

Produkce biogenních aminů mikroorganismy izolovanými během procesu výroby tvarohů

Bc. Vlasta Flíčková

Diplomová práce
2014



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav analýzy a chemie potravin
akademický rok: 2013/2014

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Vlasta Flíčková**
Osobní číslo: **T12539**
Studijní program: **N2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Technologie, hygiena a ekonomika výroby potravin**
Forma studia: **kombinovaná**

Téma práce: **Produkce biogenních aminů mikroorganismy izolovanými během procesu výroby tvarohů**

Zásady pro vypracování:

I. Teoretická část

1. Proces výroby tvarohů
2. Charakteristika mikroorganismů vyskytujících se v tvarohu.
3. Biogenní aminy – výskyt v potravinách, význam, faktory ovlivňující produkci.

II. Praktická část

1. Chromatografické stanovení produkce biogenních aminů mikroorganismy izolovanými z provozu během výroby tvarohů.
2. Vyhodnocení a zpracování výsledků.
3. Diskuze a formulace závěrů.

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

LINARES, D.M., MARTÍN, M.C., LADERO, V., ALVAREZ, M.A., FERNÁNDEZ, M. Biogenic Amines in Dairy Products. Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 2011, 51, 691-703.

HALÁSZ, A., BARÁTH, Á, SIMON-SARKADI, L. AND HOLZAPFEL, W. Biogenic amines and their production by microorganisms in food. Trends in Food Science and Technology. 1994, 5, 42-49.

SILLA-SANTOS, M. H. Biogenic amines: their importance in foods. International Journal of Food Microbiology. 1996, 29, 213-231.

BUŇKOVÁ, L., ADAMCOVÁ, G., HUDCOVÁ, K., VELICHOVÁ, H., PACHLOVÁ, V., LORENCOVÁ, E., BUŇKA, F. Monitoring of biogenic amines in cheeses manufactured at small-scale farms in fermented dairy products in the Czech Republic. Food Chemistry. 2013, 141, 548-551

VELÍŠEK, J. Chemie potravin III. Tábor: OSSIS, 1999. ISBN 80-902391-5-3.

Vedoucí diplomové práce:

doc. RNDr. Leona Buňková, Ph.D.

Ústav inženýrství ochrany životního prostředí

Datum zadání diplomové práce:

10. února 2014

Termín odevzdání diplomové práce:

2. května 2014

Ve Zlíně dne 11. února 2014

doc. Ing. Roman Čermák, Ph.D.

děkan



Ing. Jiří Mlček, Ph.D.

ředitel ústavu

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

- beru na vědomí, že odevzdáním diplomové 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 práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému dostupná k nahlédnutí, že jeden výtisk diplomové práce bude uložen na příslušném ústavu Fakulty technologické UTB ve Zlíně a jeden výtisk bude uložen u vedoucího práce;
- byla jsem seznámena s tím, že na moji diplomovou 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 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 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 práce využít ke komerčním účelům;
- beru na vědomí, že pokud je výstupem diplomové 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

.....

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

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

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

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

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

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

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

(1) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení mají za obvyklých podmínek právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla (§ 35 odst. 3). Odpírá-li autor takového díla udělit svolení bez vážného důvodu, mohou se tyto osoby domáhat nahrazení chybějícího projevu jeho vůle u soudu. Ustanovení § 35 odst. 3 zůstává nedotčeno.

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

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

ABSTRAKT

Diplomová práce byla zaměřena na produkci biogenních aminů mikroorganismy izolovanými během jednotlivých fází výroby tvarohu. Jednotlivé části práce se věnují popisu surovin pro výrobu tvarohu a jeho výrobě. Dále je zde popsána charakteristika a vlastnosti biogenních aminů, jejich výskyt v potravinách a působení na lidský organizmus. Produkce biogenních aminů byla u 155 mikroorganismů izolovaných během výroby tvarohu detekována pomocí vysoce účinné kapalinové chromatografie. U mikroorganismů izolovaných ze všech fází výroby tvarohu byla zjištěna především produkce tyraminu a sperminu. Spermidin byl stanoven pouze u 4 ze 155 zkoumaných izolátů, jeho obsah byl do 2,0 mg/l. Celková produkce biogenních aminů v analyzovaných mikrobiálních izolátech dosáhla maximální hodnoty 1971,9 mg/l.

Klíčová slova: biogenní aminy, mikroorganismy, tvaroh, vysoce účinná kapalinová chromatografie

ABSTRACT

The present diploma thesis focuses on the production of biogenic amines by microorganisms which were isolated in different stages of the quark production. The thesis is divided into several parts describing ingredients for the production of the quark and the quark production itself. Moreover, characteristics and properties of biogenic amines, their occurrence in food and their impact on the human organism are described. Production of biogenic amines was determined by 155 microorganisms isolated during the quark production using the high-performance liquid chromatography. Especially the tyramine and spermine production were detected in microorganisms which were isolated in all stages of the quark production. Spermidine was detected only in 4 from 155 analysed isolates in the volume of 2.0 mg/l. The total production of biogenic amines in analysed microbial isolates reached the maximum value of 1971.9 mg/l.

Keywords: biogenic amines, microorganism, quark, high performance liquid chromatography

Ráda bych poděkovala vedoucí mé diplomové práce doc. RNDr. Leoně Buňkové, Ph.D. za řadu podnětných konzultací, cenné rady a ochotu při zpracování mé diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat Ing. Khatantuul Purevdorj a Ing. Ludmile Zálešákové za pomoc v laboratořích.

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

OBSAH

ÚVOD.....	10
I. TEORETICKÁ ČÁST.....	11
1 PROCES VÝROBY TVAROHŮ.....	12
1.1 SUROVINY PRO VÝROBU TVAROHU.....	12
1.1.1 Mléko.....	12
1.1.2 Syřidlo k výrobě tvarohu.....	13
1.1.3 Čisté mlékařské kultury pro výrobu tvarohu.....	13
1.2 TVAROH.....	14
1.3 TECHNOLOGIE VÝROBY TVAROHU.....	15
1.3.1 Tradiční výroba tvarohu – diskontinuální technologie.....	15
1.3.2 Výroba odstředivkovým způsobem – kontinuální technologie.....	15
1.3.3 Výroba termotvarohu.....	17
1.4 TVAROH JAKO SUROVINA.....	17
2 CHARAKTERISTIKA MIKROORGANIZMŮ VYSKYTUJÍCÍCH SE V TVAROHU.....	18
2.1 BAKTERIE MLÉČNÉHO KVAŠENÍ.....	18
2.1.1 Rod <i>Lactococcus</i>	19
2.1.2 Rod <i>Leuconostoc</i>	20
2.2 ČISTÉ MLÉKAŘSKÉ KULTURY.....	21
2.3 KONTAMINANTY.....	22
3 BIOGENNÍ AMINY.....	23
3.1 VÝZNAM BIOGENNÍCH AMINŮ A JEJICH ČLENĚNÍ.....	23
3.2 DEKARBOXYLÁZOVÁ AKTIVITA A VZNIK BIOGENNÍCH AMINŮ.....	24
3.3 VÝSKYT BIOGENNÍCH AMINŮ V POTRAVINÁCH.....	27
3.4 PŮSOBENÍ BIOGENNÍCH AMINŮ NA LIDSKÉ ZDRAVÍ.....	28
3.5 FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ PRODUKCI BIOGENNÍCH AMINŮ.....	28
3.6 METODY STANOVENÍ BIOGENNÍCH AMINŮ.....	29
3.6.1 Vysoce účinná kapalinová chromatografie.....	30
3.6.2 Tenkovrstvá chromatografie.....	31
3.6.3 Plynová chromatografie.....	31
3.6.4 Kapilární elektroforéza.....	31
II. PRAKTICKÁ ČÁST.....	32
4 CÍL PRÁCE.....	33
5 MATERIÁL A METODY.....	34
5.1 CHARAKTERISTIKA VZORKŮ Z VÝROBY TVAROHU.....	34
5.2 IZOLÁTY MIKROORGANIZMŮ.....	35
5.3 PŘÍPRAVA VZORKŮ PRO STANOVENÍ BIOGENNÍCH AMINŮ.....	41
5.3.1 Kultivační média.....	41
5.3.2 Příprava vzorků na derivatizaci.....	43
5.3.3 Derivatizace.....	44

5.4	CHROMATOGRAFICKÉ STANOVENÍ BIOGENNÍCH AMINŮ	44
6	VÝSLEDKY A DISKUZE	46
6.1	PRODUKCE BIOGENNÍCH AMINŮ MIKROORGANIZMY IZOLOVANÝMI Z TVAROHŮ SKUPINY I.....	46
6.1.1	Mikroorganizmy izolované z fáze výroby A, B, C	46
6.1.2	Mikroorganizmy izolované z fáze výroby D	49
6.1.3	Mikroorganizmy izolované z fáze výroby E.....	50
6.1.4	Mikroorganizmy izolované z fáze výroby F	52
6.1.5	Mikroorganizmy izolované z fáze výroby G	53
6.2	PRODUKCE BIOGENNÍCH AMINŮ MIKROORGANIZMY IZOLOVANÝMI Z TVAROHŮ SKUPINY II	57
6.2.1	Mikroorganizmy izolované z fází výroby A, B, C.....	57
6.2.2	Mikroorganizmy izolované z fáze výroby D	59
6.2.3	Mikroorganizmy izolované z fáze výroby E.....	60
6.2.4	Mikroorganizmy izolované z fáze výroby F	62
6.2.5	Mikroorganizmy izolované z fáze výroby G	63
6.3	DISKUZE.....	66
	ZÁVĚR	70
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	71
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....	78
	SEZNAM OBRÁZKŮ	79
	SEZNAM TABULEK.....	81
	SEZNAM PŘÍLOH.....	82

ÚVOD

Tvaroh představuje tradiční produkt, který člověk poznal již před 8000 lety. Tvarohy nejsou považovány za specifický výrobek, ale jsou řazeny k čerstvým sýrům s převahou kyselého srážení.

Biogenní aminy (BA) tvoří skupinu nízkomolekulárních dusíkatých sloučenin, které mají významné fyziologické, ale také toxické účinky. BA vznikají během metabolických procesů v živých buňkách, nebo z aminokyselin působením bakteriálních dekarboxyláz. Běžně jsou biogenní aminy obsaženy ve fermentovaných produktech.

Obecně je při výrobě potravin a nápojů kladen velký důraz na kvalitu a zdravotní nezávadnost produktu. Ke kontaminaci potravin a nápojů může dojít během technologického procesu výroby nebo při špatném skladování produktu. Nejnovější trendy v oblasti bezpečnosti potravin podmiňují zkoumání látek vyskytujících se v potravinách, které mohou ovlivnit zdraví člověka. Mezi tyto látky řadíme právě biogenní aminy.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 PROCES VÝROBY TVAROHŮ

Tvarohy mohou být konečným produktem a také surovinou pro další zpracování, jako například použití průmyslového tvarohu pro výrobu olomouckých tvarůžků. Na výslednou konzistenci tvarohu mají významný vliv použité suroviny pro výrobu tvarohu a způsob technologie výroby, která nám ovlivňuje i trvanlivost produktu. Tvarohy jsou vyráběny s různou tučností, která je stanovena vyhláškou č. 77/2003 Sb [1].

1.1 Suroviny pro výrobu tvarohu

Základními surovinami pro výrobu tvarohu jsou mléko, u kterého nejprve probíhá tepelné ošetření, dále je zapotřebí syřidlo a čisté mlékařské kultury.

Při výrobě tvarohu se výjimečně přidává CaCl_2 , v dávce max. 5 až 10 g CaCl_2 na 100 l mléka. Cílem je zlepšení syřitelnosti a lepší oddělení tvarohoviny od syrovátky podporou syneréze. [2], [3]

1.1.1 Mléko

Mléko je tekutý sekret mléčné žlázy samic savců, jehož primární a přirozenou funkcí je zabezpečit výživu narozeného mláděte. [4] Jedná se o komplexní potravinu obsahující všechny nutričně významné látky. [5], [6]

V našich podmínkách se pro průmyslové zpracování a lidskou výživu využívá především mléko kravské, v menší míře mléko kozí, ovčí a buvolí. [5]

Mléko je bílá až lehce nažloutlá neprůhledná tekutina s příznačnou vůní a nasládlou chutí. Chemické složení kravského mléka ovlivňují nejrůznější činitelé, mezi které patří plemeno a genetický potenciál dojnice, zdravotní stav, výživa, pořadí a fáze laktace. Průměrné složení kravského mléka uvedeno v hmotnostních procentech [4]:

- Voda 86 – 88 %
- Sušina 12 – 14 %
- Dusíkaté látky (hrubá bílkovina) 3,1 – 3,8 %
- Tuk 3,5 – 5,5 %
- Sacharidy 4,5 – 5,5 %

Dále minerální látky, vitaminy, enzymy, hormony, plyny. Mléko představuje polydisperzní systém. Mléčný tuk je přítomen ve formě emulze v tzv. mléčné plazmě. Hlavní mléčná bílkovina, kasein, je přítomna ve formě koloidní disperze v tzv. mléčném séru, které obsahuje koloidní roztok sérových bílkovin a pravý roztok laktózy, minerálních látek a dalších složek. [5], [6]

Hodnota pH kravského mléka se obvykle pohybuje v intervalu 6,5 – 6,7. [4] Při výrobě tvarohů lze nízkou kyselost mléka zvýšit přidávkem smetanového zákysu, přičemž jeho dávka 0,5 % zvýší titrační kyselost o 0,2 SH a pH se sníží o 0,03 – 0,04. Při použití vepřového pepsinu se mléko předkysává až do titrační kyselosti 7,5 – 8 SH, tj. pro odstředěné mléko do hodnoty pH 6,3 – 6,4. Při zaočkování 0,8 – 1 % smetanového mezofilního zákysu při teplotě 28 °C postačuje doba 1 – 2 hodiny v mléce s dobrou kysací schopností. [3]

1.1.2 Syřidlo k výrobě tvarohu

Pro syřitelnost mléka (schopnost enzymového srážení mléka) je nutná přítomnost vápenatých iontů a je rovněž ovlivněna genotypem dojnice. Při výrobě klasického tvarohu a výrobě tvarohu odstředováním se u nás používá převážně pepsin. [5]

Pro předkysání se dávkuje na 1000 l odstředěného mléka k výrobě tvarohu 80 – 100 ml tekutého vepřového pepsinu o aktivitě 10 000 pepsinových jednotek. Při výrobě klasického tvarohu se používalo chymozinové syřidlo v dávce 20 ml na 100 l mléka. [3]

1.1.3 Čisté mlékařské kultury pro výrobu tvarohu

Použití mlékařských kultur při výrobě tvarohu má více významů. Hlavním účelem použití je úprava kyselosti mléka před sýřením a tvorba mléčné kyseliny spolu s aromatickými chuťovými látkami. Další význam použití mlékařských kultur pro výrobu tvarohu je snížení pH, což má do jisté míry i konzervační účinek, který brání v rozvoji hnilobných bakterií. [3]

Pro výrobu měkkého tvarohu odstředivkovým způsobem se jako základní směs používá směsná smetanová kultura, která obsahuje z mezofilních koků rody *Lactococcus* a *Leuconostoc*. Na kvalitě čistých mlékařských kultur závisí nejen průběh technologie, ale především kvalita finálního výrobku. [5], [6]

1.2 Tvaroh

Tvaroh můžeme definovat podle vyhlášky č. 77/2003 Sb. jako nezrající sýr získaný kyselým srážením, které převládá nad srážením pomocí syřidla [1]. Řadíme ho do skupiny „kyselých sýrů“, což znamená, že podstatou srážení mléčných bílkovin je změna pH způsobená rozkladem laktózy sacharolytickými mikroorganismy použité kultury. [2], [7]

Tvaroh je sraženina vyrobená z plnotučného, částečně odstředěného nebo odstředěného mléka, zbavená podstatné části vody, resp. syrovátky. Tvarohy jsou vyráběny s různou tučností. Měkký a průmyslový tvaroh se vyrábí z odstředěného mléka. V tradiční výrobě se tučný tvaroh vyrábí z mléka s upravenou tučností a při výrobě odstředovacím způsobem dodatečným přídavkem smetany k odstředěnému tvarohu z odstředěného mléka. Vstupní hodnoty tučnosti pro směšování odstředěného mléka, mléka s upravenou tučností nebo smetany jsou získány z kontinuálního měření tučnosti smetany gravimetricky. Přehled rozdělení tvarohů podle konzistence a obsahu tuku v sušině je uveden v Tab. 1. [3]

Finální výrobek má mít čistou mírně kyselou chuť. Trvanlivost je poměrně omezená a rozdílná pro jednotlivé skupiny tvarohů, které jsou uvedeny v Tab. 2. Dlouhodobější trvanlivost mají pouze termizované tvarohy. Při skladování dochází po čase k uvolňování syrovátky, vytváří se krupičkovitá struktura, mění se chuť tvarohu z mírně kyselé na kyselou až hořkou chuť. [1], [8]

Tab. 1 Klasifikace tvarohu podle konzistence a obsahu tuku v sušině [1].

Tvaroh	Tuk v sušině (v % hmot.)
Tučný	více než 38,0 včetně
Polotučný	25,0 až 15,0
Nízkotučný nebo jemný	méně než 15,0 včetně
Odtučněný nebo měkký nebo tvrdý	méně než 5,0 včetně

Tab. 2 Členění tvarohů na druhy, skupiny a podskupiny [1].

Druh	Skupina	Podskupina
Tvaroh	měkký nebo odtučněný nízkotučný nebo jemný polotučný tučný	termizovaný
	tvrdý nebo na strouhání nebo ke strouhání	

1.3 Technologie výroby tvarohu

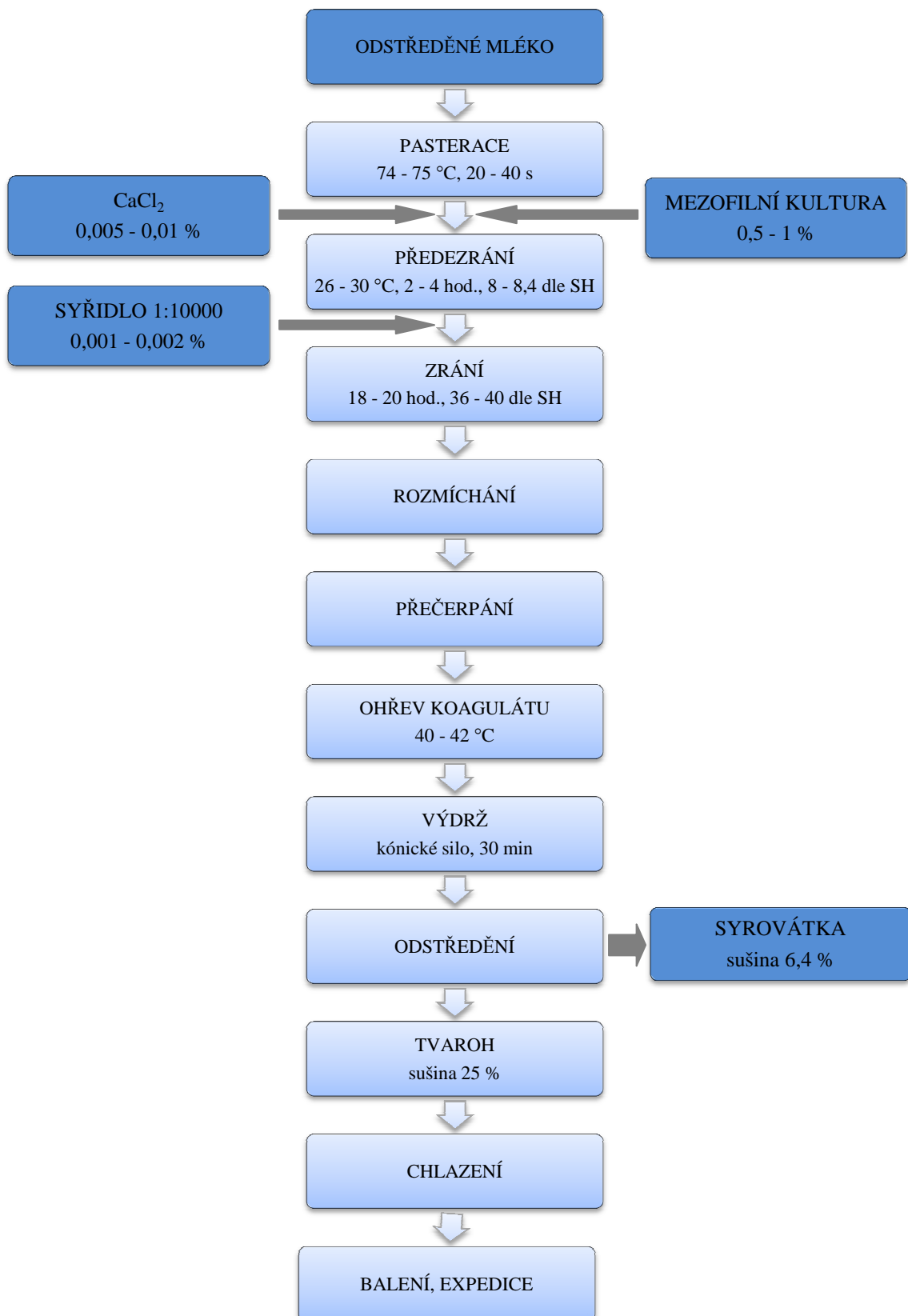
Podle způsobu zpracování tvarohoviny můžeme technologii výroby tvarohu rozdělit na tradiční výrobu (diskontinuální technologie), tvarohy vyráběné odstředivkovým způsobem (kontinuální technologie) a výroba termotvarohu. [3], [6], [9]

1.3.1 Tradiční výroba tvarohu – diskontinuální technologie

Pro tradiční výrobu tvarohu se používá vysoká pasterace mléka při teplotě 85 °C po dobu 12 až 20 sekund. Při pasteraci se zničí maximální podíl vegetativních forem mikroorganismů a zároveň dochází ke zvýšené denaturaci bílkovin syrovátky, které zvyšují vaznost vody. Odstředěné mléko se po pasteraci sráží v tvarohářských vanách zaočkováním 0,5 – 1 % mezofilního zákysu a malým přídatkem syřidla. Po fermentaci se tvarohovina pokrájí a vypouští do tvarohových pytlů – tvarožníků. Jejich překládáním se dosáhne po odkapání syrovátky požadované sušiny (u měkkého tvarohu 25 %). Tvaroh vyrobený tradičním způsobem se balí do hliníkové fólie s vnitřní pergamenovou vrstvou nebo se expeduje v obalech pro velkoodběratele k dalšímu zpracování. [6]

1.3.2 Výroba odstředivkovým způsobem – kontinuální technologie

Při výrobě tvarohu odstředivkovým způsobem se používá šetrná pasterace mléka při teplotě 74 – 75 °C, 15 – 25 s. Přímým odstředěním tvarohového koagulátu se vyrábí tvaroh o sušině 20 %. Pro zvýšení sušiny o 5 % je třeba dolisovat tvaroh na lisovacím zařízení nebo zajistit ohřev koagulátu před odstředěním. Postup je schematicky znázorněn na Obr. 1. [3]



Obr. 1 Schéma výroby tvarohu odstředivkovým způsobem (upraveno podle Kadlec [6]).

