3 mg/kg a roquefortu 100,5 mg/kg. Dle Lange a kol. bylo celkové množství BA v roquefortu vyšší než 200 mg/kg [37]. Tyto výsledky (zejména poměrně vysoká množství detekovaných BA) v analyzovaných vzorcích sýrů zrajících pod mazem mohou být dána nevelkým počtem analyzovaných vzorků testovaných sýrů. Na druhou stranu lze říci, že sortiment sýrů zrajících pod mazem, které lze zakoupit v obchodní síti v České republice, není příliš velký a tudíž získat reprezentativní počet vzorků sýrů pro analýzu je poměrně obtížné (sortiment jednotlivých typů sýrů zrajících pod mazem se v jednotlivých řetězcích v obchodní síti v ČR opakoval) a tudíž nebylo možné získat reprezentativní počet vzorků pro analýzu.

Celkový počet BA lze vztahovat k CPM, protože při vyšším CPM je větší pravděpodobnost výskytu BA. Nejméně CPM se vyskytovalo u vzorků sýrů zrajících v chladu, tím pádem u nich byla i produkce BA menší oproti ostatním vzorkům sýrů. Dále lze rovněž konstatovat, že v kyselých sýrech byl zjištěn vyšší počet enterobakterií a aminů putrescinu a kadaverinu, což může být v korelaci, protože enterobakterie (respektive hnilobné bakterie) jsou z literatury známy jako producenti BA [25]. Podíl na tvorbě BA tyraminu, histaminu, putrescinu a kadaverinu mají také bakterie mléčného kvašení [25]. Jelikož se tyto mesofilní kultury záměrně přidávají do mléka při tvorbě sýrů, jejich množství v sýrech je poměrně velké [20]. Nejvyšší množství bakterií mléčného kvašení se vyskytovalo v kyselých sýrech a v korelaci s tím i množství tyraminu, histaminu, putrescinu a kadaverinu bylo nejvyšší. Enterokoky nevykazují oproti ostatním bakteriím mléčného kvašení velkou proteolytickou

aktivitu. Nejvíce se podílejí na dekarboxylaci tyrosinu za vzniku BA tyraminu [7, 12]. Největší množství enterokoků bylo ve vzorcích kyselých sýrů a s tím i související vysoké množství tyraminu.

7 ZÁVĚR

Bakalářská práce byla zaměřena na mikrobiologickou analýzu sýrů zrajících pod mazem a monitoring výskytu biogenních aminů v těchto sýrech. Studie byla realizována u 15 vzorků sýrů, u kterých byl sledován celkový počet aerobních a fakultativně anaerobních mesofilních mikroorganismů, počet enterobakterií, enterokoků, mléčných bakterií – koků a tyčinek, kvasinek a plísní. Pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie byla u testovaných vzorků sýrů zjišťována přítomnost 8 biogenních aminů: tryptaminu, fenyletylaminu, putrescinu, kadaverinu, histaminu, tyraminu, spermidinu a sperminu.

Na základě výsledků této studie lze konstatovat:

- Celkový počet mikroorganismů byl nejvyšší u kyselých sýrů.
- U testovaných kyselých sýrů přesáhl počet enterobakterií hodnotu 10^5 KTJ/g, u ostatních testovaných sýrů byl počet enterobakterií nižší, u některých sýrů jejich přítomnost nebyla zjištěna.
- Nejméně mikroorganismů se vyskytovalo ve vzorcích nezařazených sýrů typu Romadur.
- Nejvyšší množství biogenních aminů bylo detekováno u vzorku kyselého sýru bez příchutě (6064,12 mg/kg).
- Tryptamin nebyl detekován v žádném z testovaných vzorků. Nejčastěji byla zjištěna přítomnost tyraminu a sperminu (u všech analyzovaných 15 vzorků), nejméně naopak fenyletylaminu (u 2 vzorků).
- U většiny analyzovaných vzorků sýrů byly detekovány biogenní aminy fenyletylamin, putrescin, kadaverin, histamin, tyraminu, spermidin a spermin.
- Z biogenních aminů byly u testovaných vzorků sýrů v nejvyšších koncentracích detekovány putrescin ($2408,53 \pm 53,41$ mg/kg) a kadaverin ($2389,15 \pm 108,87$ mg/kg).