1.3.3 Výroba termotvarohu

Tvaroh z vysoko pasterovaného mléka lépe váže vodu a má vyšší nutriční hodnotu. Toho se používá při pasteraci mléka pro výrobu termotvarohu, kde je pasterace zvýšena na 82 °C až 92 °C po dobu 5 – 6 minut. Cílem tohoto ošetření je denaturace syrovátkových bílkovin, jejich vazba na kasein a následné vysrážení společně s kaseinem. Tím je dosaženo vyšší výtěžnosti. Mléko se obdobně jako u předchozích způsobů výroby zaočkuje čistými mlékařskými kulturami a přidá se syřidlo. Před odstředováním probíhá termizace při teplotě 60 °C po dobu 4 minut, která zaručí delší trvanlivost výrobků (cca 21 dní). Při výrobě termotvarohu se používají termofilní kultury a smetanový zákys. Při výrobě termotvarohu dochází k zachycení až 50 % syrovátkových bílkovin, které lépe vážou vodu a tím dochází ke zvýšení výtěžnosti. Termotvaroh má dobrou vaznost vody při nižších teplotách, tudíž není vhodný jako náplň do pečiva. Sušina termotvarohu je nižší (17 %), je proto vhodnější na pomazánky, ovocné dezerty apod. [6]

1.4 Tvaroh jako surovina

Tvaroh se také využívá jako surovina pro další výrobky – smetanové krémy, termixy, tvarohové speciality se zeleninou, tvarůžky i jako součást receptury tavených sýrů. Smetanové krémy jsou vyráběny pod různými názvy, jako Lipánek či Pribináček. Jsou to nejrozšířenější tvarohové speciality pro děti. Nejčastěji se vyrábějí s příchutí vanilkovou, čokoládovou a ovocnou. [9]

Při výrobě termixů se tvaroh společně s ostatními přísadami (máslo, cukr, stabilizátor, přísady, aroma, barva) míchají za sníženého tlaku s ohřevem na 65 – 70 °C. Vychlazená směs se promísí v hnětači, šlehání dusíku zjemňuje konzistenci, prodloužení trvanlivosti se dosahuje termizací směsi. [6]

Tvarůžky jsou jediným kyselým sýrem vyráběným z tvarohu o sušině 32 %. Tvaroh se nasolí, plní do beček, udusá a zraje několik týdnů. Pak se uzrálý tvaroh smíchá s čerstvým, přidá se jedlá soda či CaCO₃. Hmota se promíchá a sekají se z ní tyčinky či věnečky. V kyselém prostředí na povrchu dochází k růstu nepravých kvasinek (*Torulopsis*, *Candida*, *Oospora*), které rozloží kyselinu mléčnou. Následně se tvarůžky operou v pračce a do vody se přidá mazová kultura (*Brevibacterium linens*, mikrokoky). Proběhne vlastní zrání, na povrchu vzniká maz, sýr zraje od povrchu do středu. [10]

2 CHARAKTERISTIKA MIKROORGANISMŮ VYSKYTUJÍCÍCH SE V TVAROHU

Mikroorganismy, které produkují biogenní aminy, mohou být v produktu přirozeně přítomné, jako kontaminující mikroflóra nebo mohou být vnesené do potraviny během technologického zpracování jako startovací kultury. Mikroorganismy tedy významně ovlivňují tvorbu biogenních aminů během výroby potravin. [11], [12]

2.1 Bakterie mléčného kvašení

Bakterie mléčného kvašení (BMK) tvoří velkou přirozenou skupinu nepohyblivých nesporulujících fakultativně anaerobních až mikroaerofilních grampozitivních koků a tyčinek, které fermentují sacharidy a tvoří přitom hlavně kyselinu mléčnou. [5]

Základní funkce bakterií mléčného kvašení, používaných při zpracování mléka, jsou technologické a sensorické. Tyto funkce jsou spojeny především s produkcí kyseliny mléčné, vzniku sensoricky významných složek (diacetyl, acetaldehyd, volné těkavé mastné kyseliny apod.), rozkladem bílkovin a potlačováním patogenních a technologicky nežádoucích mikrobiálních druhů. [13] Ze skupiny BMK jsou vybrány mikroorganismy, které jsou záměrně přidávány do mléka nebo smetany, jejichž cílem je vyvolat změny ve vzhledu, konzistenci, obsahu a chuti daného mléčného výrobku. [9]

Bakterie mléčného kvašení jsou tolerantní ke kyselému i alkalickému prostředí, jsou slabě proteolytické a lipolytické, vyžadují přítomnost volných aminokyselin, zdroj dusíku a vitaminy. [14]

BMK je možno rozdělit do všeobecných kategorií podle konečných produktů jejich metabolismu. Rody *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Lactococcus* a *Enterococcus* mají pouze anaerobní katabolický metabolismus a tvoří kyselinu mléčnou jako téměř jediný produkt metabolismu cukrů. Proto se zařazují mezi homofermentativní mléčné bakterie. Rod *Leuconostoc* zkvašuje sacharidy na kyselinu mléčnou, etanol a CO₂, proto patří mezi heterofermentativní mléčné bakterie. Tvoří kulovité až čočkovité buňky spojené po dvou nebo do řetízků. Mezi technologicky nejdůležitější mezofilní bakterie mléčného kvašení patří *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis*, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum*, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris*. [13]

2.1.1 Rod *Lactococcus*

Rod *Lactococcus* má buňky sférické nebo ovoidní, vyskytující se po dvou a v krátkých řetízcích. Rod se řadí mezi grampozitivní, nesporeující, nepohyblivé, fakultativně anaerobní koky. [15]

V mlékárenském průmyslu je nejrozšířenější *Lactococcus lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* (Obr. 2) a *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* jsou součástí mikroflóry základních smetanových kultur, které tvoří převážně kyselinu mléčnou. [3] Některé kmeny *Lactococcus lactis* produkují bakteriocin nizin, který inhibuje rozvoj řady grampozitivních bakterií. Tento bakteriocin se také používá při konzervaci potravin. [13]

Lactococcus lactis subsp. *lactis* je neodmyslitelnou součástí používaných čistých mlékařských kultur používaný na výrobu mléčných výrobků. Roste v rozmezí teplot 10 až 40 °C, přičemž optimální tvorba kyseliny mléčné je při 30 °C a je schopný růstu i v přítomnosti 4 % NaCl. [16]

Lactococcus lactis subsp. *cremoris* (Obr. 2) má některé charakteristické vlastnosti, kterými se liší od *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. Má nižší optimální teplotu, a to 28 °C, tvoří měřitelná množství CO₂, laktózu fermentuje pomaleji. Morfologicky se vyznačuje zpravidla většími buňkami a tvorbou dlouhých řetízků. Patří mezi homofermentativní bakterie mléčného kvašení, přičemž hlavním produktem je kyselina mléčná. [16]



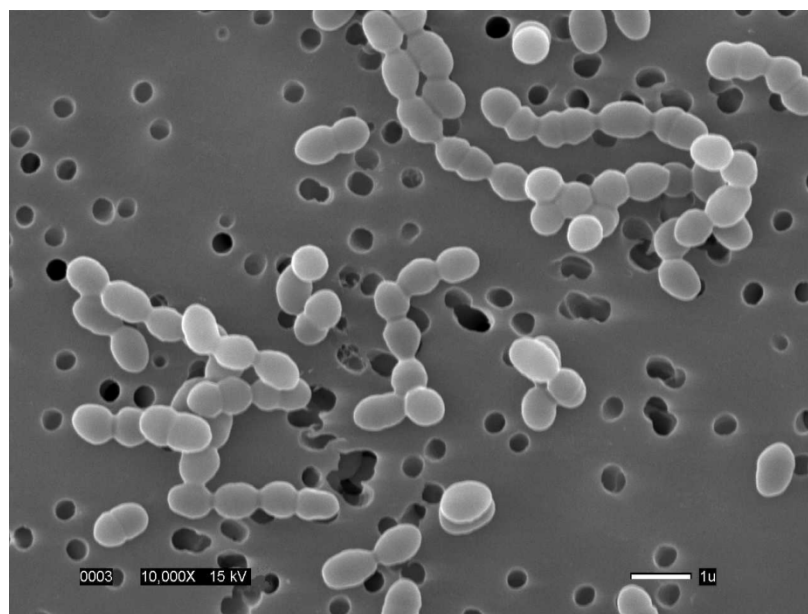
Obr. 2 *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* [17].

2.1.2 Rod *Leuconostoc*

Bakterie z rodu *Leuconostoc* patří do čeledi *Streptococcaceae*. Jsou to grampozitivní koky, nepohyblivé, netvořící spory. Jsou fakultativně anaerobní, kataláza negativní. Tvoří zpravidla drobné, okrouhlé, hladké a šedobílé kolonie na vhodných živných půdách. V bujónové kultuře způsobují pravidelný zákal. Některé kmeny tvořící dlouhé řetízky se usazují na dně zkumavky. Rod *Leuconostoc* patří mezi heterofermentativní mléčné bakterie, jelikož zkvašuje sacharidy na kyselinu mléčnou, etanol a CO₂. [13] Optimální teplota růstu se pohybuje v rozmezí 20 až 30 °C, ale některé rostou i při 5 °C. V živných půdách vyžadují přítomnost růstových faktorů, jako jsou aminokyseliny a vitaminy skupiny B. [15], [16]

Leuconostoc mesenteroides subsp. *dextranicum* se vyznačuje tvorbou dextransu. Je méně aktivní jako subsp. *mesenteroides*. Dále je méně náročný na živiny a růstové faktory. Disimuluje citran a používá se v mlékárenské technologii jako složka smetanového zákysu na produkci aromatické látky diacetylu.[16]

Leuconostoc mesenteroides subsp. *cremoris* (Obr. 3) tvoří zpravidla dlouhé řetízky, které sedimentují na dno jako vločky, netvoří ze sacharózy sliz, patří mezi nejméně aktivní. Je náročný na růstové faktory, vitaminy skupiny B a aminokyseliny. Upřednostňuje teploty 18 až 25 °C. Vyskytuje se běžně v mléce a mléčných produktech. Je stálou složkou mezofilních smetanových kultur. Vyznačuje se disimilací citranu a tvorbou diacetylu a acetonu.[3], [16]



Obr. 3 *Leuconostoc mesenteroides* [18].

2.2 Čisté mlékařské kultury

Čisté mlékařské kultury (ČMK) jsou v literatuře popisovány jako specifické bakterie mléčného kysání, které jsou používány k inokulaci mléka a jejichž metabolismus vede ke vzniku charakteristických mléčných produktů. ČMK jsou izolované kultury užitečných mikroorganismů, které mají zajistit správný průběh biochemických pochodů při výrobě, jako je prokysávání, zrání a správný vývoj sensorických vlastností výrobků. Podle obsahu mikroorganismů se ČMK dělí na kultury bakteriální, kvasinkové, plísňové a smíšené. [3]

Čisté mlékařské kultury se dodávají v různých formách [5], [6]:

- tekuté kultury pro zaočkování matečné kultury,
- lyofilizované kultury pro zaočkování matečné kultury,
- koncentrované hlubokozmrazené nebo lyofilizované kultury pro zaočkování provozního zákysu,
- koncentrované hlubokozmrazené nebo lyofilizované kultury pro přímé zaočkování produktu ve výrobníku.

ČMK vedle strojně-technického zařízení spolu se správným vedením technologického postupu tvoří základy k tomu, aby z kvalitní suroviny byl vyráběn kvalitní tvaroh. Účelem použití čistých mlékařských kultur při výrobě tvarohu je úprava kyselosti mléka před sýřením, tvorba kyseliny mléčné spolu s aromatickými chuťovými látkami a snížení pH. Výběru a použití čistých mlékařských kultur musí být věnována náležitá pozornost, protože kvalita kultur značně ovlivní průběh technologie a kvalitu finálního výrobku. Pro výrobu měkkého tvarohu odstředivkovým způsobem se používá jako základní směsná smetanová kultura. [9]

Smetanová kultura

Smetanová kultura je směsná kultura určená k výrobě kysaných mléčných výrobků (např. tvaroh, sýr, máslo), která obsahuje kyselinotvorný rod *Lactococcus* a aromatvorný rod *Leuconostoc*. [19]

Poměr aromatvorných a kyselinotvorných bakterií v základní kultuře závisí na výrobku (obvyklý poměr bývá 1:9). Doporučená doba kultivace je 16 až 20 hodin při teplotě 21 až 23 °C. Výsledná titrační kyselost je v rozmezí 36 – 42 SH, přídavek inokula je 1 %. Kultivační médium je čerstvé nebo obnovené pasterované mléko. [6], [19]

2.3 Kontaminanty

V syrovém mléku bývají přítomny ve větším množství plynotvorné bakterie z čeledi *Enterobacteriaceae* (především *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae*). Tyto bakterie jsou jako kontaminující mikroflóra v potravinách zodpovědné za tvorbu kadaverinu, putrescinu a histaminu. Jejich zvýšené množství v mléku působí inhibičně na růst mléčných laktokoků. Při pasteraci mléka určeného na výrobu tvarohu se tyto bakterie spolehlivě devitalizují. Tyto kmeny jsou součástí střevní mikroflóry člověka a hospodářských zvířat. Protože tyto bakterie jsou termolabilní, je jejich přítomnost v mlékárenských výrobcích důsledkem buď nedostatečného pasteračního režimu nebo špatné hygieny a sanitace v závodě. [16]

Tvarohy jsou náročné na surovinu i z hlediska mikrobiální kvality. I v pasterovaném mléce zůstávají termorezistentní lipázy psychrotrofních mikroorganismů, které při zrání způsobují vady chutě a vůně. Po pasterizaci dále přežívají i některé termofilní mikroorganismy. Nejzávažnější je přítomnost sporotvorných mikroorganismů (např. *Clostridium tyrobutyricum*). [5]

Další skupinou bakterií, které produkují biogenní aminy je skupina enterokoků. Přítomnost enterokoků v mléčných výrobcích je považována za indikaci nedostatečných sanitacních podmínek (množí se na dojicím zařízení, na siláži apod.). Některé se řadí k termorezistentním bakteriím, které přežívají pasterační teploty a vyskytují se i v sušeném mléce (množí se v zahuštěném mléce před jeho sušením). Enterokoky byly ve vysokých koncentracích izolovány i z jídel, která způsobila otravu účinkem biogenních aminů (hlavně tyraminu) a jsou proto považovány za původce jejich vzniku. Jejich nebezpečnost zvyšuje vysoká rezistence vůči antibiotikům. Stále nevyjasněným předmětem výzkumu je schopnost enterokoků produkovat biogenní aminy vznikající ve značné míře ve fermentovaných potravinách (klobásy, sýry, víno, pivo, olivy, rybí produkty). [20]

3 BIOGENNÍ AMINY

Biogenní aminy jsou organické nízkomolekulární dusíkaté látky odvozené od aminokyselin, které jsou syntetizovány v mikrobiálních, rostlinných a živočišných buňkách. [11]

3.1 Význam biogenních aminů a jejich členění

Některé biogenní aminy mají významné biologické vlastnosti, působí jako tkáňové hormony (histamin), protoalkaloidy (hordenin, gramin) a stavební látky, které se účastní biosyntézy dalších hormonů živočichů (fenyletylamin), fytohormonů neboli auxinů, alkaloidů a dalších sekundárních metabolitů. Poslední dobou poutá pozornost skupina polyaminů (spermin, spermidin, putrescin, kadaverin). Polyaminy ovlivňují syntézu proteinů, stabilizují membrány nebo plní neurofyzikální funkce, kdy se účastní přenosu nervového vzruchu na synapsích. Mohou také působit jako vnitrobuněční poslové. Dále jsou polyaminy důležité v procesech buněčného růstu a proliferaci. V popředí zájmů tak stojí možná účast v nádorovém bujení. Příznivě však působí při hojení ran. [22]

Biogenní aminy se nacházejí také v potravinách a nápojích. Jedná se o BA odvozené od bazických a aromatických (heterocyklických) aminokyselin, které jsou v nízkých koncentracích přirozenou složkou řady potravin, neboť v živočišných tkáních a rostlinných pletivech vykonávají řadu důležitých funkcí. Jsou-li biogenní aminy přijímány ve vysokých dávkách, mohou se u některých jedinců projevat jejich toxické účinky na nervový a vaskulární systém. [23]

Rozdělení biogenních aminů není pevně dané a v poslední době se objevují změny v zařazení biogenních aminů do jednotlivých skupin. Podle chemické struktury je můžeme rozdělit na: [24], [25]

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

Skupina polyaminů může být klasifikována i jako samostatná skupina, protože biogenní aminy do ní patřící mohou být tvořeny alternativní metabolickou cestou a následkem toho se projevují odlišným fyziologickým působením. [26], [27]

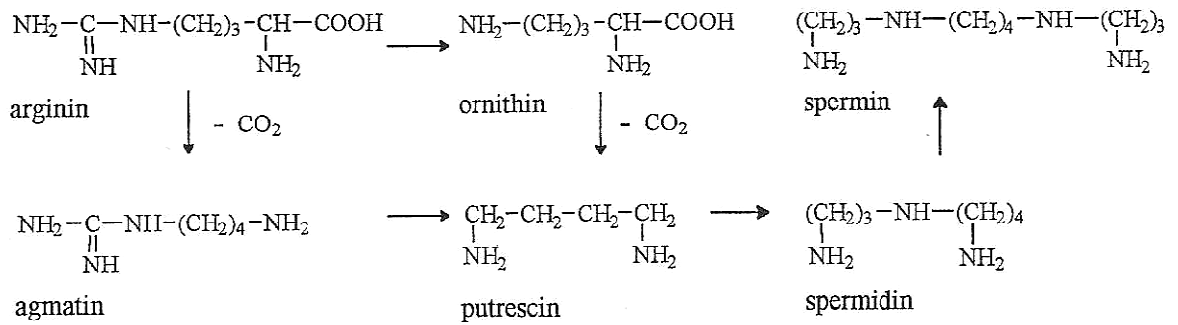
3.2 Dekarboxylázová aktivita a vznik biogenních aminů

Mezi dekarboxylační reakce můžeme zařadit procesy dekarboxylace vedoucí k tvorbě biogenních aminů. BA vznikají z aminokyselin působením dekarboxyláz obsahujících jako kofaktor pyridoxalfosfát nebo z aminokyselin a karbonylových sloučenin působením transamináz. Schopnost dekarboxylovat aminokyseliny mají pouze organizmy, u kterých jsou přítomné dekarboxylázové enzymy. Tzv., endogenní biogenní aminy jsou produkty metabolismu v nízkých koncentracích přirozenou složkou prakticky všech potravin. Exogenní biogenní aminy vznikají v potravinách jako důsledek mikrobiální kontaminace a při kvasných procesech. Přehled biogenních aminů vyskytujících se v potravinách je zobrazen v Tab. 3. K přítomnosti a akumulaci biogenních aminů přispívá dostupnost volných aminokyselin, vhodné pH, aktivita vody, koncentrace solí, teplota a čas zrání, výskyt bakteriální mikroflóry a její hustota a přítomnost mikroorganismů produkujících dekarboxylázy. [23], [26]

Tab. 3 Biogenní aminy, prekurzory, produkty transformace a biologický význam [23].

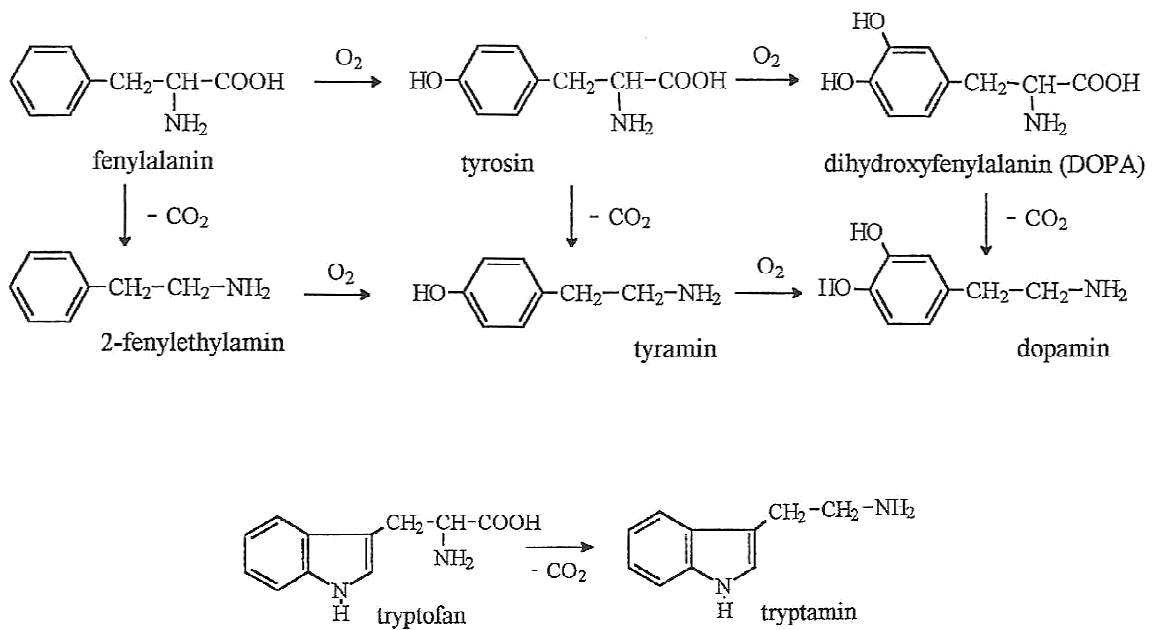
Biogenní amin	Původní aminokyselina	Produkty aminokyselin, transformace aminu	Biologický význam
histamin	histidin		Lokální tkáňový hormon, vliv na krevní tlak, sekreci žaludeční šťávy, účast při anafylaktickém šoku a alergických reakcích
kadaverin	lyzin		Stabilizace makromolekul (nukleové kyseliny), subcelulárních struktur (ribozomy), stimulace diferenciac buněk, rostlinný hormon
putrescin	arginin via ornitin nebo citrulin	N-metylputrescin, spermidin, spermin	
agmatin	arginin	putrescin, N-metylputrescin, spermidin, spermin	
fenyletylamin	fenylalanin	tyramin, dopamin, adrenalin, noradrenalin	Prekurzor tyraminu
tyramin	tyrozin	dopamin, adrenalin, noradrenalin, synefrin, hordenin	Prekurzor dopaminu
dopamin	DOPA*	noradrenalin, adrenalin	Mediátory sympatických nervů
tryptamin	tryptofan	serotonin, melatonin	Lokální tkáňové a rostlinné hormony (catecholaminy), vliv na krevní tlak, peristaltiku střev, psychické funkce

*DOPA – 3,4-dihydroxyfenylalanin



Obr. 5 Dekarboxylace a další reakce argininu [23].

Dekarboxylací fenylalaninu vzniká fenyletylamin. Tyramin vzniká z tyrozinu činností tyrozindekarboxylázy a tryptamin z tryptofanu. Mezi bakterie produkující tyramin lze zařadit *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Carnobacterium*. Z DOPA vzniká dopamin (působením dihydroxyfenylalanindekarboxylázy). [23] Příslušné reakce jsou uvedeny na Obr. 6.



Obr. 6 Dekarboxylace fenylalaninu a tryptofanu [23].

3.3 Výskyt biogenních aminů v potravinách

Nefermentované potraviny vykazují významnější nárůst obsahu aminů v souvislosti s nežádoucími procesy rozkladu bílkovin. Z nefermentovaných potravin živočišného původu bývá přítomnost biogenních aminů (putrescinu, kadaverinu, histaminu a tyraminu) často detekována v mase a masných produktech [30], [31] Koncentrace histaminu, putrescinu a kadaverinu se zvyšuje během procesu kažení masa, zatímco koncentrace sperminu a spermidinu se snižuje Biogenní aminy, zejména histamin, bývají často detekovány v rybách. V syrovém mléce bylo zjištěno malé množství polyaminů sperminu, spermidinu a putrescinu. [31]

Biogenní aminy se jako přirozená součást vyskytují v potravinách rostlinného původu. Hlavní BA v ovoci a zelenině bývá tyramin, v menším množství se vyskytuje řada dalších BA. V listech špenátu se např. vyskytuje volný histamin v množství zhruba 200 až 400 mg/kg. Biogenní aminy se často v rostlinách objevují ve formě konjugátů se skořicovými kyselinami nebo mastnými kyselinami. [23] Mezi ostatní potraviny, které mohou obsahovat určitá množství BA, patří čokoláda, kakao, houby nebo koření. V čerstvém pepři byl naměřen putrescin v množství 70 mg/kg. [32], [33], [34]

Fermentované potraviny se vyrábí pomocí řady mikroorganismů, které mohou produkovat biogenní aminy, proto je ve fermentovaných potravinách vyšší výskyt BA. Na vzniku biogenních aminů se mohou podílet jak mikroorganismy použité ve starterových kulturách, tak i mikroorganismy zpracovávané suroviny. [6], [35] Obsah biogenních aminů ve fermentovaných mléčných výrobcích závisí na obsahu dostupných peptidů a aminokyselin v mléce a na přítomnosti dekarboxylujících mikroorganismů. Obsah BA vzrůstá také při výrobě fermentovaných salámů a masných výrobků. Biogenní aminy bývají také často detekovány ve spontánně fermentovaných rostlinných produktech, jako je např. kysané zelí. [36]

Nejznámější fermentované nápoje jsou pivo a víno. U piva je nejčastěji a nejvíce produkovaným biogenním aminem tyramin. U některých kmenů BMK izolovaných z piva byla detekována slabá tvorba histaminu, kadaverinu, putrescinu nebo fenyletylaminu. [37] Mezi BA vyskytující se ve víně lze zařadit putrescin, tyramin a histamin. [34] Biogenní aminy se tvoří ve víně během různých stádií vinifikace a jejich produkce je determinována řadou faktorů. Ke zvýšení koncentrace aminů dochází také činností mléčných bakterií. [35], [38], [39]

3.4 Působení biogenních aminů na lidské zdraví

Biogenní aminy jsou svojí účastí ve fyziologickém metabolismu nepostradatelné pro lidský organizmus, avšak jejich vysoké koncentrace jsou toxické. Proto zvýšený zájem o stanovení koncentrací a zastoupení jednotlivých biogenních aminů v potravinách vyplývá z prohlubujících se poznatků o jejich působení na lidské zdraví. [23], [40]

Toxické dávky biogenních aminů a jejich přípustná množství v potravinách je velmi obtížné stanovit. Toxický účinek biogenních aminů je silně ovlivněn aktivitou enzymů monoaminoxidázy a diaminooxidázy, které je ve střevech odbourávají. Aktivita enzymů je rozdílná u jednotlivých jedinců a to v závislosti na řadě faktorů, přítomnost inhibitorů (léčiva, alkohol) nebo potenciátorů. Vysoké koncentrace biogenních aminů již není enzymový systém schopen odstranit. [41]

V současné době je v ČR platná vyhláška 305/2004 Sb. vydaná Ministerstvem zdravotnictví, která stanovuje druhy kontaminujících a toxikologicky významných látek a jejich přípustné množství v potravinách. Vyhláška uvádí přípustné množství pouze pro histamin v rybách a rybích výrobcích, které je ve výši 100 mg/kg. Většina známých intoxikací jídlem souvisí právě s histaminem. Legislativa nenařizuje výrobcům uvádět obsah biogenních aminů na obale potravin. [27], [42]

Biogenní aminy se ve vysokých koncentracích mohou projevat jako látky psychoaktivní nebo vazoaktivní. Psychoaktivní aminy působí jako přenašeči v centrálním nervovém systému, vazoaktivní aminy působí přímo nebo nepřímo na vaskulární systém. Mezi symptomy konzumace vysokých dávek biogenních aminů patří, zvracení, závratě, dýchací potíže, bušení srdce, pocení, hypotenze (histamin) nebo hypertenze (tyramin) a migrény (fenyletylamin, tyramin). [27], [16]

3.5 Faktory ovlivňující produkci biogenních aminů

Dekarboxylázová aktivita mikroorganismů je ovlivňována zejména kultivačními podmínkami. Mezi faktory, které významně ovlivňují produkci biogenních aminů, patří teplota, pH prostředí, přítomnost soli, přítomnost kyslíku, doba zrání, skladování a dále hygienické podmínky výroby. [11], [43]

Teplota je důležitým faktorem, který ovlivňuje růst bakterií s dekarboxylázovou aktivitou. Optimální teplota se pohybuje v rozmezí od 20 °C do 37 °C. Při teplotě pod 5 °C nebo nad

40 °C dochází k inhibici růstu bakterií [44]. Teplota během skladování tak sehrává významnou roli při tvorbě biogenních aminů.

Hodnota pH je dalším důležitým faktorem při dekarboxylázové aktivitě. Při zvýšení kyselosti prostředí dochází k inhibici růstu mikroorganismů. Při nízkém pH naopak dochází u bakterií k vyšší produkci zásaditých biogenních aminů, které slouží jako obranný mechanismus proti kyselému intracelulárnímu prostředí. Z těchto důvodů je zapotřebí najít rovnovážný stav mezi těmito mechanismy. [44], [45]

Obsah chloridu sodného má také vliv na dekarboxylázovou aktivitu. Vyšší koncentrace NaCl přispívá ke snížení schopnosti mikroorganismů produkovat biogenní aminy. Stratton et al. [46] zjistili u *Lactobacillus buchneri*, že schopnost tvořit histamin je částečně inhibována při koncentraci NaCl 3,5 % a při koncentraci 5 % se tvorba histaminu již zastavuje.