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] LUKÁŠOVÁ, J. *Hygiena a technologie mléčných výrobků*. Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, 2001, s. 180. ISBN: 80-7305-415-9.
- [2] PAVELKA, A. *Mléčné výrobky pro vaše zdraví*. 1. vyd. Brno: Littera, 1996, 105 s. ISBN 80-85763-09-5.
- [3] BOCKELMANN, W., WILLEMS, K. P., NEVE, H., HELLER, K. H. *Cultures for the ripening of smear cheeses*. International Dairy Journal, 2005, vol. 15, iss. 6-9, s. 719-732.
- [4] BOCKELMANN, W. *Cheese | Smear-Ripened Cheeses*. Encyclopedia of Dairy Sciences (Second Edition), 2011, s. 753-766.
- [5] SMĚLÁ, D. a kol. *Chromatografické stanovení biogenních aminů v trvanlivých salámech během fermentace a skladování*. Chemické listy, 2004, č. 98, s. 432-437.
- [6] VELÍŠEK, J. *Chemie potravin 3*. 1. vyd. OSSIS, 1999, 368 s. ISBN 80-902-3912-9.
- [7] LOIZZO, M. R., MENICHINI, F., PICCI, N., PUOCI, F., SPIZZIRRI, G., RESTUCCIA, D. *Technological aspects and analytical determination of biogenic amines in cheese*. Trends in Food Science & Technology, 2012, s. 1-18.
- [8] *Vyhláška MZe č. 77/2003 Sb., kterou se stanoví požadavky pro mléko a mléčné výrobky, mražené krémy a jedlé tuky a oleje*. Sbírka zákonů: 2003, Částka 032, Vyhláška MZe č. 77/2003 Sb., kterou se stanoví požadavky pro mléko a mléčné výrobky, mražené krémy a jedlé tuky a oleje. *Sbírka zákonů*. 2003, Částka 032, s. 2488 – 2516.
- [9] GAJDŮŠEK, S. *Mlékařství II*. Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, 2002, s. 142. ISBN: 80-7157-342-6.
- [10] FOX, P. F., McSWEENEY, P. L. H., COGAN, T. M., GUINEE, T. P. *Cheese: chemistry, physics and mikrobiology*. 3rd ed., Amsterdam: Elsevier, 2004, s. 199-213. ISBN: 0-1226-3653-82.
- [11] IBURG, A. *Lexikon sýrů: výroba, původ, druhy, chuť*. 1. vyd. Čestlice: Rebo, 2004, 301 s. ISBN 80-723-4379-3.
- [12] ADAMS, M. R., MOSS, M. O. *Food microbiology*. Third edition. Cambridge, UK: RSC Publishing, 2008, 463 s. ISBN 08-540-4284-9.

- [13] HRABĚ, J., BŘEZINA, P., VALÁŠEK, P. *Technologie výroby potravin živočišného původu*. Vyd. 1. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2006, 180 s. ISBN 8073184052.
- [14] GÖRNER, F., VALÍK, E. *Aplikovaná mikrobiológia požívatin: princípy mikrobiológie požívatin, potravinársky významné mikroorganizmy a ich skupiny, mikrobiológia potravinárskych výrob, ochorenia mikrobiálneho povodu, ktorých zárodky sú prenášané požívatinami*. 1. vyd. Bratislava: Malé centrum, 2004, 528 s. ISBN 80-967-0649-7.
- [15] TOMÁNKOVÁ, E., RADA, V., KILLER, J. *Potravinářská mikrobiologie*. 1. vyd. Praha: Česká zemědělská univerzita v Praze, 2006, 168 s. ISBN 80-213-1583-0.
- [16] HRUBÝ, S., TUREK, B. *Mikrobiologická problematika ve výživě*. 1. vyd. Brno: Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví, 1996, 145 s. ISBN: 80-7013-232-9.
- [17] KADLEC, P., MELZUCH, K., VOLDŘICH, M. *Co byste měli vědět o výrobě potravin?: technologie potravin*. Vyd. 1. Ostrava: Key Publishing, 2009, 536 s. Monografie (Key Publishing). ISBN 978-80-7418-051-4.
- [18] JIČÍNSKÁ, E., HAVLOVÁ, J. *Patogenní mikroorganismy v mléce a mlékárenských výrobcích*. 1. vyd. Praha: ÚZPI-Ústav zemědělských a potravinářských informací, 1995, 106 s. ISBN 80-851-2047-X.
- [19] LAW, B. A., TAMIME, A. Y. *Technology of cheesemaking*. 2nd ed. Malden, MA: Blackwell, 2010, 482 s. ISBN 978-140-5182-980.
- [20] BAMFORTH, CH., W. *Food, fermentation and micro-organisms*. Ames, Iowa: Blackwell Science, 2005, 216 s. ISBN 06-320-5987-7.
- [21] WEIMER, B. *The Microscopy Facility* [online]. [cit. 2013-02-10]. Dostupné z: <http://bioweb.usu.edu/microscopy/Research.htm>
- [22] MONNET, CH., BLEICHER, A. a kol. *Assessment of the anti-listerial activity of microfloras from the surface of smear-ripened cheeses*. Food Microbiology, 2010, vol. 27, iss.2, s. 302-310.
- [23] *Listeria monocytogenes* [online]. 2007 [cit. 2013-02-10]. Dostupné z: <http://www.flickr.com/photos/ajc1/534413333/in/photostream>

- [24] New Diagnostic Tool to Tackle Diarrhoea. [online]. 2013 [cit. 2013-05-12]. Dostupné z: http://blog.rapidmicromethods.com/2013/01/new-diagnostic-tool-to-tackle-diarrhoea_16.html
- [25] SILLA SANTOS, M. H. *Biogenic amines: their importance in foods*. International Journal of Food Microbiology, 1996, vol. 29, iss. 2-3, s. 213-231.
- [26] SHALABY, A. R. *Significance of biogenic amines to food safety and human health*. Food Research International, 1996, vol. 29, iss. 7, s. 675–690.
- [27] MAYER, H. K., FIECHTER, G., FISCHER, E. *A new ultra-pressure liquid chromatography method for the determination of biogenic amines in cheese*. Journal of Chromatography A, 2010, vol. 1217, iss. 19, s. 3251-3257.
- [28] NOVELLA-RODRÍGUEZ, S., VECIANA-NOGUÉS, M. T., SALDO, J., VIDAL-CAROU, M. C. *Effects of High Hydrostatic Pressure Treatments on Biogenic Amine Contents in Goat Cheeses during Ripening*. Journal of agricultural and food chemistry, 2002, vol. 50, iss. 25, s. 7288-7292.
- [29] JOOSTEN, H., NUNEZ, M. *Prevention of histamine formation in cheese by bacteriocin-producing lactic Acid bacteria*. Applied and environmental microbiology, 1996, vol. 62, iss. 4, s. 1178-1181.
- [30] DADÁKOVÁ, E., KRÍŽEK, M., PELIKÁNOVÁ, T. *Determination of biogenic amines in foods using ultra-performance liquid chromatography (UPLC)*. Food Chemistry, 2009, vol. 116, iss. 1, s. 365-370.
- [31] ČSN 56 9609. *Pravidla správné hygienické a výrobní praxe – Mikrobiologická kritéria pro potraviny. Principy stanovení a aplikace*. Praha: Český normalizační institut, 2008. 40 s.
- [32] STRATILOVÁ JERMÁŘOVÁ, M. *Hodnocení mikrobiální kvality sýrů zrajících pod mazem dle ČSN 56 9609*. Zlín, 2011, Diplomová práce, Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta technologická.
- [33] BUŇKOVÁ, L., BUŇKA, F., DRÁB, V., KRÁČMAR, S., KUBÁŇ, V. *Effects of NaCl, lactose and availability of oxygen on tyramine production by the Enterococcus durans CCDM 53*. Eur Food Res Technol, 2012, vol. 234, iss. 6, s. 973-979.
- [34] BOCKELMANN, W. *Development of defined surface starter cultures for the ripening of smear cheeses*. International Dairy Journal, 2002, vol. 12, iss. 2-3, s. 123-131.

- [35] BUŇKOVÁ, L., DOLEŽALOVÁ, M. *Obecná mikrobiologie*. Vyd. 2. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2010, 190 s. ISBN 978-80-7318-973-0
- [36] STANDAROVÁ, E., VORLOVÁ, L., KORDIOVSKÁ, P., JANŠTOVÁ, B., DRAČKOVÁ, M., BORKOVCOVÁ, I. *Biogenic Amine Production in Olomouc Curd Cheese (Olomoucké tvarůžky) at Various Storage Conditions*. *Acta Veterinaria BRNO*, 2010, vol. 79, iss. 1, s. 147-156.
- [37] LANGE, J., THOMAS, K., WITTMANN, CH. *Comparison of a capillary electrophoresis method with highperformance liquid chromatography for the determination of biogenic amines in various food samples*. *Journal of Chromatography B*, 2002, vol. 779, iss. 2, s. 229-239.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