Přítomnost kyslíku je další z faktorů ovlivňující produkci biogenních aminů. Vliv aerobního a anaerobního prostředí na dekarboxylázovou aktivitu bakterií rodu *Lactococcus* zkoumali Buňková et al. [47]. Z provedených experimentů zjistili, že testované kmeny *Lactococcus lactis* produkovaly vyšší množství tyraminu v prostředí bez přístupu kyslíku a zároveň v přítomnosti 2 % NaCl [47].

3.6 Metody stanovení biogenních aminů

Analýza biogenních aminů v potravinách se provádí za účelem stanovení potenciální toxicity potravin. Dále se analýza BA používá jako ukazatel stupně čerstvosti nebo kažení potravin. [48], [49], [50]

Bylo vyvinuto několik metod pro stanovení biogenních aminů v potravinách. Současné analytické metody pro kvantifikaci BA jsou založeny hlavně na chromatografických metodách. Mezi tyto metody patří tenkovrstvá chromatografie (TLC), plynová chromatografie (GC), kapilární elektroforéza (CE) a vysoce účinná kapalinová chromatografie (HPLC). [51], [52]

3.6.1 Vysoce účinná kapalinová chromatografie

Vysoce účinná kapalinová chromatografie (HPLC) se díky své všestrannosti řadí mezi nejčastěji používané separační metody v porovnání s uvedenými analytickými metodami (Tab. 4) Vyniká vysokou účinností a dobrou opakovatelností. Metoda je vhodná pro dělení organických méně těkavých kapalných a tuhých látek, které jsou rozpustné ve vodě, v organických rozpouštědlech nebo zředěných kyselinách. Při analýze biogenních aminů metodou HPLC se nejčastěji používá systém reverzních fází, s derivatizací danzylchloridem nebo o-ftalaldehydem, detekován UV nebo fluorimetrickým detektorem. [48], [53]

U metody HPLC jsou vzorky pomocí dávkovacího ventilu dávkovány do mobilní fáze, která unáší jednotlivé složky vzorku na kolonu. Zde dochází k opakovanému ustanovení rovnováhy mezi mobilní a stacionární fází a k separaci analytů dle fyzikálně-chemických vlastností. Po průchodu separační kolonou jsou analyty v mobilní fázi detekovány v průtokové cele detektoru. Měřenou veličinou je fluorescence, absorbance, index lomu, elektrická vodivost. Výstupem z detektoru je grafický záznam, chromatogram, na němž se hodnotí plocha nebo výška píku. Kvantitativní analýza se provádí na principu odečtení výsledku z kalibrační křivky. V současnosti je jedním z hlavních trendů v HPLC miniaturizace. Mezi výhody miniaturizace patří snížení spotřeby a odpadu rozpouštědel, snížení spotřeby vzorku, vyšší hmotnostní citlivost a kompatibilita s MS detekcí. [48], [54]

Tab. 4 Rozsah použitelnosti HPLC ve srovnání s ostatními metodami [54].

Metoda	Rozsah molekulových hmotností analýz M_r	Analyzované látky
GC	1-400	přímo plyny, látky těkavé a teplotně stabilní, po derivaci i netěkavé, po pyrolýze i makromolekulární
HPLC	3-10 ⁶	ionty, látky polární i nepolární, nízkomolekulární i polymery
TLC	100-2000	ionty, látky polární i nepolární
CE	3-10 ⁶	ionty, látky polární i nepolární, nízkomolekulární i polymery

3.6.2 Tenkovrstvá chromatografie

Tenkovrstvá chromatografie (TLC) je plošná chromatografie s převládajícím adsorpčním mechanismem dělení analyzované směsi látek. Pomocí TLC lze stanovovat širokou škálu látek při vysoké citlivosti, nízké ekonomické náročnosti a v minimálním čase.

Chromatografický experiment se provádí na tenké vrstvě sorbentu (celulóza, silikagel, alumina) naneseného na vhodnou podložce (sklo, kovová fólie), převážně vícenásobnou vyvíjecí technikou. Po zaschnutí se vzorek vloží do vyvíjecí komory s vhodnou směsí rozpouštědel. Poté se chromatogram vyjme, vysuší a vhodným způsobem detekuje. Následně jsou biogenní aminy derivatizovány, nejčastěji danzylchloridem a kvantifikovány denzitometricky při 330 nebo 254 nm. Pro technologii tenkovrstvé chromatografie byly zkoumány odlišné systémy rozpouštědel, které by byly méně škodlivé a zlepšovaly separaci větších skupin BA, například systém rozpouštědel chloroform-dietyleter-trietylamin (6:4:1) a dále chloroform-trietylamin (6:1). [49], [51], [55]

3.6.3 Plynová chromatografie

Plynová chromatografie (GC) je metoda určená pro analýzu různých látek. Metoda je založena na rozdělování složek mezi dvě nemísitelné fáze, fází pohyblivou – mobilní a fází nepohyblivou – stacionární. Princip metody GC spočívá v odpaření vzorku v temperovaném dávkovacím zařízení (injektoru), následuje oddělení jednotlivých složek směsi v chromatografické koloně, detekce každé složky a její vyhodnocení. Pro analýzu biogenních aminů se plynová chromatografie používá nejčastěji ve spojení s hmotnostní spektrometrií. Derivatizuje se bromidem pentafluorobenzylu, anhydridem kyseliny heptafluoromáselné, pentafluorobenzaldehydem nebo trifluoroacetyl acetonem. [49], [56]

3.6.4 Kapilární elektroforéza

Kapilární elektroforéza (CE) je analytická metoda založená na migraci elektricky nabitých stanovovaných látek rozpuštěných v roztoku elektrolytu kapilárou vlivem stejnosměrného elektrického pole. Separace látek probíhá v kapiláře naplněné roztokem základního elektrolytu, kterým je zpravidla roztok pufru. Nepatrným vnitřním průměrem je zabráněno promísení separovaných částic difúzí. [48], [57]

Při srovnání kapilární elektroforézy s HPLC podaly obě metody uspokojivé výsledky co do citlivosti, detekčního limitu, reprodukovatelnosti a přesnosti, ovšem CE jasně prokázala lepší schopnost separace.[58]

II. PRAKTICKÁ ČÁST

4 CÍL PRÁCE

Cílem diplomové práce je posoudit dekarboxylázovou aktivitu mikroorganismů izolovaných během procesu výroby tvarohů. Vzorky pocházejí z jednotlivých fází výroby tvarohu. Dekarboxylázová aktivita mikroorganismů byla stanovena na základě produkce biogenních aminů pomocí metody HPLC.

Pro dosažení cíle diplomové práce bylo zapotřebí:

v teoretické části popsat:

- proces výroby tvarohů,
- charakterizovat mikroorganismy vyskytující se ve tvarohu,
- dekarboxylázovou aktivitu, vznik biogenních aminů a jejich význam,
- působení biogenních aminů na lidské zdraví a metody jejich stanovení.

v praktické části bylo nutné naplnit tyto dílčí cíle:

- kultivace vzorků izolovaných z výroby tvarohu v mlékárně v České republice,
- stanovit produkci biogenních aminů v bujónu po kultivaci izolátů z jednotlivých fází výroby tvarohu,
- porovnat obsah biogenních aminů pro jednotlivé fáze výroby tvarohu,
- na základě teoretické části a výsledků formulovat závěr.

5 MATERIÁL A METODY

5.1 Charakteristika vzorků z výroby tvarohu

Vzorky z jednotlivých fází výroby tvarohu pocházejí z mlékárny v České republice. Fáze výroby jsou označeny písmeny A až G. Mikroorganismy byly izolovány ze dvou skupin vzorků (skupina I a II) z výroby č. 1 a č. 2. Rozdělení a charakteristika vzorků, ze kterých byly mikroorganismy pro zjišťování dekarboxylázové aktivity izolovány, je uvedena v Tab. 5.

Tab. 5 Charakteristika vzorků, ze kterých byly izolovány mikroorganismy.

Fáze výroby	Popis vzorku	Skupina I		Skupina II	
		Výroba č. 1	Výroba č. 2	Výroba č. 1	Výroba č. 2
A	syrové mléko	1		1	
B	pasterované mléko odstředěné – za pasterem	2		2	
C	pasterované mléko – standardizační tank	3		3	
D	mléko před zakysáním	4	5	4	5
E	tvarohovina před krájením	6	7	6	7
F	tvarohové zrno	8	9	8	9
G	tvaroh jemný ve spotřebitelském balení	10	11	10	11
		12	13	12	13
		14	15		

Vzorky skupiny I pochází ze dvou výroby ze dne 23. 8. 2013, vzorky skupiny II (opět dvě výroby) z výroby tvarohu dne 17. 6. 2013. Pro fázi výroby A (syrové mléko), B (pasterované mléko odstředěné – za pasterem) a C (pasterované mléko – standardizační tank) jsou společné vzorky (vzorky 1, 2, 3). Je to z toho důvodu, protože fáze A, B, C jsou společné vždy pro výrobu č. 1 i č. 2. Teprve v následující fázi D (mléko před zakysáním) dochází k rozdělení na výrobu 1 a 2. Od této fáze už byly vždy vzorky, ze kterých byly mikroorganismy izolovány, rozděleny na dvě výroby.

Všechny izoláty mikroorganismů, u kterých byla zjišťována dekarboxylázová aktivita byly získány z Výzkumného ústavu mlékárenského s.r.o. se sídlem v Praze.

5.2 Izoláty mikroorganismů

Dekarboxylázová aktivita byla zjišťována u celkem 155 mikroorganismů, které byly izolovány během výroby tvarohů v mlékárně v České republice. Všechny vzorky byly za tímto účelem dodány Výzkumným ústavem mlékárenským. Produkce biogenních aminů byla u všech testovaných mikroorganismů zjišťována v bujónu po jejich kultivaci.

Kultivace všech mikroorganismů probíhala dle doporučení VÚM, zpravidla za podmínek (kultivační půda, teplota kultivace a přístup kyslíku), při kterých byly mikroorganismy vyizolovány. Kultivace vzorků probíhala na půdách Brain Heart Infusion (BHI; mozkosrdcová infuze), Trypton Yeast Agar (TYA; agar s tryptonem a kvasničným extraktem) a Reinforced Clostridial Medium (RCM; půda pro anaerobní mikroorganismy) za různých teplot aerobně (AE) nebo anaerobně (AN). V Tab. 6 je uvedeno barevné rozlišení pro použité podmínky kultivace, které je použito v tabulkách charakterizujících jednotlivé izoláty mikroorganismů z tvarohů, které byly v rámci této diplomové práce testovány na dekarboxylázovou aktivitu (Tab. 7, Tab. 8, Tab. 9, Tab. 10).

Tab. 6 Schematické rozlišení pro různé podmínky kultivace.

Kultivační medium	Teplota	Vzduch
BHI	21°C	AE
BHI	30°C	AE
BHI	37°C	AE
BHI	42°C	AE
TYA	30°C	AE
TYA	6,5°C	AE
RCM	37°C	AN

Tab. 7 Testované mikroorganismy izolované z tvarohu - skupina I, výroba č. 1 a podmínky jejich kultivace.

Fáze výroby	Popis vzorku	Číslo vzorku	Označení izolátu	Podmínky kultivace	
A	syrové mléko	1	V1	TYA	30°C/AE
			V2	TYA	6,5°C/AE
B	pasterované mléko odstředěné – za pasterem	2	V3	TYA	30°C/AE
			V4	TYA	30°C/AE
			V5	TYA	30°C/AE
			V6	BHI	37°C/AE
C	pasterované mléko – standardizační tank	3	V7	BHI	30°C/AE
			V8	RCM	37°C/AN
D	mléko před zakysáním – výroba č. 1	4	V9	BHI	37°C/AE
			V10	BHI	30°C/AE
			V11	BHI	30°C/AE
			V12	TYA	6,5°C/AE
E	tvarohovina před krájením – výroba č. 1	6	V13	TYA	30°C/AE
			V14	TYA	30°C/AE
			V15	TYA	30°C/AE
			V16	TYA	30°C/AE
			V17	BHI	42°C/AE
F	tvarohové zrno – výroba č. 1	8	V18	BHI	37°C/AE
			V19	BHI	30°C/AE
			V20	BHI	30°C/AE
			V21	BHI	30°C/AE
G	tvaroh jemný ve spotřebitelském balení – výroba č. 1/1	10	V22	BHI	42°C/AE
			V23	BHI	37°C/AE
			V24	BHI	37°C/AE
			V25	BHI	30°C/AE
			V26	BHI	30°C/AE
G	tvaroh jemný ve spotřebitelském balení – výroba č. 1/14	12	V27	BHI	42°C/AE
			V28	BHI	37°C/AE
			V29	BHI	30°C/AE
			V30	BHI	30°C/AE
G	tvaroh jemný ve spotřebitelském balení – výroba č. 1/25	14	V31	RCM	37°C/AN
			V32	BHI	42°C/AE
			V33	BHI	37°C/AE
			V34	BHI	30°C/AE
			V35	BHI	21°C/AE
G	tvaroh jemný ve spotřebitelském balení – výroba č. 1/14	12	V36	RCM	37°C/AN
			V37	TYA	6,5°C/AE
			V38	BHI	30°C/AE
			V39	BHI	30°C/AE
			V40	TYA	6,5°C/AE
G	tvaroh jemný ve spotřebitelském balení – výroba č. 1/25	14	V41	BHI	42°C/AE
			V42	BHI	37°C/AE
			V43	BHI	30°C/AE
			V44	BHI	30°C/AE
			V45	BHI	30°C/AE

Tab. 8 Testované mikroorganismy izolované z tvarohu - skupina I, výroba č. 2 a podmínky jejich kultivace.

Fáze výroby	Popis vzorku	Číslo vzorku	Označení izolátu	Podmínky kultivace	
A	syrové mléko	1	V1	TYA	30°C/AE
			V2	TYA	6,5°C/AE
B	pasterované mléko odstředěné – za pasterem	2	V3	TYA	30°C/AE
			V4	TYA	30°C/AE
			V5	TYA	30°C/AE
			V6	BHI	37°C/AE
			V7	BHI	30°C/AE
			V8	RCM	37°C/AN
C	pasterované mléko – standardizační tank	3	V9	BHI	37°C/AE
			V10	BHI	30°C/AE
			V11	BHI	30°C/AE
			V12	TYA	6,5°C/AE
D	mléko před zakysáním – výroba č. 2	5	V46	TYA	30°C/AE
			V47	TYA	30°C/AE
			V48	BHI	37°C/AE
			V49	BHI	30°C/AE
			V50	BHI	21°C/AE
			V51	RCM	37°C/AN
E	tvarohovina před krájením – výroba č. 2	7	V53	BHI	42°C/AE
			V54	BHI	37°C/AE
			V55	BHI	37°C/AE
F	tvarohové zrno – výroba č. 2	9	V56	BHI	42°C/AE
			V57	BHI	37°C/AE
			V58	BHI	37°C/AE
			V59	BHI	30°C/AE
			V60	RCM	37°C/AN
			V61	RCM	37°C/AN
G	tvaroh jemný ve spotřebitelském balení – výroba č. 2/1	11	V62	BHI	42°C/AE
			V63	BHI	37°C/AE
			V64	BHI	37°C/AE
			V65	RCM	37°C/AN
			V66	TYA	6,5°C/AE
	tvaroh jemný ve spotřebitelském balení – výroba č. 2/14	13	V67	BHI	30°C/AE
			V68	TYA	6,5°C/AE
	tvaroh jemný ve spotřebitelském balení – výroba č. 2/25	15	V69	TYA	30°C/AE
			V70	BHI	42°C/AE
			V71	BHI	37°C/AE
V72			BHI	30°C/AE	
V73			BHI	30°C/AE	
V74			BHI	30°C/AE	
V75			BHI	30°C/AE	

Tab. 9 Testované mikroorganismy izolované z tvarohu - skupina II, výroba č. 1 a podmínky jejich kultivace.

Fáze výroby	Popis vzorku	Číslo vzorku	Označení izolátu	Podmínky kultivace	
A	syrové mléko	1	V76	RCM	37°C/AN
			V77	TYA	6,5°C/AE
			V78	TYA	6,5°C/AE
B	pasterované mléko odstředěné – za pasterem	2	V79	TYA	30°C/AE
			V80	BHI	37°C/AE
			V81	BHI	30°C/AE
			V82	BHI	30°C/AE
C	pasterované mléko – standardizační tank	3	V83	TYA	6,5°C/AE
			V84	TYA	30°C/AE
			V85	TYA	30°C/AE
			V86	TYA	30°C/AE
			V87	TYA	30°C/AE
			V88	TYA	30°C/AE
			V89	BHI	30°C/AE
D	mléko před zakysáním – výroba č. 1	4	V90	BHI	30°C/AE
			V91	BHI	30°C/AE
			V92	TYA	6,5°C/AE
			V93	TYA	6,5°C/AE
			V94	TYA	30°C/AE
			V95	TYA	30°C/AE
			V96	TYA	30°C/AE
			V97	BHI	42°C/AE
E	tvarohovina před krájením – výroba č. 1	6	V98	BHI	37°C/AE
			V99	BHI	30°C/AE
			V100	BHI	30°C/AE
			V101	BHI	30°C/AE
			V102	TYA	6,5°C/AE
			V103	TYA	6,5°C/AE
F	tvarohové zrno – výroba č. 1	8	V104	BHI	42°C/AE
			V105	BHI	37°C/AE
			V106	BHI	30°C/AE
			V107	BHI	30°C/AE
			V108	BHI	30°C/AE
			V109	BHI	30°C/AE
F	tvarohové zrno – výroba č. 1	8	V110	TYA	6,5°C/AE
			V111	BHI	42°C/AE
			V112	BHI	37°C/AE
			V113	BHI	30°C/AE
			V114	BHI	30°C/AE
F	tvarohové zrno – výroba č. 1	8	V115	BHI	30°C/AE
			V115	BHI	30°C/AE

Tab. 9 Pokračování: Testované mikroorganismy izolované z tvarohu - skupina II, výroba č. 1 a podmínky jejich kultivace.

Fáze výroby	Popis vzorku	Číslo vzorku	Označení izolátu	Podmínky kultivace	
G	tvaroh jemný ve spotřebitelském balení – výroba č. 1/1	10	V116	BHI	42°C/AE
			V117	BHI	37°C/AE
			V118	BHI	30°C/AE
			V119	BHI	30°C/AE
			V120	BHI	30°C/AE
			V121	BHI	30°C/AE
	V122	TYA	6,5°C/AE		
	tvaroh jemný ve spotřebitelském balení – výroba č. 1/25	12	V123	TYA	30°C/AE
			V124	TYA	30°C/AE
			V125	TYA	6,5°C/AE
			V126	TYA	6,5°C/AE
			V127	TYA	37°C/AN

Tab. 10 Testované mikroorganismy izolované z tvarohu - skupina II, výroba č. 2 a podmínky jejich kultivace.

Fáze výroby	Popis vzorku	Číslo vzorku	Označení izolátu	Podmínky kultivace	
A	syrové mléko	1	V76	RCM	37°C/AN
			V77	TYA	6,5°C/AE
			V78	TYA	6,5°C/AE
B	pasterované mléko odstředěné – za pasterem	2	V79	TYA	30°C/AE
			V80	BHI	37°C/AE
			V81	BHI	30°C/AE
			V82	BHI	30°C/AE
			V83	TYA	6,5°C/AE
C	pasterované mléko – standardizační tank	3	V84	TYA	30°C/AE
			V85	TYA	30°C/AE
			V86	TYA	30°C/AE
			V87	TYA	30°C/AE
			V88	TYA	30°C/AE
			V89	BHI	30°C/AE
			V90	BHI	30°C/AE
			V91	BHI	30°C/AE
			V92	TYA	6,5°C/AE
V93	TYA	6,5°C/AE			
D	mléko před zakysáním – výroba č. 2	5	V128	TYA	30°C/AE
			V129	TYA	30°C/AE
			V130	BHI	42°C/AE
			V131	BHI	37°C/AE
			V132	BHI	30°C/AE
			V133	BHI	30°C/AE
			V134	TYA	6,5°C/AE
V135	TYA	6,5°C/AE			
E	tvarohovina před krájením – výroba č. 2	7	V136	BHI	42°C/AE
			V137	BHI	37°C/AE
			V138	BHI	30°C/AE
			V139	BHI	30°C/AE
			V140	BHI	30°C/AE
			V141	RCM	37°C/AN
V142	TYA	6,5°C/AE			
F	tvarohové zrno – výroba č. 2	9	V143	BHI	42°C/AE
			V144	BHI	37°C/AE
			V145	BHI	30°C/AE
			V146	BHI	30°C/AE
			V147	BHI	30°C/AE
			V148	BHI	30°C/AE
G	tvaroh jemný ve spotřebitelském balení – výroba č. 2/1	11	V149	BHI	42°C/AE
			V150	BHI	30°C/AE
			V151	BHI	30°C/AE
			V152	TYA	6,5°C/AE
	tvaroh jemný ve spotřebitelském balení – výroba č. 2/25	13	V153	TYA	30°C/AE
			V154	TYA	6,5°C/AE
			V155	TYA	37°C/AN

5.3 Příprava vzorků pro stanovení biogenních aminů

5.3.1 Kultivační média

Prvním krokem kultivace mikroorganismů pro stanovení produkce biogenních aminů byla příprava tuhé (živné) půdy. Byly využity tři druhy tuhých půd.

Postup přípravy tuhých půd:

TYA

Tryptone Glucose Yeast Extract Agar (HiMedia, Bombai, Indie)....24 g

Destilovaná voda1000 ml

Příslušná navážka půdy TYA byla rozpuštěna v požadovaném množství destilované vody. Sterilizace proběhla v autoklávu při 121°C po dobu 15 minut. Takto připravená půda byla za horka rozlita na Petriho misky.

RCM

Reinforced Clostridial Broth (HiMedia, Bombai, Indie).....38 g

Živný agar č. 123 g

Destilovaná voda1000 ml

Příslušná navážka půdy RCM a živného agaru č. 1 byla rozpuštěna v požadovaném množství destilované vody. Připravená půda byla sterilována v autoklávu při 121°C po dobu 15 minut. Poté byla půda rozlita na Petriho misky.

BHI

Brain Heart Infusion agar (HiMedia, Bombai, Indie).....52 g

Destilovaná voda1000 ml

Příslušná navážka půdy BHI agar byla rozpuštěna v požadovaném množství destilované vody. Sterilizace proběhla v autoklávu při 121°C po dobu 15 minut. Takto připravená byla půda rozlita na Petriho misky.

Po přípravě živných půd bylo provedeno zaočkování dané kultury mikroorganismů křížovým roztěrem. Naočkované kultury byly uloženy do termostatu pro odpovídající teplotu kultivace (viz Tab. 7 – 10).

Postup přípravy tekutých půd:

BHI

Brain Heart Infusion Broth (HiMedia, Bombai, Indie).....37 g
Destilovaná voda1000 ml

Příslušná navážka půdy BHI byla rozpuštěna v požadovaném množství destilované vody. Rozpuštěné médium bylo rozplněno dávkovačem do zkumavek v objemu 4 ml a sterilováno v autoklávu při 121°C po dobu 15 minut. U dalších tekutých půd byl použit stejný postup.

Nutrient Broth

Nutrient Broth (HiMedia, Bombai, Indie).....13 g
Destilovaná voda1000 ml

RCM

Reinforced Clostridial Broth (HiMedia, Bombai, Indie).....38 g
Destilovaná voda1000 ml

Dekarboxylační médium:

Pro zjišťování produkce biogenních aminů bylo připraveno dekarboxylační médium. Po navázení jednotlivých složek půdy BHI, RCM, Nutrient Broth (ekvivalent půdy TYA), byly jako prekurzory pro vznik biogenních aminů přidány aminokyseliny – arginin, histidin, ornitin, tyrozin, lyzin a fenylalanin, které byly získány ze Sigma-Aldrich (St. Louis, USA), každá v koncentraci 0,2 % (w/v). Médium bylo v objemu 4 ml rozplněno dávkovačem do zkumavek a sterilováno při 121°C po dobu 15 minut.

5.3.2 Příprava vzorků na derivatizaci

Po kultivaci testovaného mikroorganismu (48 hodin v příslušném dekarboxylačním médiu, další podmínky viz. tabulky 7 – 10) byl příslušný bujón zcentrifugován. Centrifugace byla prováděna při 20 °C, 4600 otáčkách za minutu po dobu 10 minut na zařízení Rotanta 460R (viz Obr. 7). Získaný supernatant byl poté rozdělen do třech eppendorfkových zkumavek a zředěn v poměru 1:1 (v/v) 1,2 M kyselinou chloristou (Merck).



Obr. 7 Centrifuga Rotanta 460R.



Obr. 8 Příprava vzorků na derivatizaci.

5.3.3 Derivatizace

Ze supernatantu byl odpipetován 1 ml vzorku do derivatizační nádoby. Podle Dadákové a kol. [59] bylo ke vzorku do každé derivatizační nádoby přidáno 100 μ l vnitřního standardu (1,7-heptandiamin; Sigma-Aldrich) v koncentraci 500 mg/l. Následně byla směs zneutralizována přidáním 1,5 ml karbonátového pufru s pH 11,0-11,1. Pufir o pH 9,2 byl přichystán smícháním roztoku A (0,5 M NaHCO₃) a roztoku B (0,5 M Na₂CO₃). Pro úpravu na výsledné pH 11,0-11,1 bylo v pufru rozpuštěno 0,333 g K₂CO₃ na 1 ml roztoku AB. Dále byl přidán čerstvě připravený roztok 2 ml danzylchloridu o koncentraci 5 g/l v acetonu (Sigma-Aldrich). Směs byla uzavřena do derivatizační nádoby, ve které byly vzorky třepány po dobu 20 hodin v temnu.

Po 20 hodinách bylo ke vzorkům přidáno 200 μ l roztoku prolinu (Merck), vzorky byly dobře uzavřeny a třepány další 1 hodinu. Dále byly přidány 3 ml heptanu (Sigma-Aldrich) a vzorky byly 3 minuty dobře ručně protřepávány. Po ustálení byl odpipetován 1 ml heptanové vrstvy do vialky. Heptan byl při teplotě 60 °C odpařen do sucha pod proudem dusíku. Suchý odparek byl zředěn 1,5 ml acetonitrilu (Sigma-Aldrich). Poté byl uchováván do doby analýzy v hlubokomrazícím boxu (MDF_U U3286S, SANYO) při teplotách cca -70 °C. [11], [60], [61]

5.4 Chromatografické stanovení biogenních aminů

Bezprostředně před analýzou byly vzorky přefiltrovány přes stříkačkový filtr s porozitou 0,22 μ m. Připravené vzorky byly nanесeny na kolonu (Agilent Eclipse Plus C18 RRHD, rozměry 3,0 x 50 mm) chromatografického systému (binární pumpa LabAlliance, USA, autosampler LabAlliance, USA, kolona s termostatem; UV/VIS DAD detektor ($\lambda = 254$ nm); a degaser 1260 Infinity, Agilent Technologies).

Separace danzylderivátu biogenních aminů probíhala gradientovou elucí a jejich detekce probíhala spektrofotometricky UV záření o vlnové délce 254 nm. Lineární gradientový eluční program HPLC je uveden v Tab. 11. Podle Dadáková a kol. [59] byly sestaveny podmínky separace a detekce sledovaných biogenních aminů. [40]

Tab. 11 Lineární gradientový eluční program HPLC

Čas [min]	10% ACN [%]	100% ACN [%]
0,0	39	61
0,1	39	61
1,4	30	70
3,5	17	83
4,0	0	100
9,5	0	100
11,5	39	61
15,5	39	61

6 VÝSLEDKY A DISKUZE

V praktické části diplomové práce byla sledována produkce osmi biogenních aminů u 155 izolátů mikroorganismů získaných z výroby tvarohu z mlékárny v České republice. Obsah jednotlivých biogenních aminů byl pomocí vysoce účinné kapalinové chromatografie zjišťován u skupiny I pro 75 izolátů (V1 – V75) a u skupiny II pro 80 izolátů (V76 – V155).

6.1 Produkce biogenních aminů mikroorganismy izolovanými z tvarohů skupiny I

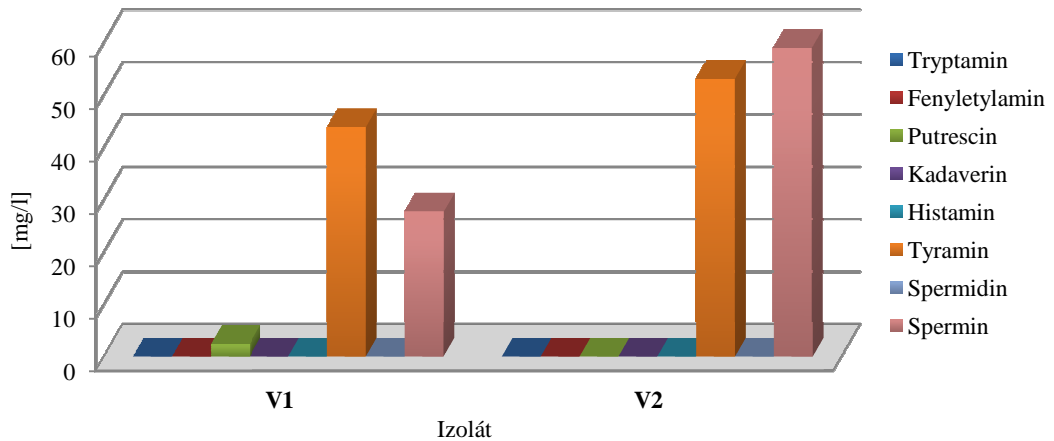
Produkce biogenních aminů (tryptaminu, fenyletylaminu, putrescinu, kadaverinu, histaminu, tyraminu, spermidinu a sperminu) jednotlivými izoláty mikroorganismů (V1 – V75) izolovanými z tvarohů ze skupiny I je uveden v tabulkách P1 a P2, které jsou součástí diplomové práce jako PŘÍLOHA I. Celkový obsah biogenních aminů u těchto mikroorganismů je uveden v souhrnné tabulce, která je uvedena jako PŘÍLOHA III.

Celkové množství vyprodukovaných BA u mikroorganismů izolovaných z tvarohů ve skupině I kolísalo od 23,8 mg/l až po 1351,9 mg/l. Pro mikroorganismy izolované z jednotlivých fází výroby se lišil i výskyt sledovaných biogenních aminů. U všech izolátů (V1 – V75) z této skupiny byl zjištěn nulový či nízký obsah histaminu ($\leq 4,0$ mg/l) a spermidinu ($\leq 1,9$ mg/l). Naopak u všech izolátů byla zjištěna produkce tyraminu (10,9 – 1218,4 mg/l) a sperminu (1,3 – 79,1 mg/l).

Výroba tvarohu se skládá ze sedmi fází. Jednotlivé fáze výroby, ze kterých byly izolovány mikroorganismy, které byly předmětem studia této diplomové práce, jsou označeny písmeny A až G. Popis těchto fází výroby je stručně uveden v Tab. 5. Pro porovnání obsahu biogenních aminů u výroby č. 1 a č. 2 bylo zapotřebí jednotlivé izoláty přiřadit do správné fáze výroby. Fáze výroby A, B a C jsou pro výrobu č. 1 a č. 2 společné.

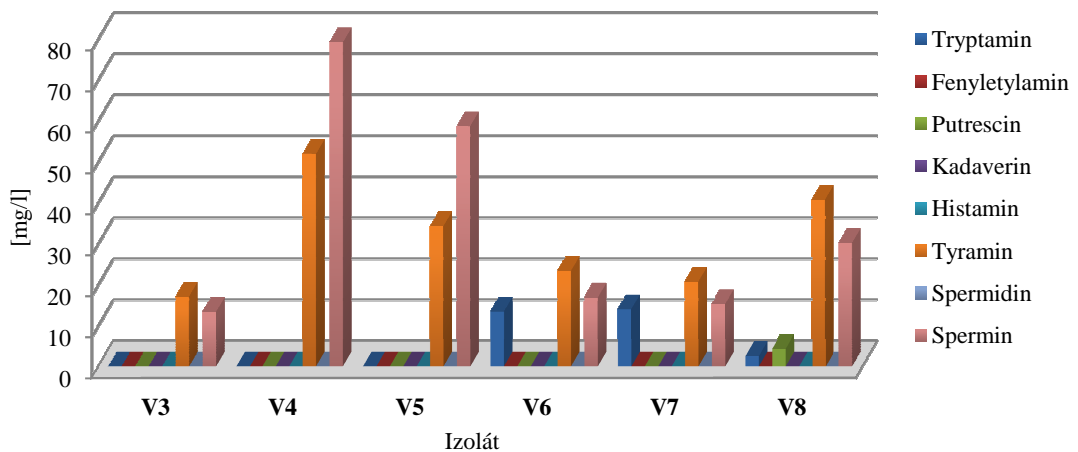
6.1.1 Mikroorganismy izolované z fáze výroby A, B, C

U izolátů V1 a V2 z první fáze výroby (fáze A) byl z biogenních aminů detekován pouze putrescin (2,4 mg/l), tyramin (43,8 – 53,0 mg/l) a spermin (27,7 – 58,9 mg/l), viz Obr. 9. Zbylé BA nebyly detekovány.



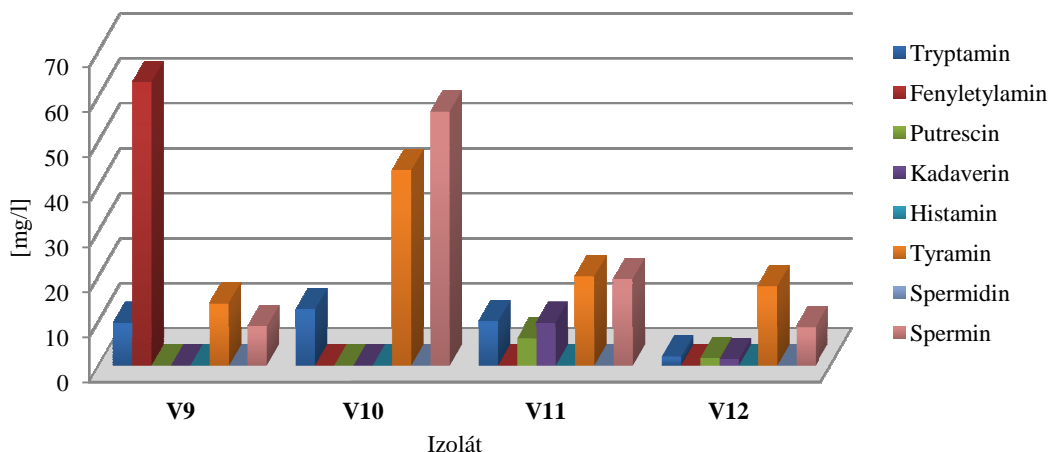
Obr. 9 Produkce biogenních aminů u mikroorganismů izolovaných z tvarohů skupiny I během fáze A.

U mikroorganismů izolovaných během výroby tvarohů ve fázi B byl v bujónu po kultivaci stanoven pouze tryptamin (2,5 – 13,9 mg/l), putrescin (4,3 mg/l), tyramin (17,0 – 51,9 mg/l) a spermin (13,3 – 79, 1 mg/l). Grafické porovnání naměřených koncentrací BA pro izoláty V3 až V8 je patrné na Obr. 10.



Obr. 10 Produkce biogenních aminů u mikroorganismů izolovaných z tvarohů skupiny I během fáze B.

U izolátů V9 až V12 získaných z následující fáze výroby (fáze C) byly z BA detekovány: tryptamin (2,0 až 12,5 mg/l), fenyletylamin (63,0 mg/l), putrescin (1,7 – 6,0 mg/l), kadaverin (1,4 až 9,5 mg/l), tyramin (13,8 – 43,4 mg/l) a spermin (8,5 – 56,4 mg/l), viz Obr. 11.



Obr. 11 Produkce biogenních aminů u mikroorganismů izolovaných z tvarohů skupiny I během fáze C.

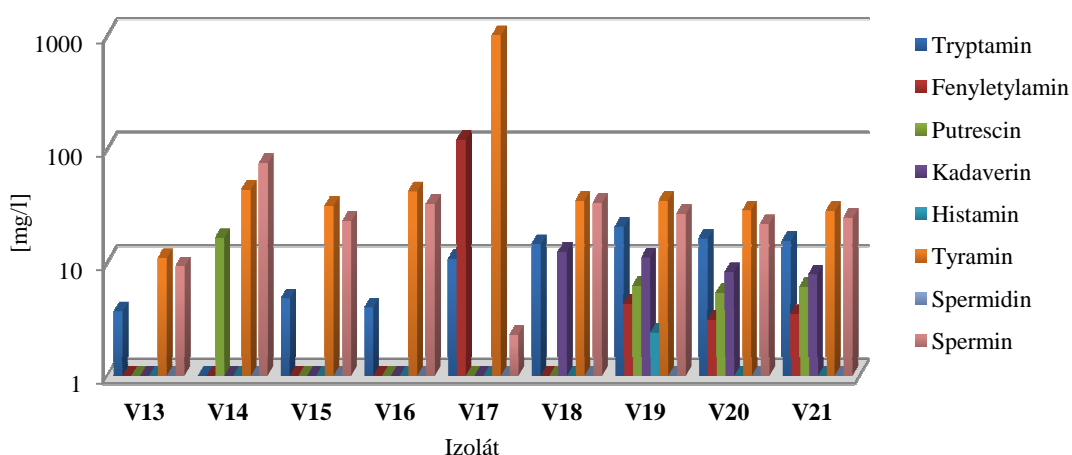
Celkové vyprodukované množství biogenních aminů se u mikroorganismů izolovaných z tvarohů během výroby č. 1 a č. 2 ve fázi A pohybovalo v rozmezí 73,9 – 111,9 mg/l, ve fázi B 30,3 – 131,0 mg/l a ve fázi C 31,2 – 112,3 mg/l, (PŘÍLOHA III).

Mikroorganismy z fáze výroby A byly izolovány ze syrového mléka. Zde byl zjištěn výskyt pouze tří BA, putrescinu, tyraminu a sperminu, z celkem osmi sledovaných. V následující fázi výroby B byly mikroorganismy získány z odstředěného pasterovaného mléka (z mléka za pasterem). U těchto izolátů byla stanovena produkce 4 biogenních aminů. Kromě již zmíněných BA (putrescinu, tyraminu, sperminu), byl také detekován tryptamin. Dále byly na dekarboxylázovou aktivitu analyzovány mikroorganismy z pasterovaného mléka ze standardizačního tanku, které bylo odebrán při výrobě tvarohu ve fázi C. U těchto mikroorganismů bylo detekováno již šest z celkem osmi biogenních aminů. Nebyly zjištěny pouze histamin a spermidin. Tyto BA se nevyskytovaly téměř v žádné fázi výroby.

6.1.2 Mikroorganismy izolované z fáze výroby D

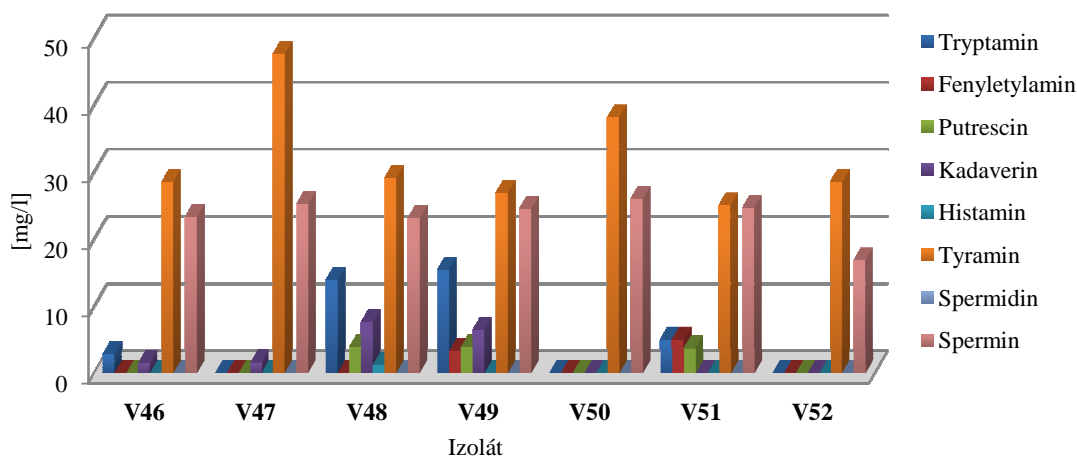
V této části výroby tvarohu byly mikroorganismy izolovány z mléka před zakysáním z výroby č. 1 a č. 2. Tyto mikroorganismy byly dále podrobeny analýze dle metodiky popsané v předchozí kapitole. U izolátů z fáze D byly detekovány téměř všechny sledované BA. Výjimkou byl pouze spermidin, který nebyl zjištěn u žádného z izolátů z výroby č. 1 ani č. 2, viz PŘÍLOHA I. Grafické porovnání získaných hodnot BA izoláty získané z fáze D (výroba č. 1 – izoláty V13 až V21 a výroba č. 2 – izoláty V46 až V52) je uvedeno na Obr. 12 a Obr. 13.

U izolátů V13 až V21 získaných ve fázi D z výroby č. 1 byla zjištěna dekarboxylace tryptofanu (tryptamin v rozmezí 4,0 – 20,6 mg/l), fenylalaninu (fenyletylamin v koncentracích 3,1 – 120,5 mg/l), ornitinu/argininu/agmatinu (putrescin v koncentracích 5,4 – 16,3 mg/l), lyzinu (kadaverin v rozmezí 7,8 – 12,4 mg/l), histidinu (histamin v koncentraci 2,4 mg/l), tyrozinu (tyramin v rozmezí 10,9 – 1218,4 mg/l) a ornitinu/argininu/agmatinu (spermin v množství 2,3 až 74,8 mg/l).



Obr. 12 Produkce biogenních aminů u mikroorganismů izolovaných z tvarohů skupiny I během fáze D – výroba 1.

U izolátů V46 až V52 získaných ze stejné fáze paralelní výroby (výroba č. 2) byly detekovány následující BA: tryptamin (2,9 – 15,4 mg/l), fenyletylamin (3,3 – 5,0 mg/l), putrescin (3,7 – 3,9 mg/l), kadaverin (1,5 – 7,6 mg/l), histamin (1,2 mg/l), tyramin (25,0 – 47,6 mg/l) a spermin (16,8 – 26,0 mg/l).



Obr. 13 Produkce biogenních aminů u mikroorganismů izolovaných z tvarohů skupiny I během fáze D – výroba 2.

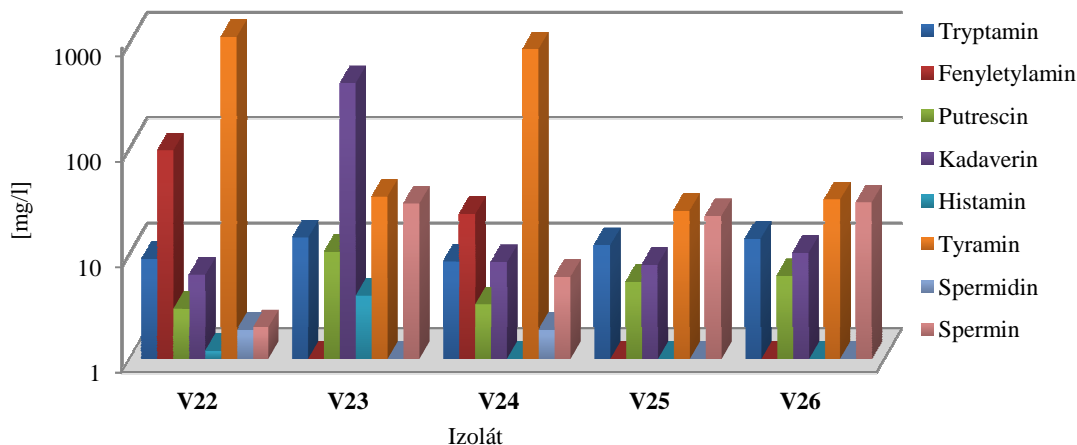
Celkový obsah vyprodukovaných biogenních aminů se u mikroorganismů izolovaných během této fáze výroby tvarohů pohyboval v případě výroby č. 1 v rozsahu 23,8 – 1351,9 mg/l a u výroby č. 2 v rozmezí 45,3 – 80,4 mg/l (viz PŘÍLOHA III).

6.1.3 Mikroorganismy izolované z fáze výroby E

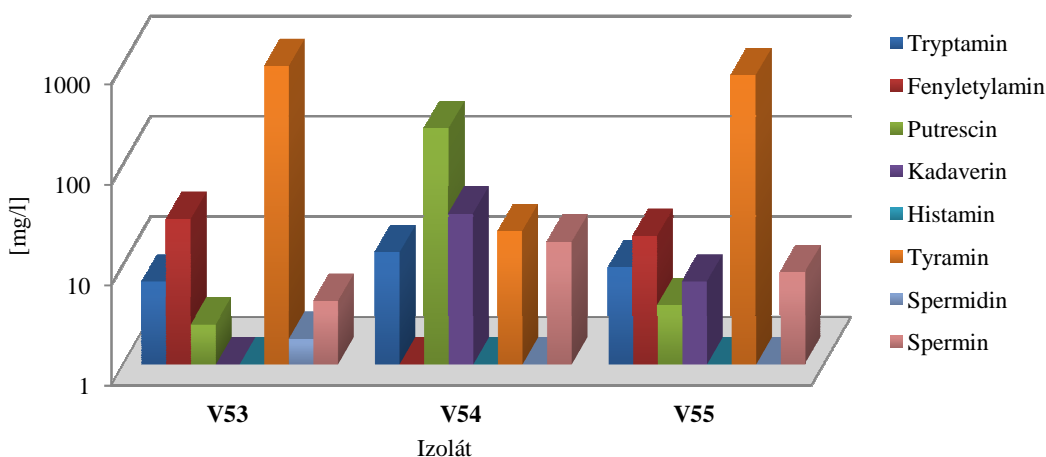
Mikroorganismy z fáze výroby E byly u výroby č. 1, č. 2 získány z tvarohoviny před krájením. U mikroorganismů izolovaných z výroby č. 1 byla zjištěna produkce všech osmi biogenních aminů. Detekován nebyl pouze histamin a to u mikroorganismů izolovaných z výroby č. 2 (PŘÍLOHA I).

U izolátů V22 až V26 získaných z výroby č. 1 byl v médiu po kultivaci stanoven následující obsah jednotlivých biogenních aminů: tryptamin (8,4 – 14,2 mg/l), fenyletylamin (23,7 – 95,3 mg/l), putrescin (3,0 – 10,4 mg/l), kadaverin (6,3 – 412 mg/l), histamin (1,2 – 4,0 mg/l), tyramin (25,4 – 1132,0 mg/l), spermidin (1,9 mg/l) a spermin (2,0 – 30,5 mg/l). Produkce jednotlivých BA u izolátů z výroby č. 1 je graficky znázorněna na Obr. 14.

U izolátů V53, V54, V55 ze stejné fáze výroby č. 2 byly detekovány tyto BA v koncentracích: tryptamin (6,7 až 13,2 mg/l), fenyletylamin (19,1 – 28,2 mg/l), putrescin (2,5 – 228,0 mg/l), kadaverin (6,7 – 31,9 mg/l), tyramin (21,3 – 942,4 mg/l), spermidin (1,8 mg/l) a spermin (16,8 – 26,0 mg/l). Na Obr. 15 jsou patrné rozdíly v hodnotách jednotlivých BA u izolátů V53 – V55.



Obr. 14 Produkce biogenních aminů u mikroorganismů izolovaných z tvarohů skupiny I během fáze E – výroba 1.



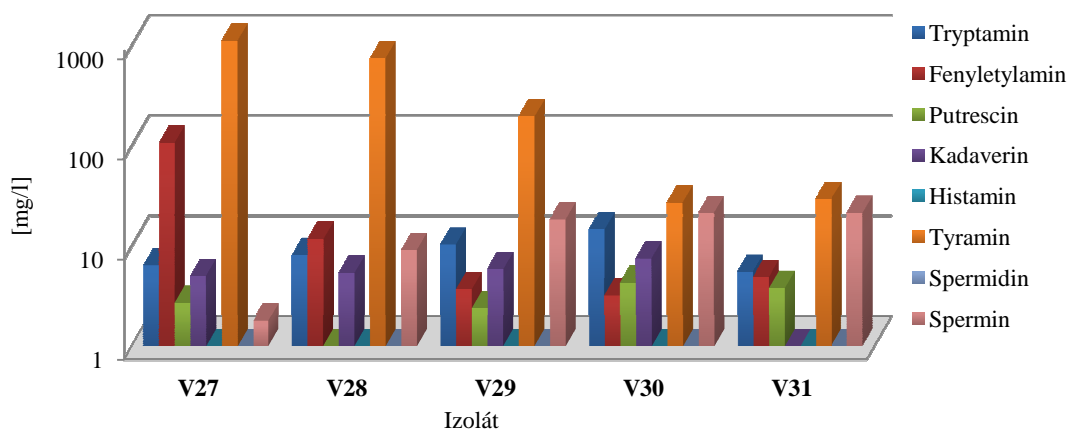
Obr. 15 Produkce biogenních aminů u mikroorganismů izolovaných z tvarohů skupiny I během fáze E – výroba 2.

Celkový obsah biogenních aminů se u mikroorganismů vykultivovaných z tvarohoviny výroby č. 1 se pohyboval v rozmezí 73,3 – 1250,6 mg/l a u mikroorganismů izolovaných z tvarohoviny výroby č. 2 v rozsahu 311,1 – 985,9 mg/l, (PŘÍLOHA III).

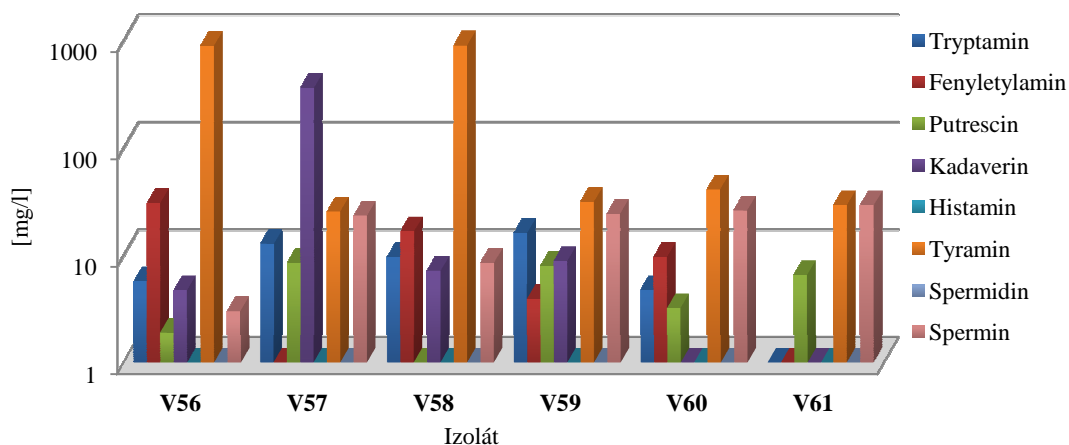
6.1.4 Mikroorganismy izolované z fáze výroby F

Šestým krokem při výrobě tvarohu je výroba tvarohového zrna (fáze F). Ze sledovaných biogenních aminů nebyly u mikroorganismů izolovaných z tvarohového zrna při výrobě č. 1 a č. 2 detekovány pouze histamin a spermidin. Obsah jednotlivých BA je uveden v tabulkách jako PŘÍLOHA I.

Na Obr. 16 a Obr. 17 lze vidět vyprodukovaná množství jednotlivých BA u mikroorganismů izolovaných během výroby č. 1 a č. 2. Celkové množství BA, které vyprodukovaly mikroorganismy izolované z výroby č. 1, se pohybovalo v rozsahu 77,8 – 1237,4 mg/l a u mikroorganismů izolovaných z výroby č. 2 v rozmezí 64,9 – 938,4 mg/l (PŘÍLOHA III).



Obr. 16 Produkce biogenních aminů u mikroorganismů izolovaných z tvarohů skupiny I během fáze F – výroba 1.