SZPM Sýry zrající pod mazem

MO Mikroorganismy

KNO₃ Dusičnan draselný

a_w Vodní aktivita

NaCl Chlorid sodný

RVP Relativní vlhkost prostředí

BA Biogenní aminy

CPM Celkový počet mikroorganismů

DP Diplomová práce

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1. Schéma výroby sladkých sýrů [13]	17
Obr. 2. <i>Brevibacterium linens</i> [21]	21
Obr. 3. <i>Listeria monocytogenes</i> [23]	22
Obr. 4. <i>Escherichia coli</i> [24]	22
Obr. 5. Vzorec histaminu	25
Obr. 6. Vzorec tyraminu	26
Obr. 7. Celkové množství biogenních aminů (v mg/kg) ve vzorcích sýrů, u kterých byl detekován celkový obsah biogenních aminů nižší než 1000 mg/kg	38
Obr. 8. Celkové množství biogenních aminů (v mg/kg) ve vzorcích sýrů, u kterých byl detekován celkový obsah biogenních aminů vyšší než 1000 mg/kg.....	39
Obr. 9. Detekovaná množství putrescinu a kadaverinu (v mg/kg) v testovaných vzorcích sýrů	40
Obr. 10. Detekovaná množství tyraminu a histaminu (v mg/kg) v testovaných vzorcích sýrů	41
Obr. 11. Detekovaná množství sperminu a spermidinu (v mg/kg) v testovaných vzorcích sýrů	42

SEZNAM TABULEK

Tab. 1. Obsah biogenních aminů v různých druzích sýrů [7].....	24
Tab. 2. Mikrobiologická analýza vzorků kyselých sýrů (v hodnotách KTJ/g).....	33
Tab. 3. Mikrobiologická analýza sýrů zrajících v chladu (v hodnotách KTJ/g)	34
Tab. 4. Mikrobiologická analýza ochucených sýrů (v hodnotách KTJ/g).....	35
Tab. 5. Mikrobiologická analýza nezařazených sýrů (v hodnotách KTJ/g)	36

SEZNAM PŘÍLOH

PŘÍLOHA P I: Detekovaná množství biogenních aminů v jednotlivých vzorcích sýrů

PŘÍLOHA P I: DETEKOVANÁ MNOŽSTVÍ BIOGENNÍCH AMINŮ V JEDNOTLIVÝCH VZORCÍCH SÝRŮ

Číslo vzorku sýru	Tryptamin [mg/kg]	Fenyletylamin [mg/kg]	Putrescin [mg/kg]	Kadaverin [mg/kg]	Histamin [mg/kg]	Tyramin [mg/kg]	Spermidin [mg/kg]	Spermin [mg/kg]	Suma [mg/kg]
1	0,00	11,60±0,85	2408,53±53,41	1816±45,93	373,80±11,94	1398±76,97	26,13±0,23	29,68±1,34	6064,12
2	0,00	0,00	701,28±14,41	1518±18,10	220,96±16,81	1118,91±78,34	33,27±1,74	38,12±3,19	3531,15
3	0,00	0,00	108,09±8,20	594,37±49,02	396,06±28,21	243,44±21,61	26,35±1,13	33,60±2,20	1401,92
4	0,00	0,00	407,05±13,25	773,78±35,53	302,22±22,10	554,87±17,84	31,66±1,01	55,69±1,93	2125,27
5	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	13,95±1,04	0,00	17,15±1,26	31,09
6	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	12,57±0,48	0,00	16,81±1,27	29,38
7	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	7,79±0,73	0,00	14,93±0,42	22,72
8	0,00	0,00	352,65±11,13	0,00	0,00	345,78±11,08	0,00	32,26±0,67	730,69
9	0,00	0,00	148,53±11,39	3,88±0,08	4,41±0,24	167,43±10,21	4,37±0,22	37,20±2,35	365,81
10	0,00	0,00	18,73±1,29	0,00	34,05±0,83	38,00±1,04	3,04±0,11	57,66±0,73	151,48
11	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	51,01±4,54	3,76±0,30	95,37±4,79	150,13
12	0,00	0,00	0,00	4,50±0,34	0,00	60,35±2,80	0,00	58,40±3,33	123,25
13	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	16,26±0,99	8,40±0,32	42,62±1,62	67,28
14	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	44,41±1,16	6,39±0,23	85,13±1,89	135,93
15	0,00	254,84±14,55	0,00	2389,15±108,87	96,73±4,49	920,68±24,80	0,00	60,17±4,02	3712,57