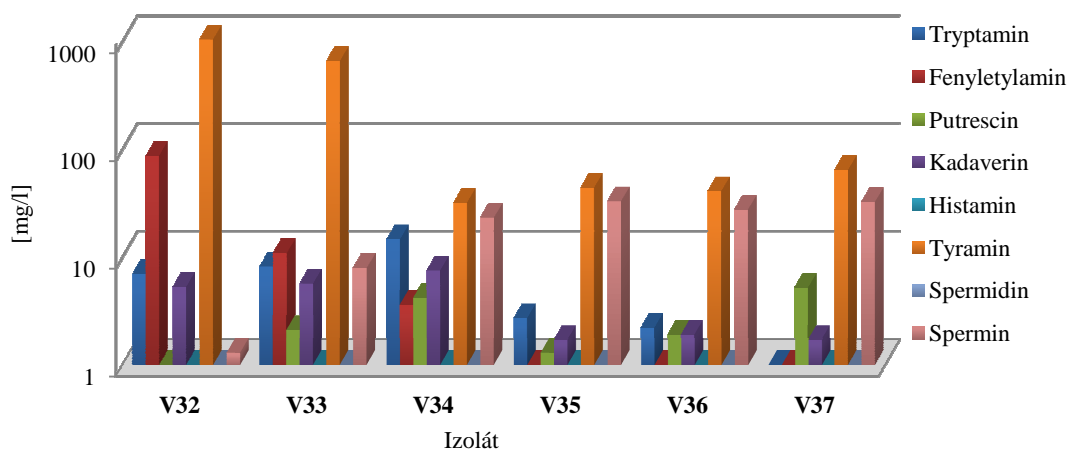
Obr. 17 Produkce biogenních aminů u mikroorganismů izolovaných z tvarohů skupiny I během fáze F – výroba 2.

U izolátů V27 až V31 z první výroby byla v bujónu po kultivaci detekována následující množství jednotlivých BA: tryptamin (5,5 – 14,6 mg/l), fenyletylamin (3,2 – 106,9 mg/l), putrescin (2,4 – 4,3 mg/l), kadaverin (5,0 – 7,5 mg/l), tyramin (27,1 – 1114,6 mg/l) a spermin (1,8 – 21,3 mg/l). U izolátů V56 až V61 z druhé výroby byly v bujónech detekovány tyto biogenní aminy: tryptamin (4,7 – 16,1 mg/l), fenyletylamin (3,9 – 30,5 mg/l), putrescin (1,9 – 8,5 mg/l), kadaverin (4,7 – 361,2 mg/l), tyramin (29,2 – 888,9 mg/l) a spermin (3,0 – 29,2 mg/l).

6.1.5 Mikroorganismy izolované z fáze výroby G

Poslední fází výroby tvarohu, ze které byly izolovány mikroorganismy, byl hotový výrobek, tj. tvaroh jemný ve spotřebitelském balení. Z každé výroby byly mikroorganismy odebírány vždy ze třech vzorků (celkem tedy z 6 vzorků). Vzorky tvarohů, ze kterých byly izolovány mikroorganismy v rámci fáze G výroby č. 1, jsou tedy označeny jako výroba č. 1/1, 1/14 a 1/25. Stejným způsobem byly rozčleněny a označeny i vzorky z výroby č. 2 (výroba č. 2/1, 2/14 a 2/25). Množství jednotlivých biogenních aminů po kultivaci mikroorganismů v dekarboxylačním médiu izolovaných ve fázi G je uvedeno v tabulkách, které jsou součástí PŘÍLOHA I.

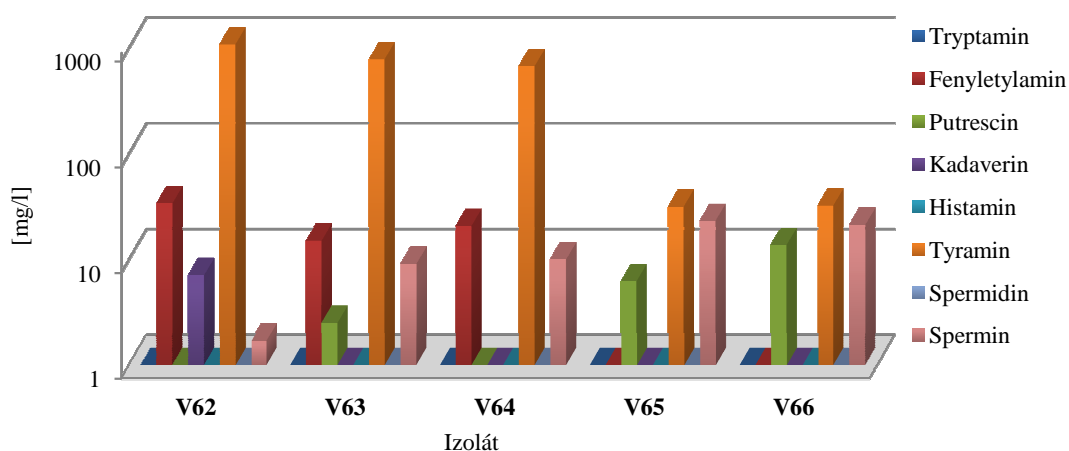
Pro izoláty V32 až V37 z výrobu č. 1/1 byla v bujónu po kultivaci stanovena přítomnost tryptaminu (2,2 – 14,6 mg/l), fenyletylaminu (3,6 – 87,3 mg/l), putrescinu (1,3 až 5,2 mg/l), kadaverinu (1,7 – 7,5 mg/l), tyraminu (32,0 – 1043,0 mg/l) a sperminu (1,3 – 32,9 mg/l). Nebyly zjištěny pouze histamin a spermidin.



Obr. 18 Produkce biogenních aminů u mikroorganismů izolovaných z tvarohů skupiny I během fáze G – výroba 1/1.

U izolátů V62 až V66 z výroby č. 2/1 byl v bujónech detekován obsah následujících BA: fenyletylamin (15,0 – 33,9 mg/l), putrescin (2,5 – 13,6 mg/l), kadaverin (7,1 mg/l), tyramin (31,5 – 1078 mg/l) a spermin (1,7 až 23,0 mg/l). Detekovány nebyly tryptamin, histamin a spermidin.

Celkový obsah biogenních aminů u mikroorganismů izolovaných z fáze G se v případě výroby č. 1/1 pohyboval v rozmezí 74,2 až 1143,9 mg/l a výroby č. 2/1 v rozsahu 60,7 – 1121,1 mg/l, (PŘÍLOHA III).

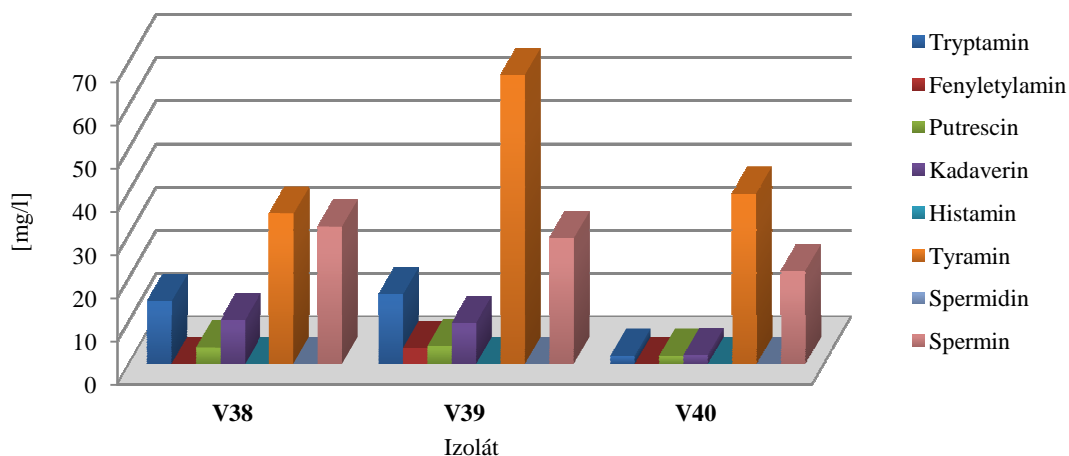


Obr. 19 Produkce biogenních aminů u mikroorganismů izolovaných z tvarohů skupiny I během fáze G – výroba 2/1.

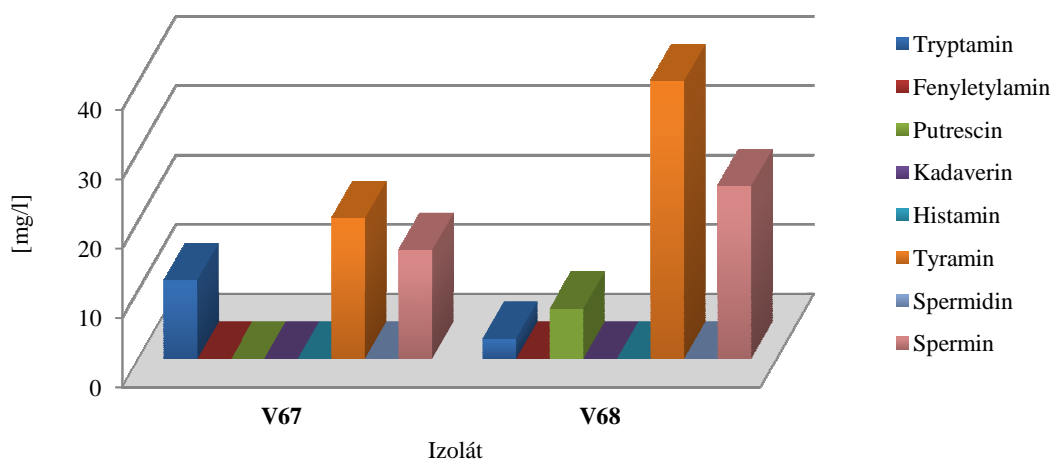
U mikrobiálních izolátů V38, V39, V40 z výroby č. 1/14 byl detekován tryptamin (1,9 – 16,1 mg/l), fenyletylamin (3,7 mg/l), putrescin (1,9 – 4,1 mg/l), kadaverin (2,1 – 10,1 mg/l), tyramin (34,8 – 66,9 mg/l) a spermin (21,4 – 31,8 mg/l). Ze sledovaných BA nebyly zjištěny histamin a spermidin, viz Obr. 18.

Pro izoláty V67 a V68 z výroby č. 2/14 bylo množství biogenních aminů stanoveno takto: tryptamin (2,9 – 11,3 mg/l), putrescin (7,2 mg/l), tyramin (20,3 – 40,8 mg/l) a spermin (15,7 – 24,9 mg/l). Detekovány nebyly fenyletylamin, kadaverin, histamin a spermidin, viz Obr. 21.

Celkové vyprodukované množství BA se u izolátů z výroby č. 1/14 pohybovalo v rozsahu 66,7 – 129,4 mg/l a u izolátů z výroby č. 2/14 v rozmezí 47,3 – 75,8 mg/l (PŘÍLOHA III).



Obr. 20 Produkce biogenních aminů u mikroorganismů izolovaných z tvarohů skupiny I během fáze G – výroba 1/14.

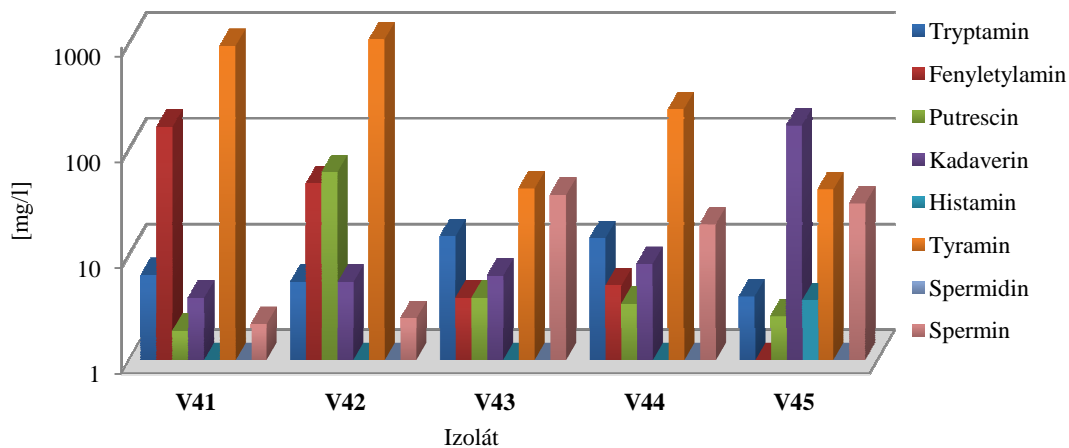


Obr. 21 Produkce biogenních aminů u mikroorganismů izolovaných z tvarohů skupiny I během fáze G – výroba 2/14.

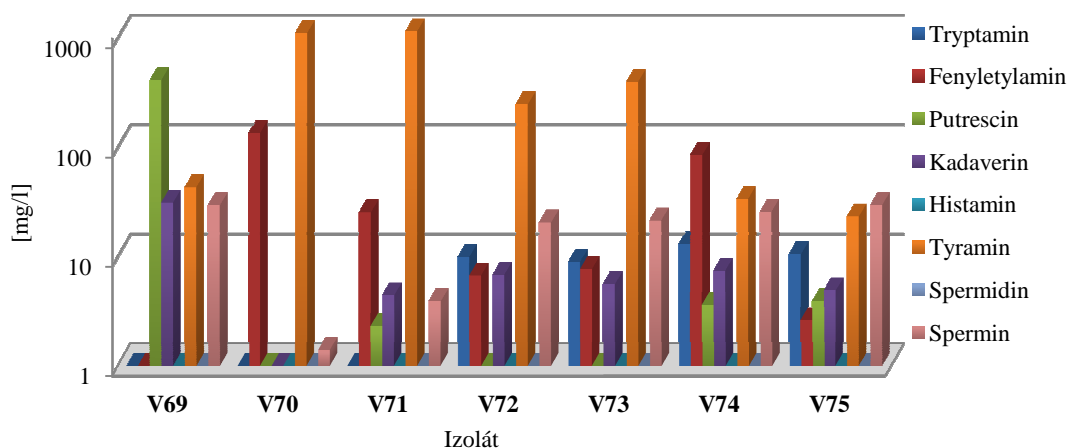
Pro izoláty V41 až V45 z výroby č. 1/25 bylo v bujónu po kultivaci mikroorganismů stanoveno následující množství BA: tryptamin (4,0 až 14,9 mg/l), fenyletylamin (3,9 – 160,8 mg/l), putrescin (1,9 – 60,1 mg/l), kadaverin (3,9 – 165,1 mg/l), histamin (3,7 mg/l), tyramin (41,1 – 1080,6 mg/l) a spermin (2,2 až 36,7 mg/l). Jediný nedetekovaný BA byl spermidin, viz Obr. 22

U izolátů V69 až V75 z výroby č. 2/25 byl v dekarboxylačních bujónech zjištěn tryptamin (8,9 – 13,0 mg/l), fenyletylamin (2,6 – 134,6 mg/l), putrescin (2,3 – 409,0 mg/l), kadaverin

(4,4 – 31,1 mg/l), tyramin (23,2 – 1144,2 mg/l) a spermin (1,4 – 29,5 mg/l). Detekovány nebyly pouze histamin a spermidin, viz Obr. 18.



Obr. 22 Produkce biogenních aminů u mikroorganismů izolovaných z tvarohů skupiny I během fáze G – výroba 1/25.



Obr. 23 Produkce biogenních aminů u mikroorganismů izolovaných z tvarohů skupiny I během fáze G – výroba 2/25.

Celkový obsah biogenních aminů se v bujónu po kultivaci mikroorganismů z výroby č. 1/25 pohyboval v rozmezí 107,6 – 1201,2 mg/l a u mikroorganismů z výroby č. 2/25 byl stanoven v rozsahu 74,6 – 1238,1 mg/l, (PŘÍLOHA III).

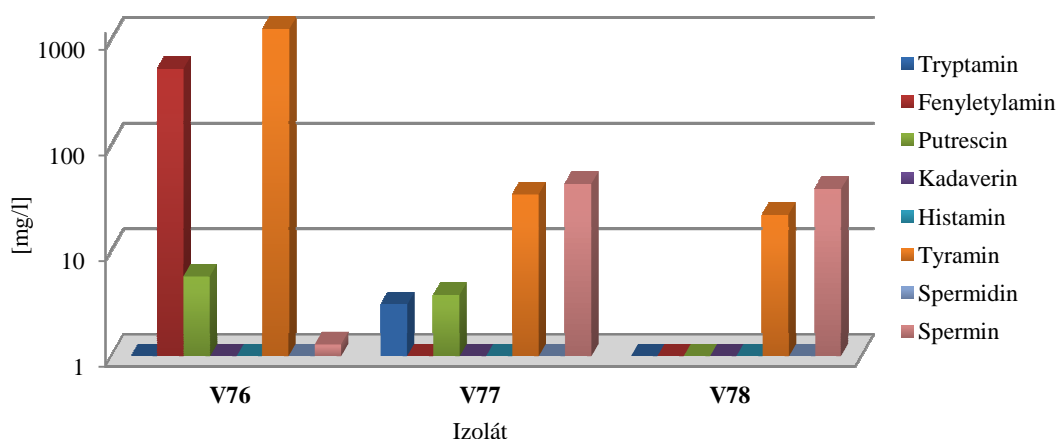
6.2 Produkce biogenních aminů mikroorganismy izolovanými z tvarohů skupiny II

Pro skupinu II je produkce BA (tryptaminu, fenyletylaminu, putrescinu, kadaverinu, histaminu, tyraminu, spermidinu a sperminu) jednotlivými izoláty mikroorganismů (V76 – V155) uvedena v tabulkách P3 a P4, které jsou součástí diplomové práce jako PŘÍLOHA II. Pro výrobu 1 a 2, u mikroorganismů izolovaných z tvarohu ze skupiny II je celkový obsah biogenních aminů uveden v souhrnné tabulce jako PŘÍLOHA IV.

Celkové množství BA u mikroorganismů izolovaných z tvarohů ve skupině II kolísalo od 43,9 mg/l až po 1971,9 mg/l. Výskyt sledovaných biogenních aminů se lišil pro mikroorganismy izolované z jednotlivých fází výroby. U izolátů (V76 – V155) ze skupiny II nebyl detekován spermidin. Pouze u izolátu V149 bylo zjištěno 2,0 mg/l spermidinu. Naopak u všech izolátů byla zjištěna produkce tyraminu (20,3 – 1341,4 mg/l) a sperminu (0,8 – 90,5 mg/l).

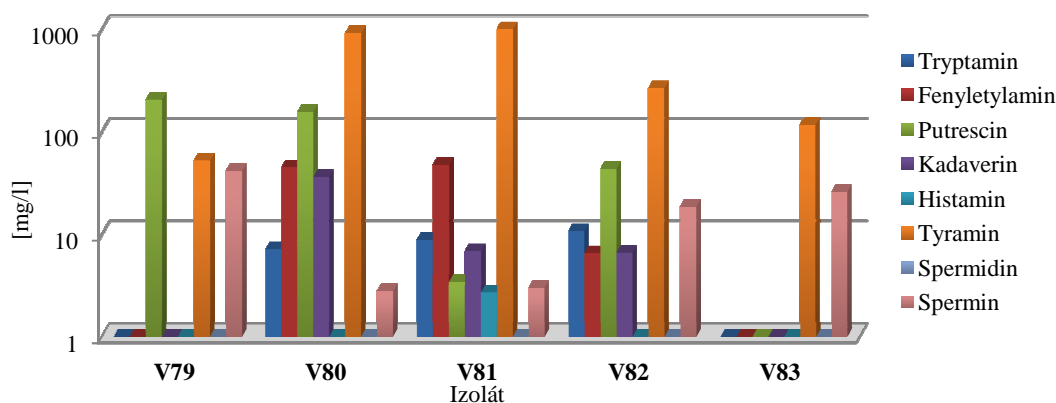
6.2.1 Mikroorganismy izolované z fází výroby A, B, C

Mikroorganismy izolované z fáze A pocházely ze syrového mléka. U mikroorganismů izolovaných během výroby tvarohů ve fázi A byl u izolátů V76 a V78 obsah biogenních aminů stanoven následovně: tryptamin (3,1 mg/l), fenyletylamin (529,0 mg/l), putrescin (3,8 – 5,7 mg/l), tyramin (21,9 – 1255,1 mg/l) a spermin (1,3 – 42,9 mg/l). Mezi BA, které nebyly detekovány, patří kadaverin, histamin a spermidin, viz Obr. 24.



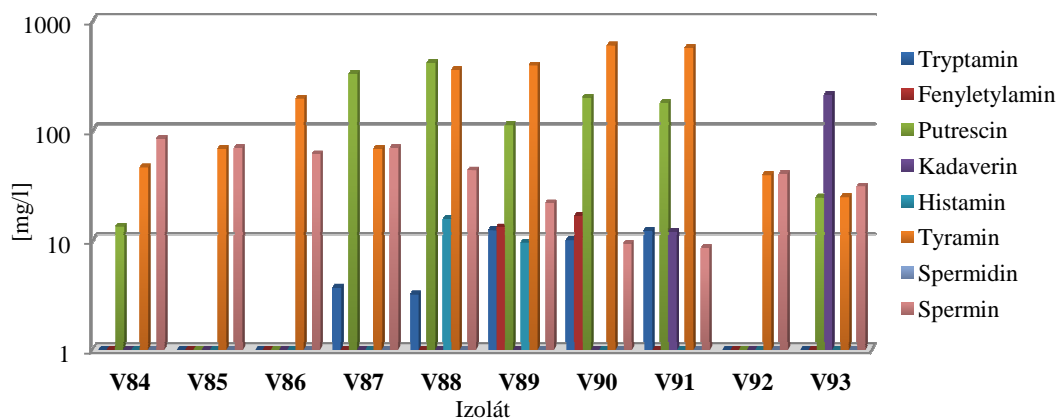
Obr. 24 Produkce biogenních aminů u mikroorganismů izolovaných z tvarohů skupiny II během fáze A.

Mikroorganismy z fáze výroby B byly izolovány z odstředěného pasterovaného mléka za pasterem. U izolátů V79 až V83 byl zjištěn výskyt biogenních aminů pro tryptamin (7,1 až 10,7 mg/l), fenyletylamin (6,5 – 47,3 mg/l), putrescin (3,4 – 204,3 mg/l), kadaverin (6,6 – 36,0 mg/l), histamin (2,7 mg/l), tyramin (52,0 – 991,9 mg/l) a spermin (2,8 až 41,1 mg/l). Pouze spermidin nebyl detekován, viz Obr. 25.



Obr. 25 Produkce biogenních aminů u mikroorganismů izolovaných z tvarohů skupiny II během fáze B.

Dále byly zkoumány mikroorganismy z pasterovaného mléka ze standardizačního tanku, které byly izolovány při výrobě tvarohu ve fázi C. V bujónu po kultivaci byl stanoven obsah BA pouze u tryptaminu (3,2 – 12,3 mg/l), fenyletylaminu (13,1 – 16,6 mg/l), putrescinu (13,3 až 412,3 mg/l), kadaverinu (11,9 – 212,0 mg/l), histaminu (9,5 – 15,6 mg/l), tyraminu (24,6 – 567,3 mg/l) a sperminu (8,5 – 84,2 mg/l). Grafické porovnání naměřených koncentrací biogenních aminů pro izoláty V84 až V93 je na Obr. 26.



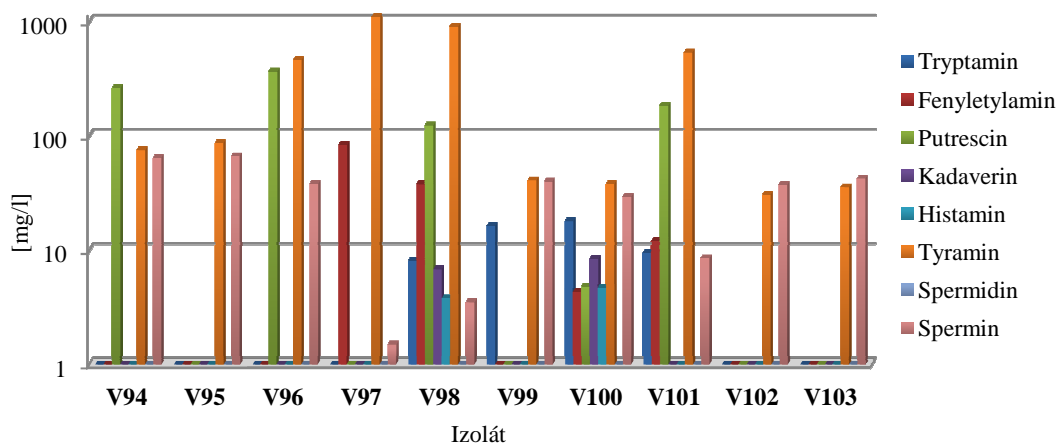
Obr. 26 Produkce biogenních aminů u mikroorganismů izolovaných z tvarohů skupiny II během fáze C.

Celkové vyprodukované množství BA u mikroorganismů izolovaných z tvarohů pro společné kroky výroby č. 1 a č. 2 bylo pro fázi A v rozmezí 60,5 až 1791,1 mg/l, pro fázi B 141,5 – 1154,4 mg/l a pro fázi C 79,2 – 832,8 mg/l, viz PŘÍLOHA IV.

6.2.2 Mikroorganismy izolované z fáze výroby D

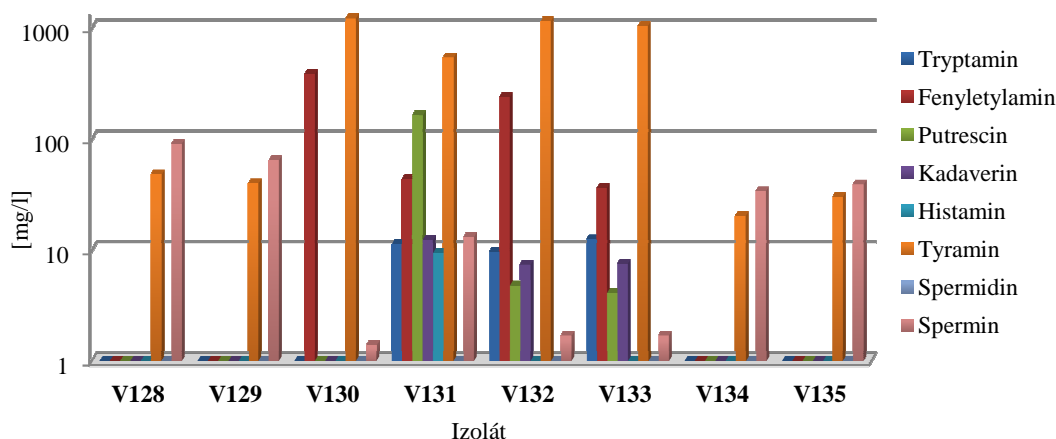
Mikroorganismy z fáze výroby D byly odebrány u výroby č. 1, č. 2 z mléka před zakysáním. U mikroorganismů izolovaných z výroby č. 1 a č. 2 byl zjištěn výskyt sedmi biogenních aminů. Detekován nebyl pouze spermidin, (viz PŘÍLOHA II.)

U izolátů V94 až V103 získaných ve fázi D z výroby č. 1 byla zjištěna dekarboxylace aminokyselin: tyraminu (tryptamin 8,1 – 17,9 mg/l), fenylalaninu (fenyletylamin (4,3 – 83,5 mg/l), ornitinu/argininu nebo přeměna agmatinu (putrescin 4,8 až 366,9 mg/l), lyzinu (kadaverin 6,8 – 8,4 mg/l), histidinu (histamin 3,8 – 4,7 mg/l), tyrozinu (tyramin 30,5 – 1099,3 mg/l), a produkce sperminu (1,5 – 66,4 mg/l). Produkce jednotlivých BA u izolátů pro fázi D z výroby č. 1 je graficky znázorněna na Obr. 27.



Obr. 27 Produkce biogenních aminů u mikroorganismů izolovaných z tvarohů skupiny II během fáze D – výroba 1.

U izolátů V128 až V135 ze stejné fáze výroby č. 2 byly detekovány biogenní aminy v těchto koncentracích: tryptamin (9,6 až 12,5 mg/l), fenyletylamin (36,1 – 383,6 mg/l), putrescin (4,1 – 163,5 mg/l), kadaverin (7,4 – 12,3 mg/l), histamin (9,4 mg/l), tyramin (20,3 – 1217,6 mg/l) a spermin (1,4 – 90,5 mg/l). Na Obr. 28 vidíme rozdíly v hodnotách jednotlivých BA u izolátů V128 – V135.



Obr. 28 Produkce biogenních aminů u mikroorganismů izolovaných z tvarohů skupiny II během fáze D – výroba 2.

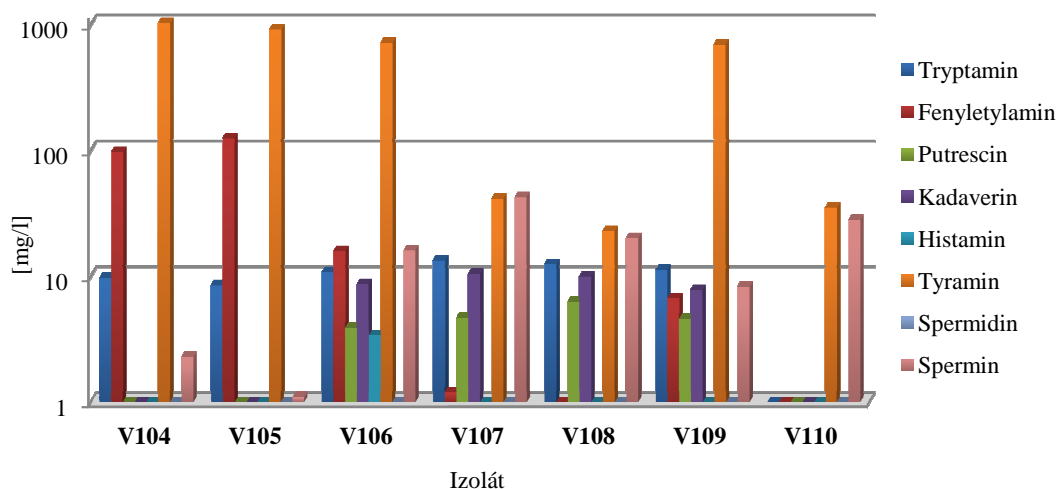
Celkový obsah vyprodukovaných biogenních aminů se u mikroorganismů izolovaných během fáze výroby tvarohů (fáze D) pohyboval pro výrobu č. 1 v rozmezí 67,9 až 1184,3 mg/l a pro výrobu č. 2 v rozsahu 54,1 – 1602,6 mg/l, viz PŘÍLOHA IV.

6.2.3 Mikroorganismy izolované z fáze výroby E

V této části výroby tvarohu byly mikroorganismy izolovány z tvarohoviny před krájením z výroby č. 1 a č. 2. U mikroorganismů izolovaných z této fáze výroby byly detekovány téměř všechny sledované BA. Výjimkou byl pouze spermidin, který nebyl zjištěn u žádného z izolátů z výroby č. 1 a č. 2, viz PŘÍLOHA II. Grafické porovnání naměřených hodnot BA izoláty získané z fáze E – (výroba č. 1 – izoláty V104 až V110 a výroba č. 2 – izoláty V136 až V142) je na Obr. 29 a Obr. 30.

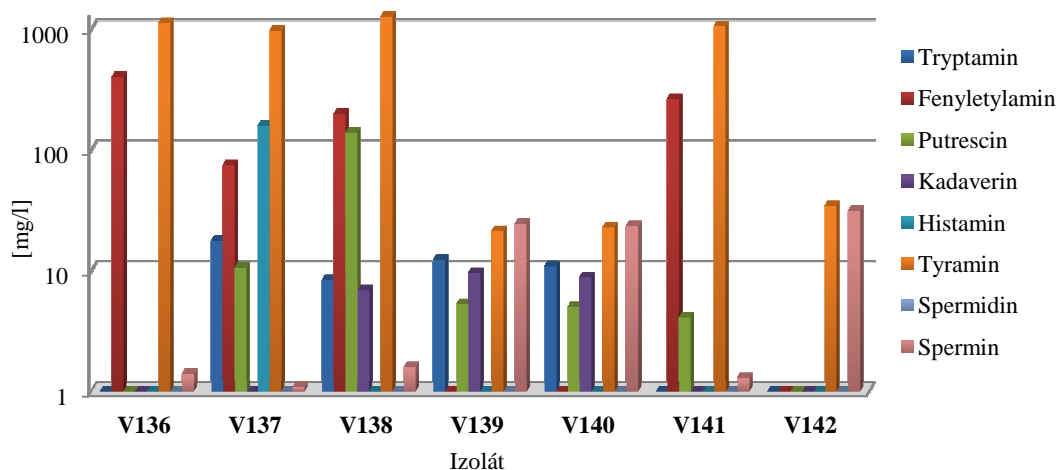
U izolátů V104 až V110 získaných z fáze E z výroby č. 1 byl zjištěn obsah biogenních aminů pro tryptamin (8,5 – 13,4 mg/l), fenyletylamin (1,2 – 125,0 mg/l), putrescin (3,9 – 6,3 mg/l), kadaverin (7,8 – 10,5 mg/l), histamin (3,4 mg/l), tyramin (22,9 – 1030,7 mg/l) a spermin (1,1 až 42,6 mg/l).

Celkový obsah vyprodukovaných biogenních aminů u mikroorganismů izolovaných z fáze E výroby tvarohů pro výrobu č. 1 se pohyboval v rozsahu 63,4 – 1140,2 mg/l a pro výrobu č. 2 je v rozmezí 65,8 – 1622,1 mg/l (PŘÍLOHA IV).



Obr. 29 Produkce biogenních aminů u mikroorganismů izolovaných z tvarohů skupiny II během fáze E – výroba 1.

U izolátů V136 až V142 získaných ze stejné fáze paralelní výroby (výroba č. 2) byly detekovány následující biogenní aminy: tryptamin (8,4 – 17,7 mg/l), fenyletylamin (75,0 až 402,4 mg/l), putrescin (4,1 – 139,1 mg/l), kadaverin (6,9 – 9,6 mg/l), histamin (159,1 mg/l), tyramin (21,3 – 1124,9 mg/l) a spermin (1,1 – 31,4 mg/l).



Obr. 30 Produkce biogenních aminů u mikroorganismů izolovaných z tvarohů skupiny II během fáze E – výroba 2.

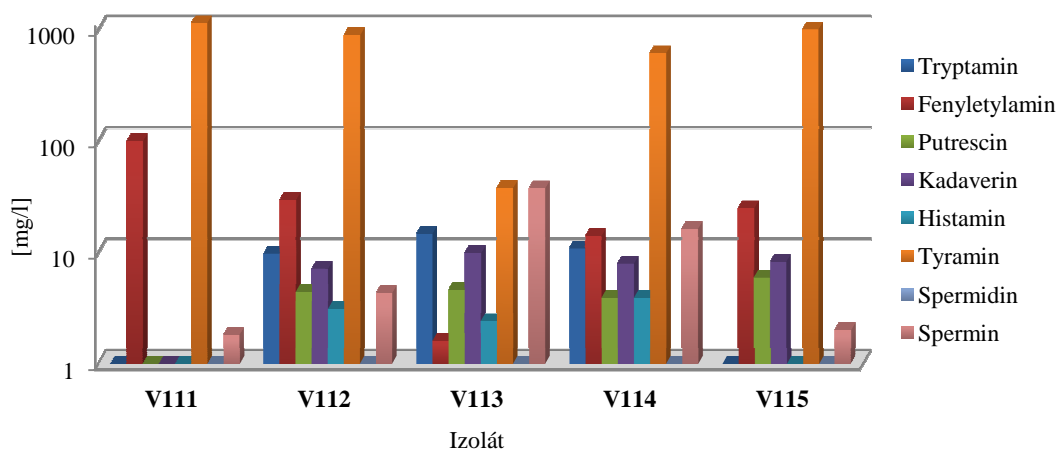
6.2.4 Mikroorganismy izolované z fáze výroby F

Předposlední fáze F výroby tvarohu představovala tvarohové zrno. Ze sledovaných BA u mikroorganismů izolovaných z tvarohového zrna při výrobě č. 1 a č. 2 nebyl detekován pouze spermidin. Množství jednotlivých biogenních aminů pro fázi F je uvedeno v tabulkách jako PŘÍLOHA II.

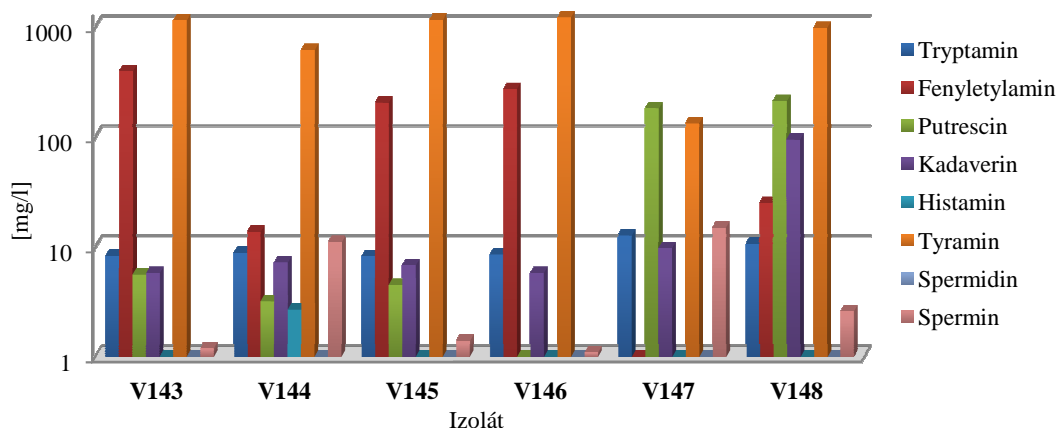
Pro izoláty V111 až V115 z výroby č. 1 byla v bujónu po kultivaci stanovena přítomnost tryptaminu (9,7 až 14,6 mg/l), fenyletylaminu (1,6 – 99,3 mg/l), putrescinu (3,9 až 5,9 mg/l), kadaverinu (7,1 – 9,8 mg/l), histamin (2,4 – 3,9 mg/l), tyraminu (37,6 až 1135,8 mg/l) a sperminu (1,8 – 37,4 mg/l).

U izolátů V143 až V148 z výroby č. 2 byl v bujónu detekován obsah BA: tryptamin (8,2 až 12,7 mg/l), fenyletylamin (13,7 – 395,4 mg/l), putrescin (3,2 – 211,5 mg/l), kadaverin (5,8 až 94,6 mg/l), histamin (2,7 mg/l), tyramin (132,5 – 1220,1 mg/l) a spermin (1,1 až 14,9 mg/l).

Na Obr. 31 a Obr. 32 lze vidět vyprodukovaná množství jednotlivých BA u mikroorganismů izolovaných během výroby č. 1 a č. 2. Celkový obsah biogenních aminů, které vyprodukovaly mikroorganismy izolované z fáze F pro výrobu č. 1, byl v rozmezí 74,2 až 1143,9 mg/l a u mikroorganismů izolovaných z výroby č. 2 v rozsahu 60,7 – 1121,1 mg/l, (PŘÍLOHA IV).



Obr. 31 Produkce biogenních aminů u mikroorganismů izolovaných z tvarohů skupiny II během fáze F – výroba 1.



Obr. 32 Produkce biogenních aminů u mikroorganismů izolovaných z tvarohů skupiny II během fáze F – výroba 2.

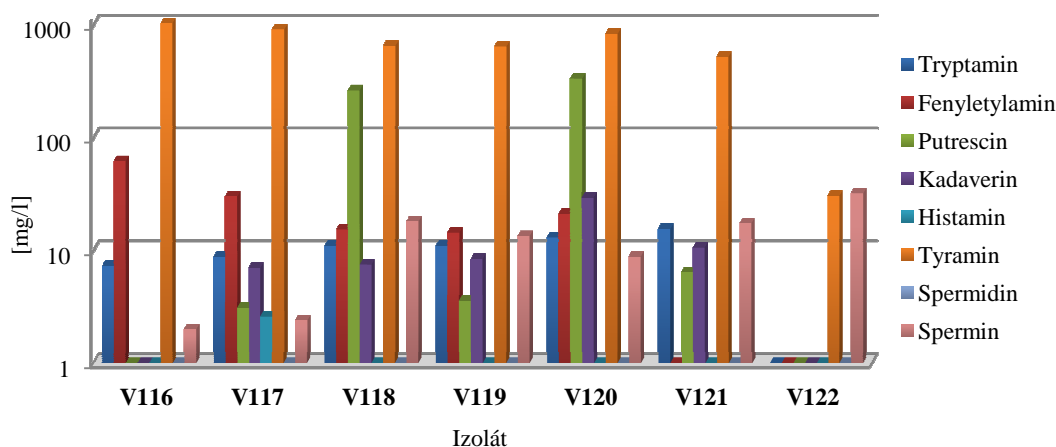
6.2.5 Mikroorganismy izolované z fáze výroby G

Posledním krokem při výrobě tvarohu byla fáze G – tvaroh jemný ve spotřebitelském balení. Z každé výroby byly mikroorganismy odebrány vždy ze dvou vzorků (celkem 4 vzorky). Vzorky tvarohů, ze kterých byly izolovány mikroorganismy v rámci fáze G výroby č. 1, jsou tedy označeny jako výroba č. 1/1 a 1/25. Stejně byly rozděleny a označeny vzorky z výroby č. 2 na výrobu č. 2/1 a 2/25. Obsah jednotlivých BA po kultivaci mikroorganismů v dekarboxylačním médiu izolovaných ve fázi G je uveden v tabulkách jako PŘÍLOHA II.

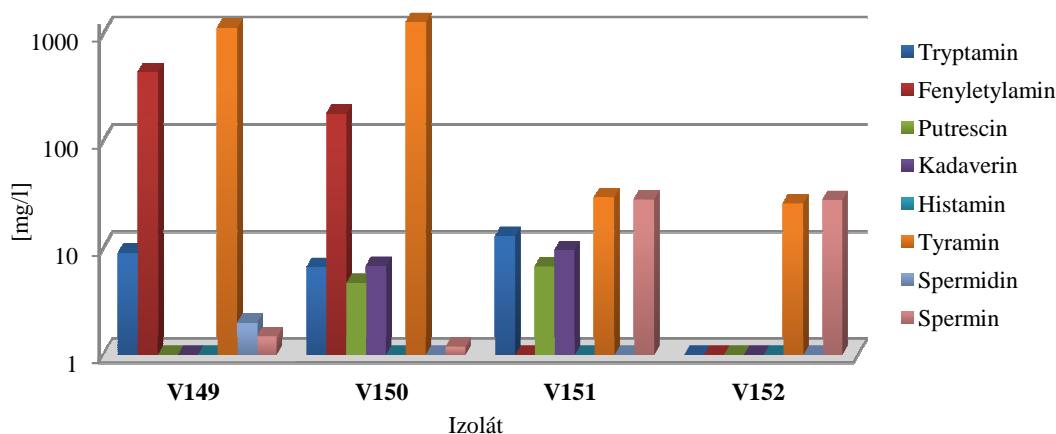
Pro izoláty V116 až V122 z výroby č. 1/1 bylo množství biogenních aminů stanoveno takto: tryptamin (7,3 až 15,5 mg/l), fenyletylamin (14,4 – 62,0 mg/l), putrescin (3,0 – 334,3 mg/l), kadaverin (7,0 – 29,3 mg/l), histamin (2,6 mg/l), tyramin (30,6 – 1033,1 mg/l) a spermin (2,0 – 32,1 mg/l). Jediný nedetekovaný BA byl spermidin, viz Obr. 33.

U mikrobiálních izolátů V149 až V152 z výroby č. 2/1 byl detekován tryptamin (6,6 až 12,9 mg/l), fenyletylamin (178,5 – 437,6 mg/l), putrescin (4,7 – 6,7 mg/l), kadaverin (6,8 – 9,5 mg/l), tyramin (26,0 – 1138,0 mg/l), spermidin (2,0 mg/l) a spermin (1,2 – 28,4 mg/l), viz Obr. 34.

Celkové vyprodukované množství BA se u izolátů z výroby č. 1/1 pohybovalo v rozsahu 62,7 – 1237,9 mg/l a u izolátů z výroby č. 2/1 je v rozmezí 54,0 – 1588,1 mg/l (PŘÍLOHA IV).



Obr. 33 Produkce biogenních aminů u mikroorganismů izolovaných z tvarohů skupiny II během fáze G – výroba 1/1.

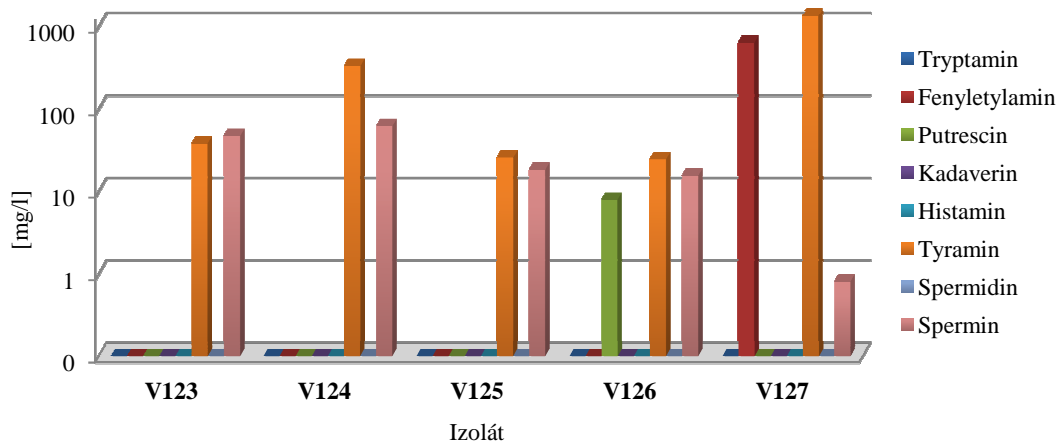


Obr. 34 Produkce biogenních aminů u mikroorganismů izolovaných z tvarohů skupiny II během fáze G – výroba 2/1.

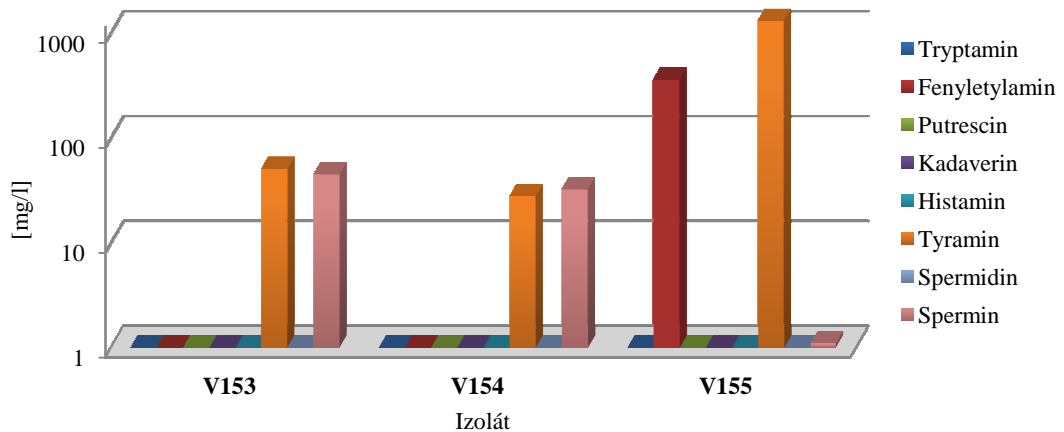
U izolátů V123 až V127 z výroby č. 1/25 bylo v bujónu po kultivaci mikroorganismů množství BA pro fenyletylamin (629,7 mg/l), putrescin (7,8 mg/l), tyramin (24,4 – 1341,4 mg/l) a spermin (0,8 až 61,4 mg/l). Ze sledovaných BA nebyly detekovány tryptamin, kadaverin, histamin a spermidin, viz Obr. 35.

Pro izoláty V153, V154 a V155 z výroby č. 2/25 byl v dekarboxylačních bujónech zjištěn pouze fenyletylamin (356,5 mg/l), tyramin (27,6 – 1294,5 mg/l) a spermin (1,1 – 44,7 mg/l). Zbylé biogenní aminy nebyly stanoveny, viz Obr. 36.

Celkový obsah biogenních aminů se u mikroorganismů vykultivovaných z jemného tvarohu ve spotřebitelském balení výroby č. 1/25 pohyboval v rozmezí 43,9 – 1971,9 mg/l a u mikroorganismů izolovaných z fáze G výroby tvarohu, tj. výroby č. 2/25 byl v rozsahu 59,7 – 1652,1 mg/l, viz PŘÍLOHA IV.



Obr. 35 Produkce biogenních aminů u mikroorganismů izolovaných z tvarohů skupiny II během fáze G – výroba 1/25.



Obr. 36 Produkce biogenních aminů u mikroorganismů izolovaných z tvarohů skupiny II během fáze G – výroba 2/25.

6.3 Diskuze

Biogenní aminy (zejména histamin a tyramin) mohou způsobit intoxikace, a proto včasná detekce mikroorganismů produkujících BA je důležitá prevence v potravinářském průmyslu. V diplomové práci byla zjišťována dekarboxylázová aktivita celkem u 155 mikroorganismů, které byly izolovány z fázových rozborů během výroby tvarohů v mlékárně v České republice. Všechny vzorky mikroorganismů byly dodány Výzkumným ústavem mlékárenským. Mikroorganismy byly izolovány ze dvou skupin vzorků, u každé skupiny ze dvou výrob. Produkce biogenních aminů byla u všech testovaných mikroorganismů zjišťována v bujónu po jejich kultivaci. Obsah jednotlivých BA byl pomocí vysoce účinné kapalinové chromatografie zjišťován u skupiny I pro 75 izolátů (V1 – V75) a u skupiny II pro 80 izolátů (V76 – V155).

Decarboxylázová aktivita mikroorganismů byla zjištěna u všech 155 izolátů (V1 – V155) na základě produkce biogenních aminů, které byly stanoveny metodou HPLC. Ze sledovaných osmi BA byl v každém izolátu detekován tyramin a spermin. U skupiny I pro izoláty V1 – V75 byla zjištěna produkce tyraminu (10,9 – 1218,4 mg/l) a sperminu (1,3 – 79,1 mg/l). Pro skupinu II u izolátů V76 – V155 byl zjištěn obsah tyraminu (20,3 – 1341,4 mg/l) a sperminu (0,8 – 90,5 mg/l).

Prvním krokem výroby tvarohu je příjem syrového mléka. Autoři Gloria a kol. [63] studovali hladinu biogenních aminů v mléce ihned po nadojení. Pro spermin zjistili množství 0,13 – 0,26 mg/l. U skupiny I, fáze výroby A (syrové mléko), byl obsah sperminu u izolátů V1 = 27,7 mg/l a V2 = 58,9 mg/l. Ve skupině II byl spermin stanoven u 3 izolátů: V76 = 1,3 mg/l, V77 = 42,9 mg/l a V78 = 38,6 mg/l. Pro obě skupiny vzorků, byly zjištěny vyšší hodnoty, než uvádějí Gloria a kol. [63]. V potravinách živočišného původu bývá zjištěno více sperminu než spermidinu, na rozdíl od rostlinných potravin, kde je detekován vyšší obsah spermidinu. [33]

Podle studií [33], [43] je v syrovém mléce obsaženo malé množství sperminu, spermidinu a putrescinu. S těmito závěry souhlasí částečně i naše produkce BA mikroorganismy izolovanými z fáze A výroby tvarohu (syrového mléka). Spermidin nebyl detekován ani u jedné skupiny izolátů. Naopak putrescin a spermin byly detekovány u skupiny I i II. Zjištěná množství BA byla v rozsahu 2,4 – 5,7 mg/l pro putrescin a 1,3 – 58,9 mg/l pro spermin.

Schopnost produkce tyraminu byla detekována u komerčně dodávané startovací kultury, kterou tvoří *Lactococcus. lactis* subsp. *lactis* a *Lactococcus. lactis* subsp. *cremoris*. [64] V potravinách je obsah tyraminu považován za toxický v rozsahu 100 – 800 mg/kg. [43] V experimentální části byla produkce tyraminu zjištěna u všech zkoumaných vzorků. Z toho u 41 izolátů mikroorganismů byl obsah vyšší než 800 mg/l. U skupiny I to byly izoláty mikroorganismů V17, V22, V24, V27, V32, V41, V42, V53, V56, V58, V62, V70 a V71 s obsahem tyraminu 869,0 – 1218,4 mg/l. U skupiny II byla zjištěna vysoká produkce tyraminu (831,4 – 1341,4 mg/l) u mikroorganismů izolovaných během výroby tvarohu pro izoláty: V76, V80, V81, V97, V98, V104, V105, V111, V112, V115, V116, V117, V120, V127, V130, V132, V133, V136, V137, V138, V141, V143, V145, V146, V148, V149, V150 a V155. Z výsledků je patrné, že minimálně u 13 vzorků ze skupiny I a 28 vzorků ze skupiny II lze jejich produkci tyraminu považovat za toxickou koncentraci a tudíž nebezpečnou pro lidské zdraví.

Další BA, který má významné biologické vlastnosti, je spermidin. Je to polyamin, který se účastní buněčného metabolismu a patří mezi fyziologicky aktivní biogenní aminy, které jsou nezbytné pro regulaci buněčného růstu a diferenciaci buněk. [65], [66] U skupiny I byl zjištěn nízký obsah spermidinu u izolátů V22, V24 (1,9 mg/l) a V53 (1,8 mg/l). Jedná se o mikroorganismy z fáze výroby E, které byly získány z tvarohoviny před krájením u výroby č. 1 (V22, V24) a č. 2 (V53). U skupiny II byl spermidin stanoven pouze u izolátu V149 v množství 2,0 mg/l, který pochází z poslední fáze výroby tvarohu (fáze G). Zde byly mikroorganismy izolovány z hotového výrobku, tj. tvaroh jemný ve spotřebitelském balení z výroby č. 2/1.

Z hlediska možných negativních dopadů na lidské zdraví lze mezi nejvýznamnější biogenní aminy v potravinářských výrobcích a nápojích zařadit histamin. [43] Histamin se ve vysoké koncentraci stává důležitým mediátorem alergických reakcí, které se projevují kopřivkou, bolestí břicha, průjmou nebo zvracením. [67] Bylo prokázáno, že vysoký obsah histaminu stojí za otravou z jídla, v některých případech i za úmrtím konzumenta. [68], [69] V ČR je platná vyhláška 305/2004 Sb. vydaná Ministerstvem zdravotnictví, která stanovuje druhy kontaminujících a toxikologicky významných látek a jejich přípustné množství v potravinách. Vyhláška uvádí přípustné množství pouze pro histamin v rybách a rybích výrobcích, které je ve výši 100 mg/kg. [42] Podle nařízení komise evropských společenství č. 2073/2005 je pro produkty rybolovu, které byly ošetřeny enzymatickým zráním v láku, vyrobené z druhů ryb spojovaných s vysokým množstvím histidinu

stanoven pro histamin limit 200 – 400 mg/kg. [70] U skupiny I byl zjištěn nízký obsah histaminu (≤ 4 mg/l) pro 5 mikroorganismů (V19, V22, V23, V45 a V48) izolovaných z různých fází výroby tvarohu (fáze D, E, G u výroby č. 1 a fáze D u výroby č. 2). U skupiny II bylo zjištěno malé množství histaminu ($\leq 15,6$ mg/l) pro 12 mikroorganismů izolovaných z téměř všech fází výroby tvarohu. Výjimkou byla pouze fáze výroby A, kde produkce histaminu detekována nebyla u žádného mikroorganismu izolovaného ze syrového mléka. Nejvyšší hodnoty byly stanoveny u izolátu V137 (159,1 mg/l), který byl odebrán z fáze výroby E – tvarohovina před krájením.

Jedním ze sledovaných biogenních aminů, které byly produkovány mikroorganismy získaných z výroby tvarohu z mlékárny v České republice, byl tryptamin. Tento BA, stejně jako fenyletylamin, může zvyšovat krevní tlak. [71] U skupiny I byl tryptamin (1,9 – 20,6 mg/l) zjištěn v bujónech po kultivaci u 75 % mikroorganismů získaných z fázových rozborů během výroby tvarohu (56 izolátů). Pro skupinu II byl obsah tryptaminu (3,1 – 17,9 mg/l) stanoven u 55 % mikroorganismů izolovaných z fázové výroby tvarohu (44 izolátů).

V experimentu byla sledována také produkce dalších biogenních aminů, především putrescinu a kadaverinu. Tyto BA samy o sobě nepůsobí toxicky, avšak mohou zvyšovat nežádoucí toxické účinky dalších vyskytujících se BA (zejména histaminu, tyraminu a fenyletylaminu). Z těchto důvodů je obtížné stanovit toxikologický limit pro dávku těchto aminů v potravinách. Obsah putrescinu se zvyšuje s bakteriální činností v průběhu nevhodného skladování a zpracování potravin živočišného původu. [43], [71] Pro skupinu I byl obsah putrescinu (1,3 – 409,0 mg/l) stanoven u 65 % mikroorganismů izolovaných z fázové výroby tvarohu (49 izolátů). U skupiny II byl putrescin (3,1 – 412,3 mg/l) zjištěn u 59 % mikroorganismů získaných z výroby tvarohu (47 izolátů).

Kadaverin je biogenní amin, který často vzniká metabolickou činností mikroorganismů, zejména kontaminující mikroflóry [43], čímž lze vysvětlit i jeho rozdílný obsah naměřený u testovaných izolátů. U 61 % mikroorganismů (46 izolátů) získaných z fázové výroby tvarohu ze skupiny I byl detekován kadaverin v rozsahu 1,4 – 412,2 mg/l. Pro skupinu II byl obsah kadaverinu stanoven v rozmezí 5,8 – 212,0 mg/l u 43 % mikroorganismů (34 izolátů) izolovaných z fázové výroby tvarohu. Jelikož bakterie, které jsou zodpovědné za tvorbu kadaverinu, jsou termolabilní [16], tak u výroby tvarohu skupiny I pravděpodobně došlo k nedostatečnému pasterizačnímu režimu nebo jsou vyšší hodnoty

důsledkem sekundární kontaminace po pasteraci, případně horších hygienických podmínek a sanitace v závodě.

Fenyletylamin byl detekován ve skupině I u 49 % mikroorganismů (37 izolátů) získaných z výroby tvarohu (fáze C, D, E, F a G) v množství 2,6 – 160,8 mg/l. Ve skupině II byl stanoven fenyletylamin v rozsahu 1,2 – 629,7 mg/l u 52 % mikroorganismů (42 izolátů), které byly izolovány ze všech fází výroby tvarohu. Podle Silla Santos [43] a autorů Brink a kol. [72] je obsah 30 mg/kg fenyletylaminu v potravinách považován za toxikologicky významný. U skupiny I byly hodnoty fenyletylaminu ≥ 30 mg/l u 11 izolátů: V9 (63,0 mg/l), V17 (120,5 mg/l), V22 (95,3 mg/l), V27 (106,9 mg/l), V32 (87,3 mg/l), V41 (160,8 mg/l), V42 (47,0 mg/l), V56 (30,5 mg/l), V62 (33,9 mg/l), V70 (134,6 mg/l) a V74 (84,2 mg/l). U skupiny II byl obsah fenyletylaminu ≥ 30 mg/l u 25 izolátů: V76 (529 mg/l), V80 (44,8 mg/l), V81 (47,3 mg/l), V97 (83,5 mg/l), V98 (37,8 mg/l), V104 (97,4 mg/l), V105 (125,0 mg/l), V111 (99,3 mg/l), V116 (62,0 mg/l), V117 (30,1 mg/l), V127 (629,7 mg/l), V130 (383,6 mg/l), V131 (43,7 mg/l), V132 (238,2 mg/l), V133 (36,1 mg/l), V136 (402,4 mg/l), V137 (75,0 mg/l), V138 (199,5 mg/l), V141 (263,4 mg/l), V143 (395,4 mg/l), V145 (204,4 mg/l), V146 (272,1 mg/l), V149 (437,6 mg/l), V150 (178,5 mg/l) a V155 (356,5 mg/l). Z uvedených hodnot vyplývá, že námi zjištěné množství fenyletylaminu u izolátů mikroorganismů získaných z různých fází výroby tvarohu pro skupinu I a II značně překračuje limit, kdy jsou již potraviny považovány za toxické.

U všech mikroorganismů, které byly izolovány během výroby tvarohu, byla detekována produkce biogenních aminů. Stanovit limity pro toxické úrovně jednotlivých BA v tvarohu je obtížné vzhledem k řadě faktorů, které působí na výsledný efekt účinků biogenních aminů na lidské zdraví. Některé aminy podněcují toxické účinky jiných BA. Dalším faktorem ovlivňujícím působení biogenních aminů na lidský organizmus, je alkohol, který snižuje aktivitu enzymů podílejících se na degradaci BA v trávicím traktu. Vědci [43], [71] hlásí hodnoty v širokém rozsahu pro jednotlivé biogenní aminy i pro celkový obsah BA. Výsledky této studie ukazují, že některé mikroorganismy vyskytující se při výrobě tvarohu produkují BA v množství, které může představovat riziko pro naše zdraví.

ZÁVĚR

Diplomová práce byla zaměřena na posouzení dekarboxylázové aktivity mikroorganismů izolovaných během procesu výroby tvarohů. Cílem této práce bylo pomocí metody vysoce účinné kapalinové chromatografie stanovit obsah biogenních aminů pro 155 izolátů mikroorganismů, které byly získány z jednotlivých fází výroby tvarohu z mlékárny v České republice.

Zjištěné výsledky lze shrnout do následujících bodů:

- produkce biogenních aminů byla zjištěna u všech mikroorganismů izolovaných během výroby tvarohu,
- celkové množství biogenních aminů v analyzovaných mikrobiálních izolátech dosáhlo maximální hodnoty 1971,9 mg/l,
- spermidin nebyl téměř detekován, výjimku tvořily 4 izoláty, kde byl obsah $\leq 2,0$ mg/l,
- u všech testovaných mikroorganismů byla zjištěna produkce tyraminu (155 izolátů) a sperminu (155 izolátů), dále byl detekován tryptamin (100 izolátů), putrescin (96 izolátů), kadaverin (80 izolátů), fenyletylamin (79 izolátů), histamin (18 izolátů) a spermidin (4 izoláty),
- tyramin byl u testovaných izolátů mikroorganismů z tvarohů detekován v nejvyšším množství 1341,4 mg/l, fenyletylamin 629,7 mg/l, putrescin 412,3 mg/l, kadaverin 412,2 mg/l, histamin 159,1 mg/l, spermin 90,5 mg/l, tryptamin 20,6 mg/l a spermidin v koncentraci 2,0 mg/l,
- u některých mikroorganismů izolovaných z jednotlivých fází výroby tvarohu byly zjištěny vysoké hodnoty biogenních aminů (fenyletylamin, putrescin, kadaverin, histamin, tryptamin, spermin), které poukazují na to, že tento obsah biogenních aminů by mohl být lidskému zdraví nebezpečný.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] VYHLÁŠKA č. 77/2003 Sb., kterou se stanoví požadavky pro mléko a mléčné výrobky, mražené krémy a jedlé tuky a oleje. [online]. [cit. 2014-03-11]. Dostupný z <WWW: <http://www.szpi.gov.cz/docDetail.aspx?docid=1006126&docType=ART&nid=11816>>
- [2] GAJDŮŠEK, S. *Mlékařství II*. 1. vyd. Brno: MZLU, 2002. 142 s. ISBN 80-7157-342-6.
- [3] ZADRAŽIL, K. *Mlékařství*. 1. vyd. Praha: Česká zemědělská univerzita, Agronomická fakulta, 2002. 127 s. ISBN 80-86642-15-1.
- [4] BUŇKA, F. *Mlékárenská technologie I*. 1. vyd. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2013. 258 s. ISBN 978-80-7454-254-1.
- [5] KADLEC, P., MELZUCH, K., VOLDŘICH, M. *Přehled tradičních potravinářských výrob: technologie potravin*. 1. vyd. Ostrava: Key Publishing, 2012. 569 s. ISBN 978-80-7418-145-0.
- [6] KADLEC, P. *Technologie potravin II*. 1. vyd. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2002. 236 s. ISBN 80-7080-510-2.
- [7] ODSTRČIL, J., ODSTRČILOVÁ, M. *Chemie potravin*. 1. vyd. Brno: Národní centrum ošetřovatelství a nelékařských zdravotnických oborů, 2006. 164 s. ISBN 80-7013-435-6.
- [8] KADLEC, P.; MELZUCH, K.; VOLDŘICH, M. a kol. *Co byste měli vědět o výrobě potravin?*. Ostrava: KEY Publishing, 2009. 536 s. ISBN 978-80-7418-051-4.
- [9] STRMISKA, J., HUŠEK, V., MINAŘÍK, R. *Výroba tvarohu a tvarohových specialit. Nové technologie*. Praha, Nakladatelství SNTL, 1991. 271 s. ISBN 80-03-00481-0.
- [10] ŠUSTOVÁ, K., SÝKORA, V. *Mlékárenské technologie*. 1. vyd. V Brně: Mendelova univerzita, 2013. 223 s. ISBN 978-80-7375-704-5.
- [11] BOVER-CID, S., HUGAS, M., IZQUIERDO-PULIDO, M., VIDAL-CAROU, M., V. Amino acid-decarboxylase activity of bacteria isolated from fermented pork sausages. *International Journal of Food Microbiology*. 66, 2001. p. 185–189.
- [12] YONGJIN, H., WENSHUI, X., XIAOYONG, L. Changes in biogenic amines in fermented silver carp sausages inoculated with mixed starter cultures. *Food Chemistry*. 104, 2007. p. 188–195.

- [13] ŠILHÁNKOVÁ, L. *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology*. 1. vyd. Praha: Academia, 2008. 363 s. ISBN 978-80-200-1703-1.
- [14] ANYOGUA, A., AWAMARIAA, B., SUTHERLANDA, J.P., OUOBA, L. I. I. Molecular characterisation and antimicrobial activity of bacteria associated with submerged lactic acid cassava fermentation. *Food Control*. 39, 2014. p. 119-127.
- [15] SEDLÁČEK, I. *Taxonomie prokaryot*. 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita, 2007. 270 s. ISBN 80-210-4207-9.
- [16] GÖRNER, F., VALÍK, L. *Aplikovaná mikrobiológia požívatin: princípy mikrobiologie požívatin, potravinarsky vyznamné mikroorganizmy a ich skupiny, mikrobiologia potravinárských výroby, ochorenia mikrobiálneho povodu, ktorých zárodoky sú prenášané požívatinami*. 1. vyd. Bratislava, 2004. 528 s. ISBN 80-9670-649-7.
- [17] *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*. [online]. [cit. 2014-04-04]. Dostupný z <WWW: <http://genome.jgi-psf.org/laccr/laccr.home.html>>
- [18] *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris*. [online]. [cit. 2014-04-04]. Dostupný z <WWW: <http://genome.jgi-psf.org/laccr/leume.home.html>>
- [19] TEPLÝ, M. *Čisté mlékařské kultury*. 1. vyd. Praha: SNTL, 1984. 296 s.
- [20] SUKOVÁ I., *Enterokoky a jejich hodnocení v mlékárenské technologii* [online]. [cit. 2014-04-04]. Dostupný z WWW: <<http://www.agronavigator.cz/default.asp?ids=418&ch=13&typ=1&val=17399>>
- [21] BUŇKOVÁ, L., ADAMCOVÁ, G., HUDCOVÁ, K., VELICHOVÁ, H., PACHLOVÁ, V., LORENCOVÁ, V., BUŇKA, F. Monitoring of biogenic amines in cheeses manufactured at small-scale farms and in fermented dairy products in the Czech Republic. *Food Chemistry*. 141, 2013. p. 548–551.
- [22] NOVICKÁ K., KOMPRDA T. *Biogenní aminy v sterilovaném a pasterovaném taveném sýru*. [online]. [cit. 2014-03-11]. Dostupný z <WWW: <http://mnet.mendelu.cz/mendelnet2004/obsahy/tech/novicka.pdf>>
- [23] VELÍŠEK, J. *Chemie potravin 3*, 1. vyd., Tábor: Osis, 1999. 368 s. ISBN 80-902391-5-3.
- [24] KALAČ, P. *Advances in Food Science and Technology*. Nova Science Publishers, Inc., 2010. chapter 6, The roles of dietary polyamines in human health and their occurrence in foods. p. 91–112.

- [25] LARQUÉ, E., SABATER-MOLINA, M., ZAMORA, S. Biological significance of dietary polyamines. *Nutrition*. 23, 2007. p. 87–95.
- [26] BAI, X., BYUN, B., Y., MAH. J-H. Formation and destruction of biogenic amines in Chunjang (a black soybean paste) and Jajang (a black soybean sauce). *Food Chemistry*. 141, 2013. p. 1026–1031.
- [27] STANDAROVÁ E., BORKOVCOVÁ I., VORLOVÁ L., Obsah biogenních aminů v sýrech z české obchodní sítě. *Veterinářství* 58, 2008. 735–739 s,
- [28] DE LAS RIVAS, B., MARCOBAL, A., MUÑOZ, R. Improved multiplex-PCR method for the simultaneous detection of food bacteria producing biogenic amines. *FEMS Microbiology Letters*. 244, 2005. p. 367–372.
- [29] KOMPRDA, T., BURDYCHOVA, R., DOHNAL, V., CWIKOVA, O., SLADKOVA, P., DVORACKOVA, H. Tyramine production in Dutch-type semi-hard cheese from two different producers. *Food Microbiology*. 25, 2, 2008. p. 219–227.
- [30] PATSIAS, A., CHOULIARA, I., PALEOLOGOS, E. K., SAVVAIDIS, I., KONTOMINAS, M. G. Relation of biogenic amines to microbial and sensory changes of precooked chicken meat stored aerobically and under modified atmosphere packaging at 4 °C. *European Food Research and Technology*. 223, 2006. p. 683–689.
- [31] KALÁČ, P. Biologically active polyamines in beef, pork and meat products: A review. *Meat Science*. 73, 2006. p. 1–11.
- [32] KALÁČ, P. et al. Contents of polyamines in selected foods. *Food Chemistry*. 90, 2005. p. 561–564.
- [33] KALÁČ, P., KRAUSOVÁ, P. A review of dietary polyamines: Formation, implications for growth and health and occurrence in foods. *Food Chemistry*. 90, 2005. p. 219–230.
- [34] McCABE-SELLERS, B. J., STAGGS, C. G., BOGLE, M. L. Tyramine in foods and monoamine oxidase inhibitor drugs: A crossroad where medicine, nutrition, pharmacy, and food industry converge. *Journal of Food Composition and Analysis*. 19, 2006. p. S58–S65.

- [35] ROIG-SAGUÉS, A.X., RUIZ-CAPILLAS, C., ESPINOSA, D., HERNÁNDEZ, M. The decarboxylating bacteria present in foodstuffs and the effect of emerging technologies on their formation. *Biological Aspects of Biogenic Amines, Polyamines and Conjugates*. 2009.
- [36] KALÁČ, P., GLÓRIA, M.B.A. Biogenic amines in cheeses, wines, beers and sauerkraut. *Biological Aspects of Biogenic Amines, Polyamines and Conjugates*. 2009. p. 267–309.
- [37] LORENCOVÁ E., BUŇKOVÁ L., PLEVA P., BUŇKA F., MATOULKOVÁ D., DRÁB V. In vitro produkce biogenních aminů technologicky významnými bakteriemi mléčného kvašení. In: Sborník Konference *Proteiny 2011*. 3.–4.5.2011. Zlín, s. 70–74.
- [38] ANCÍN-AZPILICUETA, C., GONZÁLEZ-MARCO, A., JIMÉNEZ-MORENO, N. Current knowledge about the presence of amines in wine. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 48, 2008. p. 257–275.
- [39] ANLI, R., E.; BAYRAM, M. Biogenic Amines in Wines. *Food Reviews International*. 25, 1, 2009. p. 86–102.
- [40] SMĚLÁ D., PECHOVÁ P., KOMPRDA T., KLEJDUS B., KUBÁŇ V., Chromatografické stanovení biogenních aminů v trvanlivých salámech během fermentace a skladování. *Chemické listy* 98, 2004. 432–437s.
- [41] KOMPRDA, T. *Obecná hygiena potravin*. Brno: MZLU, 2004. 145 s. ISBN 978-80-7157-757-7.
- [42] VYHLÁŠKA č. 305/2004 Sb., kterou se stanoví druhy kontaminujících a toxikologicky významných látek a jejich přípustné množství v potravinách. [online]. [cit. 2014-03-11]. Dostupný z <WWW: <http://www.szpi.gov.cz/docDetail.aspx?docid=1006047&nid=11816&hl=VYHL%C3%81%C5%A0KA%20%C4%8D.%20305/2004%20Sb>>
- [43] SILLA SANTOS, H. M. Biogenic amines: their importance in foods. *International Journal of Food Microbiology*. 29, 1996. p. 213–231. ISSN 0168-1605.
- [44] EFSA. Scientific Opinion on risk based control of biogenic amine formation in fermented foods. *EFSA Journal* [online]. 2011, roč. 9, č. 10, 93 s. [cit. 2014-03-20]. Dostupné z: <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/2393.pdf>

- [45] KONIG, H., UNDEN, G., FRÖHLICH, J. *Biology of microorganisms on grapes, in must and in wine*. Berlin: 2009. p. 522. Chapter 1, Lactic Acid Bacteria, p. 3–29. ISBN 978-3-540-85462-3.
- [46] STRATTON, J. E., HUTKINS, R., W., TAYLOR, S. L.. Histamine production in low – salt Cheddar cheese. *Journal of Food Protection*. 54, 1991. p. 852–867.
- [47] 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*. 147, 2011. p. 112–119. ISSN: 0168-1605.
- [48] KLOUDA, P. *Moderní analytické metody*. 2. vyd., Ostrava, 2003. 132 s, ISBN 978-80-86369-07-5.
- [49] ÖNAL, A.: A review: Current analytical methods for the determination of biogenic amines in foods. *Food Chemistry*. 104, 4, 2007. p. 1475–1486.
- [50] BUŇKOVÁ, L., BUŇKA, F., HLOBILOVÁ, M., DRÁB, V., KRÁČMAR, S. Komparace různých metod detekce dekarboxylázové aktivity u bakterií mléčného kvašení. *Potravinářstvo*, ročník 4, mimořádné číslo, 2010. 372–380 s.
- [51] LANDETE, J., M., RIVAS, B., MARCOBAL, A., MUÑOZ, R.: Molecular methods for detection of bacteria producing biogenic amines on foods. *International Journal of Food Microbiology*. 117, 3, 2007, p. 258–269.
- [52] ERIM, F., B. Recent analytical approaches to the analysis of biogenic amines in food samples. *Trends in Analytical Chemistry*. 52, 2013. p. 239–247.
- [53] KUBÁŇ, V., KUBÁŇ, P. *Analýza potravin*. 1. vyd. V Brně: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, 2007. 202 s. ISBN 978-80-7375-036-7.
- [54] ŠTULÍK, K. a kolektiv. *Analytické separační metody*. Praha: Nakladatelství Karolinum. 2005. 264 s. ISBN 80-246-0852-9.
- [55] LAPA-GUIMARÃES J., PICKOVA J. New solvent system for thinlayer chromatographic determination of nine biogenic amines in fish and squid. *Journal of Chromatography A*. 1045, 1-2, 2004. p. 223–232.
- [56] AWAN, M., A., FLEET, I., THOMAS C., L., P. Determination of biogenic diamines with a vaporisation derivatisation approach using solid-phase microextraction gas chromatography–mass spectrometry. *Food Chemistry*. 111, 2, 2008. p. 462–468.

- [57] MALINA, A., BRYANT, S., K., CHANG, S., H., WALDROP, G., L., GILMAN, S., D. Capillary electrophoresis-based assay of phosphofructokinase-1. *Analytical Biochemistry*. 447, 2014, p. 1–5.
- [58] HYVÄRINEN, S., MIKKOLA, J., P., MURZIN, D., YU., VAHER, V., KALJURAND M., KOEL, M. Sugars and sugar derivatives in ionic liquid media obtained from lignocellulosic biomass: Comparison of capillary electrophoresis and chromatographic analysis. *Catalysis Today*. 223, 2014. p. 18–24.
- [59] DADÁKOVÁ, E., KRÍŽEK, M., PELIKÁNOVÁ, T. Determination of biogenic amines in food using ultra-performance liquid chromatography (UPLC). *Food Chemistry*. 116, 2009. p. 365–370.
- [60] ZOTOU, A., LOUKOU, Z., SOUFLEROS, E., & STRATIS, I. Determination of biogenic amines in wines and beers by high performance liquid chromatography with pre-column dansylation and ultraviolet detection. *Chromatographia*. 57, 7–8, 2003. p. 429–439.
- [61] LORENCOVÁ, E., BUŇKOVÁ L., MATOULKOVÁ, D. DRÁB V., PLEVA, P., KUBÁŇ, V. a BUŇKA, F. Production of biogenic amines by lactic acid bacteria and bifidobacteria isolated from dairy products and beer. *International Journal of Food Science and Technology*. 47, 10, 2012. p. 2086–2091.
- [62] KALÁČ, P., KRÍŽEK, M. A review of biogenic amines and polyamines in beer. *Journal of the Institute of Brewing*. 109, 2003. p. 123–128.
- [63] GLORIA, B., SARAIVA, P., RIGUEIRA, J. BRANDÃO, S. Bioactive amines changes in raw and sterilised milk inoculated with *Pseudomonas fluorescens* stored at different temperatures. *International Journal of Dairy Technology*. 64, 1, 2011. p. 45–51.
- [64] BUŇKOVÁ, L., BUŇKA, F., HLOBILOVÁ, M., VAŇÁKOVÁ, Z., NOVÁKOVÁ, D. DRÁP, V. Tyramine production of technological important strains of *Lactobacillus*, *Lactococcus* and *Streptococcus*. *European Food Research and Technology*. 229, 3, 2009. p. 553–538.
- [65] DE ROBERTIS, A., DE STEFANO, C., GIANGUZZA, SAMMARTANO, S. Binding of polyanions by biogenic amines. III. Formation and stability of protonated spermidine and spermine complexes with carboxylic ligands. *Talanta*. 48, 1, 1999. p. 119–126.

- [66] DRABIK-MARKIEWICZ, G., DEJAEGHER, B., DE MEYA, E., KOWALSKA, T., PAELINCKA, H., VANDER HEYDEN, Y. Influence of putrescine, cadaverine, spermidine or spermine on the formation of *N*-nitrosamine in heated cured pork meat. *Food Chemistry*. 126, 2011. p. 1539–1545.
- [67] DANG, A., PESEK, J. J., MATYSKA, M. T. The use of aqueous normal phase chromatography as an analytical tool for food analysis: Determination of histamine as a model system. *Food Chemistry*. 141, 4, 2013. p. 4226–4230.
- [68] TSAI, Y-H., KUNG, H-F., CHEN, H-CH., CHANG, S-CH., HSU, H-H., WEI, CH-I. Determination of histamine and histamine-forming bacteria in dried milkfish (*Chanos chanos*) implicated in a food-borne poisoning. *Food Chemistry*. 105, 3, 2007. p. 1289–1296.
- [69] LEHANE, L., OLLEY, J. Histamine fish poisoning revisited. *International Journal of Food Microbiology*. 58, 1-2, 2000. p. 1–37.
- [70] NAŘÍZENÍ KOMISE (ES) 2073/2005 ze dne 15. listopadu 2005 o mikrobiologických kritériích pro potraviny. In Úřední věstník Evropské unie. 2005, L 338, s. 1-26. [online]. [cit. 2014-03-11]. Dostupný z <WWW: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2005:338:0001:0026:CS:PDF>>
- [71] SHALABY, A.R. Significance of biogenic amines to food safety and human health. *Food Research International*. 29, 1996. p. 675–69.
- [72] BRINK, B., DAMINK, C., JOOSTEN H.M.L.J. AND HUIS IN'T VELD, J.H.J. Occurrence and formation of biologically active amines in foods. *International Journal of Food Microbiology*. 11, 1990. p. 73–84.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

AE	aerobně (s přístupem vzduchu)
AMK	aminokyselina
AN	anaerobně (bez přístupu vzduchu)
BA	biogenní aminy.
BHI	Brain Heart Infusion agar
BMK	bakterie mléčného kvašení
CE	kapilární elektroforéza (Capillary Electrophoresis)
ČMK	čisté mlékařské kultury
GC	plynová chromatografie (Gas Chromatography)
GTK	živná půda s glukózou, tryptonem a kvasničným extraktem
HPLC	vysoce účinná kapalinová chromatografie (High Performance Liquid Chromatography)
RCM	Reinforced Clostridial Broth
TLC	tenkovrstvá chromatografie (Thin Layer Chromatography)
TYA	Tryptone Glukose Extrakt Agar
M_r	relativní molekulová hmotnost

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1 Schéma výroby tvarohu odstředivkovým způsobem (upraveno podle Kadlec [6]).	16
Obr. 2 <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> [17].	19
Obr. 3 <i>Leuconostoc mesenteroides</i> [18].	20
Obr. 4 Dekarboxylace lyzinu a histidinu [27].	25
Obr. 5 Dekarboxylace a další reakce argininu [23].	26
Obr. 6 Dekarboxylace fenylalaninu a tryptofanu [23].	26
Obr. 7 Centrifuga Rotanta 460R.	43
Obr. 8 Příprava vzorků na derivatizaci.	43
Obr. 9 Produkce biogenních aminů u mikroorganismů izolovaných z tvarohů skupiny I během fáze A.	47
Obr. 10 Produkce biogenních aminů u mikroorganismů izolovaných z tvarohů skupiny I během fáze B.	47
Obr. 11 Produkce biogenních aminů u mikroorganismů izolovaných z tvarohů skupiny I během fáze C.	48
Obr. 12 Produkce biogenních aminů u mikroorganismů izolovaných z tvarohů skupiny I během fáze D – výroba 1.	49
Obr. 13 Produkce biogenních aminů u mikroorganismů izolovaných z tvarohů skupiny I během fáze D – výroba 2.	50
Obr. 14 Produkce biogenních aminů u mikroorganismů izolovaných z tvarohů skupiny I během fáze E – výroba 1.	51
Obr. 15 Produkce biogenních aminů u mikroorganismů izolovaných z tvarohů skupiny I během fáze E – výroba 2.	51
Obr. 16 Produkce biogenních aminů u mikroorganismů izolovaných z tvarohů skupiny I během fáze F – výroba 1.	52
Obr. 17 Produkce biogenních aminů u mikroorganismů izolovaných z tvarohů skupiny I během fáze F – výroba 2.	52
Obr. 18 Produkce biogenních aminů u mikroorganismů izolovaných z tvarohů skupiny I během fáze G – výroba 1/1.	53
Obr. 19 Produkce biogenních aminů u mikroorganismů izolovaných z tvarohů skupiny I během fáze G – výroba 2/1.	54
Obr. 20 Produkce biogenních aminů u mikroorganismů izolovaných z tvarohů skupiny I během fáze G – výroba 1/14.	55

Obr. 21 Produkce biogenních aminů u mikroorganismů izolovaných z tvarohů skupiny I během fáze G – výroba 2/14.....	55
Obr. 22 Produkce biogenních aminů u mikroorganismů izolovaných z tvarohů skupiny I během fáze G – výroba 1/25.....	56
Obr. 23 Produkce biogenních aminů u mikroorganismů izolovaných z tvarohů skupiny I během fáze G – výroba 2/25.....	56
Obr. 24 Produkce biogenních aminů u mikroorganismů izolovaných z tvarohů skupiny II během fáze A.....	57
Obr. 25 Produkce biogenních aminů u mikroorganismů izolovaných z tvarohů skupiny II během fáze B.....	58
Obr. 26 Produkce biogenních aminů u mikroorganismů izolovaných z tvarohů skupiny II během fáze C.....	58
Obr. 27 Produkce biogenních aminů u mikroorganismů izolovaných z tvarohů skupiny II během fáze D – výroba 1.....	59
Obr. 28 Produkce biogenních aminů u mikroorganismů izolovaných z tvarohů skupiny II během fáze D – výroba 2.....	60
Obr. 29 Produkce biogenních aminů u mikroorganismů izolovaných z tvarohů skupiny II během fáze E – výroba 1.....	61
Obr. 30 Produkce biogenních aminů u mikroorganismů izolovaných z tvarohů skupiny II během fáze E – výroba 2.....	61
Obr. 31 Produkce biogenních aminů u mikroorganismů izolovaných z tvarohů skupiny II během fáze F – výroba 1.....	62
Obr. 32 Produkce biogenních aminů u mikroorganismů izolovaných z tvarohů skupiny II během fáze F – výroba 2.....	63
Obr. 33 Produkce biogenních aminů u mikroorganismů izolovaných z tvarohů skupiny II během fáze G – výroba 1/1.....	64
Obr. 34 Produkce biogenních aminů u mikroorganismů izolovaných z tvarohů skupiny II během fáze G – výroba 2/1.....	64
Obr. 35 Produkce biogenních aminů u mikroorganismů izolovaných z tvarohů skupiny II během fáze G – výroba 1/25.....	65
Obr. 36 Produkce biogenních aminů u mikroorganismů izolovaných z tvarohů skupiny II během fáze G – výroba 2/25.....	65

SEZNAM TABULEK

Tab. 1 Klasifikace tvarohu podle konzistence a obsahu tuku v sušině [1].....	14
Tab. 2 Členění tvarohů na druhy, skupiny a podskupiny [1].	15
Tab. 3 Biogenní aminy, prekurzory, produkty transformace a biologický význam [23].	24
Tab. 4 Rozsah použitelnosti HPLC ve srovnání s ostatními metodami [54].....	30
Tab. 5 Charakteristika vzorků, ze kterých byly izolovány mikroorganismy.	34
Tab. 6 Schematické rozlišení pro různé podmínky kultivace.....	35
Tab. 7 Testované mikroorganismy izolované z tvarohu - skupina I, výroba č. 1 a podmínky jejich kultivace.....	36
Tab. 8 Testované mikroorganismy izolované z tvarohu - skupina I, výroba č. 2 a podmínky jejich kultivace.....	37
Tab. 9 Testované mikroorganismy izolované z tvarohu - skupina II, výroba č. 1 a podmínky jejich kultivace.....	38
Tab. 10 Testované mikroorganismy izolované z tvarohu - skupina II, výroba č. 2 a podmínky jejich kultivace.....	40
Tab. 11 Lineární gradientový eluční program HPLC.....	45

SEZNAM PŘÍLOH

PŘÍLOHA I

PŘÍLOHA II

PŘÍLOHA III

PŘÍLOHA IV

PŘÍLOHA I

Tabulka P1: Obsah biogenních aminů (mg/l) u mikroorganismů izolovaných během výroby tvarohu (skupina I – výroba 1)

Izolát	Tryptamin	Fenyletylamin	Putrescin	Kadaverin	Histamin	Tyramin	Spermidin	Spermin
V1	ND*	ND*	2,4±0,7	ND*	ND*	43,8±2,8	ND*	27,7±3,0
V2	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	53,0±3,9	ND*	58,9±6,1
V3	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	17,0±0,9	ND*	13,3±0,8
V4	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	51,9±3,9	ND*	79,1±7,3
V5	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	34,2±4,6	ND*	58,6±6,2
V6	13,4±2,0	ND*	ND*	ND*	ND*	23,3±6,7	ND*	16,8±6,1
V7	13,9±2,0	ND*	ND*	ND*	ND*	20,6±2,5	ND*	15,2±1,9
V8	2,5±0,4	ND*	4,3±0,2	ND*	ND*	40,7±5,8	ND*	30,1±3,0
V9	9,5±2,0	63,0±47,9	ND*	ND*	ND*	13,8±3,5	ND*	8,8±0,3
V10	12,5±1,7	ND*	ND*	ND*	ND*	43,4±4,0	ND*	56,4±9,8
V11	9,8±1,5	ND*	6,0±0,4	9,5±1,4	ND*	19,8±2,7	ND*	19,2±2,4
V12	2,0±1,0	ND*	1,7±0,4	1,4±0,2	ND*	17,6±1,4	ND*	8,5±0,6
V13	3,7±0,2	ND*	ND*	ND*	ND*	10,9±0,5	ND*	9,2±0,4
V14	ND*	ND*	16,3±1,9	ND*	ND*	43,7±7,0	ND*	74,8±15,9
V15	4,8±0,2	ND*	ND*	ND*	ND*	31,6±2,5	ND*	23,1±1,2
V16	4,0±0,2	ND*	ND*	ND*	ND*	42,2±3,7	ND*	32,6±3,0
V17	10,7±3,4	120,5±12,7	ND*	ND*	ND*	1218,4±59,9	ND*	2,3±0,5
V18	14,4±1,1	ND*	ND*	12,4±1,0	ND*	34,8±3,8	ND*	33,5±3,3
V19	20,6±1,2	4,3±0,6	6,2±0,4	11,0±1,0	2,4±0,2	35,0±3,1	ND*	26,7±2,7
V20	16,2±0,5	3,1±0,4	5,4±0,1	8,2±0,7	ND*	28,6±1,3	ND*	21,7±0,9
V21	15,4±0,7	3,5±0,2	6,1±0,5	7,8±0,7	ND*	28,2±1,2	ND*	24,7±0,9
V22	8,9±1,4	95,3±15,5	3,0±0,4	6,3±0,5	1,2±0,1	1132,0±100,6	1,9±0,2	2,0±0,6
V23	14,2±1,7	ND*	10,4±1,7	412,2±24,8	4,0±0,8	34,7±8,2	ND*	29,8±7,3

Tabulka P1 - pokračování: Obsah biogenních aminů (mg/l) u mikroorganismů izolovaných během výroby tvarohu (skupina I – výroba 1)

Izolát	Tryptamin	Fenyletylamin	Putrescin	Kadaverin	Histamin	Tyramin	Spermidin	Spermin
V24	8,4±1,3	23,7±3,9	3,3±0,8	8,3±2,5	ND*	869,0±59,7	1,9±0,3	6,0±0,5
V25	12,0±2,8	ND*	5,4±1,1	7,8±1,7	ND*	25,4±5,9	ND*	22,7±5,3
V26	13,8±1,0	ND*	6,1±0,7	10,1±1,0	ND*	32,7±7,8	ND*	30,5±7,9
V27	6,4±1,3	106,9±7,6	2,7±0,5	5,0±0,4	ND*	1114,6±56,1	ND*	1,8±0,3
V28	8,1±1,2	11,8±1,0	ND*	5,4±0,6	ND*	745,5±74,5	ND*	9,1±1,6
V29	10,3±1,8	3,7±0,3	2,4±0,1	5,9±0,5	ND*	195,6±7,5	ND*	18,4±1,1
V30	14,6±0,9	3,2±0,4	4,3±0,4	7,5±0,5	ND*	27,1±5,4	ND*	21,1±4,6
V31	5,5±0,6	4,9±0,4	3,8±0,3	ND*	ND*	29,3±2,3	ND*	21,3±1,6
V32	7,0±1,3	87,3±9,1	ND*	5,3±0,7	ND*	1043,0±79,8	ND*	1,3±0,1
V33	8,2±0,8	10,9±0,8	2,1±0,1	5,7±0,2	ND*	660,8±10,2	ND*	8,0±0,4
V34	14,6±1,6	3,6±0,2	4,2±0,4	7,5±0,8	ND*	32,0±4,1	ND*	23,3±3,1
V35	2,7±0,7	ND*	1,3±0,3	1,7±0,1	ND*	43,8±2,2	ND*	32,9±1,9
V36	2,2±0,5	ND*	1,9±0,2	1,9±0,2	ND*	40,7±2,7	ND*	27,5±1,9
V37	ND*	ND*	5,2±3,2	1,7±0,3	ND*	64,5±7,6	ND*	32,4±6,0
V38	14,6±1,9	ND*	3,8±0,5	10,1±1,0	ND*	34,8±3,7	ND*	31,8±4,5
V39	16,1±2,4	3,7±0,5	4,1±0,5	9,5±2,6	ND*	66,9±27,4	ND*	29,1±3,7
V40	1,9±0,3	ND*	1,9±0,7	2,1±0,6	ND*	39,4±3,1	ND*	21,4±2,3
V41	6,4±1,3	160,8±26,4	1,9±0,3	3,9±0,7	ND*	934,2±137,0	ND*	2,2±0,5
V42	5,5±0,9	47,0±20,4	60,1±85,4	5,5±1,2	ND*	1080,6±75,3	ND*	2,5±1,0
V43	14,9±0,7	3,9±0,2	3,9±0,4	6,3±2,9	ND*	41,9±6,2	ND*	36,7±6,1
V44	14,2±1,9	5,1±0,7	3,4±0,5	8,1±0,8	ND*	235,4±13,9	ND*	19,2±2,7
V45	4,0±0,6	ND*	2,6±0,3	165,1±20,9	3,7±0,6	41,1±5,7	ND*	30,4±3,6

*ND – biogenní amin nedetekován

Množství biogenních aminů vyjádřeno jako průměr ± směrodatná odchylka (n = 6)

Tabulka P2: Obsah biogenních aminů (mg/l) u mikroorganismů izolovaných během výroby tvarohu (skupina I – výroba 2)

Izolát	Tryptamin	Fenyletylamin	Putrescin	Kadaverin	Histamin	Tyramin	Spermidin	Spermin
V46	2,9±0,7	ND*	ND*	1,5±0,2	ND*	28,5±2,1	ND*	23,3±1,5
V47	ND*	ND*	ND*	1,6±0,3	ND*	47,6±1,7	ND*	25,2±0,6
V48	13,9±1,4	ND*	3,9±0,4	7,6±1,0	1,2±0,1	29,1±3,6	ND*	23,1±2,4
V49	15,4±0,4	3,3±0,2	3,9±0,3	6,4±0,7	ND*	26,9±2,0	ND*	24,5±2,4
V50	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	38,1±5,0	ND*	26,0±2,9
V51	5,0±0,2	5,0±0,3	3,7±0,4	ND*	ND*	25,0±2,7	ND*	24,6±3,2
V52	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	28,5±4,8	ND*	16,8±3,3
V53	6,7±0,7	28,2±0,9	2,5±0,2	ND*	ND*	942,4±30,2	1,8±0,5	4,3±0,7
V54	13,2±0,8	ND*	228,0±24,3	31,9±3,3	ND*	21,3±2,0	ND*	16,7±0,7
V55	9,3±2,5	19,1±4,6	3,9±1,6	6,7±1,9	ND*	766,4±122,1	ND*	8,3±1,8
V56	5,7±0,5	30,5±2,3	1,9±0,1	4,7±0,4	ND*	888,9±31,4	ND*	3,0±0,1
V57	12,8±1,1	ND*	8,5±0,5	361,2±25,0	ND*	25,5±3,4	ND*	23,3±4,0
V58	9,6±0,4	16,6±1,4	ND*	7,2±1,0	ND*	896,5±71,9	ND*	8,5±1,2
V59	16,1±1,1	3,9±0,3	7,9±1,6	8,8±1,2	ND*	31,3±4,9	ND*	24,3±3,9
V60	4,7±0,7	9,6±0,5	3,2±1,0	ND*	ND*	40,9±0,4	ND*	26,0±0,4
V61	ND*	ND*	6,5±1,8	ND*	ND*	29,2±5,4	ND*	29,2±5,7
V62	ND*	33,9±1,3	ND*	7,1±0,9	ND*	1078,4±23,5	ND*	1,7±0,2
V63	ND*	15,0±0,5	2,5±0,3	ND*	ND*	778,7±10,2	ND*	9,1±0,3
V64	ND*	20,6±2,6	ND*	ND*	ND*	668,5±45,1	ND*	10,0±1,0
V65	ND*	ND*	6,2±2,3	ND*	ND*	31,5±4,7	ND*	23,0±3,1
V66	ND*	ND*	13,6±0,8	ND*	ND*	32,3±4,6	ND*	21,2±3,2
V67	11,3±1,6	ND*	ND*	ND*	ND*	20,3±3,0	ND*	15,7±2,9
V68	2,9±0,4	ND*	7,2±1,7	ND*	ND*	40,8±3,6	ND*	24,9±1,2

Tabulka P2 - pokračování: Obsah biogenních aminů (mg/l) u mikroorganismů izolovaných během výroby tvarohu (skupina I – výroba 2)

Izolát	Tryptamin	Fenyletylamin	Putrescin	Kadaverin	Histamin	Tyramin	Spermidin	Spermin
V69	ND*	ND*	409,0±18,2	31,1±1,6	ND*	42,8±5,6	ND*	29,4±3,5
V70	ND*	134,6±8,0	ND*	ND*	ND*	1102,1±56,8	ND*	1,4±0,2
V71	ND*	25,3±1,6	2,3±0,1	4,4±0,4	ND*	1144,2±59,2	ND*	3,9±0,6
V72	9,9±0,6	6,7±0,3	ND*	6,8±0,5	ND*	246,9±6,7	ND*	20,5±1,8
V73	8,9±0,8	7,7±1,0	ND*	5,6±0,3	ND*	393,4±14,3	ND*	21,3±3,1
V74	13,0±0,8	84,2±5,7	3,6±0,7	7,4±1,2	ND*	33,6±5,2	ND*	25,5±4,5
V75	10,5±2,0	2,6±0,5	3,9±0,8	4,9±1,2	ND*	23,2±3,9	ND*	29,5±5,2

*ND – biogenní amin nedetekován

Množství biogenních aminů vyjádřeno jako průměr ± směrodatná odchylka (n = 6)

PŘÍLOHA II

Tabulka P3: Obsah biogenních aminů (mg/l) u mikroorganismů izolovaných během výroby tvarohu (skupina II – výroba 1)

Izolát	Tryptamin	Fenyletylamin	Putrescin	Kadaverin	Histamin	Tyramin	Spermidin	Spermin
V76	ND*	529,0±23,4	5,7±0,4	ND*	ND*	1255,1±32,3	ND*	1,3±0,2
V77	3,1±0,5	ND*	3,8±3,4	ND*	ND*	34,0±2,9	ND*	42,9±3,0
V78	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	21,9±1,4	ND*	38,6±2,3
V79	ND*	ND*	204,3±37,7	ND*	ND*	52,0±7,8	ND*	41,1±9,9
V80	7,1±1,2	44,8±9,0	155,0±15,6	36,0±11,3	ND*	908,7±103,3	ND*	2,8±0,9
V81	8,8±1,0	47,3±13,5	3,4±0,2	6,8±0,7	2,7±0,3	991,9±54,8	ND*	3,0±0,4
V82	10,7±2,0	6,5±9,0	43,2±80,9	6,6±1,4	ND*	263,9±293,6	ND*	18,5±12,2
V83	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	115,7±17,6	ND*	25,8±4,5
V84	ND*	ND*	13,3±2,0	ND*	ND*	46,2±2,6	ND*	84,2±4,3
V85	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	68,0±5,2	ND*	69,3±4,6
V86	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	195,7±165,1	ND*	60,7±18,1
V87	3,7±0,6	ND*	329,2±12,0	ND*	ND*	68,2±25,0	ND*	68,9±18,2
V88	3,2±1,2	ND*	412,3±41,8	ND*	15,6±11,7	355,8±14,6	ND*	43,3±5,8
V89	12,3±3,3	13,1±15,4	111,6±137,2	ND*	9,5±10,0	391,7±489,2	ND*	21,7±17,8
V90	10,0±7,1	16,6±3,8	199,3±63,9	ND*	ND*	597,6±67,2	ND*	9,3±2,3
V91	12,2±1,6	ND*	178,5±133,6	11,9±1,5	ND*	567,3±421,3	ND*	8,5±6,8
V92	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	39,1±3,6	ND*	40,1±10,2
V93	ND*	ND*	24,5±9,8	212,0±79,7	ND*	24,6±6,4	ND*	30,9±9,2
V94	ND*	ND*	262,7±54,3	ND*	ND*	75,0±8,0	ND*	64,6±7,7
V95	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	86,5±31,6	ND*	66,4±3,4
V96	ND*	ND*	366,9±49,0	ND*	ND*	460,7±32,2	ND*	38,3±8,6
V97	ND*	83,5±13,0	ND*	ND*	ND*	1099,3±63,2	ND*	1,5±0,2
V98	8,1±1,1	37,8±5,5	123,6±11,2	6,8±0,5	3,8±0,3	902,9±73,2	ND*	3,5±0,8
V99	16,3±2,1	ND*	ND*	ND*	ND*	40,9±2,7	ND*	39,9±5,5

Tabulka P3 - pokračování: Obsah biogenních aminů (mg/l) u mikroorganismů izolovaných během výroby tvarohu (skupina II – výroba 1)

Izolát	Tryptamin	Fenyletylamin	Putrescin	Kadaverin	Histamin	Tyramin	Spermidin	Spermin
V100	17,9±1,3	4,3±0,5	4,8±0,9	8,4±0,5	4,7±0,7	38,0±3,2	ND*	29,4±2,6
V101	9,5±1,3	12,0±1,1	183,1±21,7	ND*	ND*	537,3±63,0	ND*	8,5±2,0
V102	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	30,5±2,9	ND*	37,4±3,7
V103	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	35,5±4,7	ND*	42,4±5,5
V104	9,8±0,5	97,4±9,7	ND*	ND*	ND*	1030,7±37,6	ND*	2,3±0,3
V105	8,5±0,4	125,0±18,4	ND*	ND*	ND*	915,5±128,3	ND*	1,1±0,2
V106	10,8±1,2	15,9±1,5	3,9±0,6	8,7±0,4	3,4±0,7	715,8±68,6	ND*	16,1±3,2
V107	13,4±1,9	1,2±0,1	4,7±0,5	10,5±0,8	ND*	41,4±6,2	ND*	42,6±5,9
V108	12,5±1,0	ND*	6,3±1,0	10,0±0,8	ND*	22,9±1,9	ND*	20,1±2,4
V109	11,3±2,9	6,7±1,2	4,6±0,5	7,8±0,8	ND*	697,4±30,3	ND*	8,3±0,6
V110	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	35,2±2,3	ND*	28,2±2,6
V111	ND*	99,3±4,4	ND*	ND*	ND*	1135,8±47,9	ND*	1,8±0,3
V112	9,7±1,0	29,5±3,1	4,4±0,6	7,1±0,5	3,1±0,3	890,6±71,3	ND*	4,3±0,4
V113	14,6±1,3	1,6±0,2	4,6±0,3	9,8±0,6	2,4±0,1	37,6±3,9	ND*	37,4±3,9
V114	10,8±0,7	13,9±2,2	3,9±0,6	7,9±0,6	3,9±0,8	609,9±71,6	ND*	16,2±3,7
V115	ND*	24,8±5,6	5,9±1,8	8,2±1,5	ND*	997,8±95,2	ND*	2,0±0,3
V116	7,3±0,7	62,0±7,8	ND*	ND*	ND*	1033,1±67,8	ND*	2,0±0,6
V117	8,8±1,1	30,1±3,1	3,1±0,5	7,0±0,6	2,6±0,6	911,3±55,6	ND*	2,4±0,3
V118	11,0±1,7	15,3±3,3	262,8±45,8	7,5±2,6	ND*	652,5±70,4	ND*	18,1±2,0
V119	11,0±1,6	14,4±1,7	3,6±0,6	8,4±1,0	ND*	643,6±109,2	ND*	13,4±2,6
V120	13,0±2,4	21,1±4,7	334,3±100,3	29,3±8,0	ND*	831,4±97,7	ND*	8,8±4,2
V121	15,5±3,4	ND*	6,4±2,0	10,6±2,0	ND*	517,7±368,7	ND*	17,4±3,5
V122	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	30,6±4,0	ND*	32,1±7,6
V123	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	37,7±5,3	ND*	46,7±8,4
V124	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	330,7±13,0	ND*	61,4±7,9
V125	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	25,7±3,3	ND*	18,2±6,2
V126	ND*	ND*	7,8±2,4	ND*	ND*	24,4±2,0	ND*	15,4±1,6
V127	ND*	629,7±28,5	ND*	ND*	ND*	1341,4±28,2	ND*	0,8±0,1

*ND – biogenní amin nedetekován,

Množství biogenních aminů vyjádřeno jako průměr ± směrodatná odchylka (n = 6)

Tabulka P4: Obsah biogenních aminů (mg/l) u mikroorganismů izolovaných během výroby tvarohu (skupina II – výroba 2)

Izolát	Tryptamin	Fenyletylamin	Putrescin	Kadaverin	Histamin	Tyramin	Spermidin	Spermin
V128	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	48,0±8,9	ND*	90,5±19,9
V129	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	39,9±3,7	ND*	64,4±5,8
V130	ND*	383,6±17,0	ND*	ND*	ND*	1217,6±87,5	ND*	1,4±0,4
V131	11,3±3,0	43,7±45,7	163,5±16,2	12,3±3,1	9,4±1,8	542,4±547,3	ND*	13,1±13,1
V132	9,6±2,2	238,2±33,5	4,8±1,0	7,4±0,5	ND*	1151,1±96,4	ND*	1,7±0,4
V133	12,5±1,5	36,1±6,4	4,1±0,3	7,5±1,0	ND*	1037,2±81,3	ND*	1,7±0,2
V134	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	20,3±1,4	ND*	33,8±2,3
V135	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	30,1±1,9	ND*	39,0±3,9
V136	ND*	402,4±16,9	ND*	ND*	ND*	1124,9±46,9	ND*	1,4±0,5
V137	17,7±2,3	75,0±25,4	10,6±1,3	ND*	159,1±31,3	970,6±113,6	ND*	1,1±0,3
V138	8,4±1,1	199,5±14,9	139,1±75,3	6,9±0,6	ND*	1266,6±47,6	ND*	1,6±0,7
V139	12,3±0,5	ND*	5,3±0,4	9,6±0,7	ND*	21,3±1,1	ND*	24,5±1,9
V140	10,9±1,5	ND*	5,0±0,3	8,8±1,0	ND*	22,9±3,6	ND*	23,4±3,3
V141	ND*	263,4±45,2	4,1±1,5	ND*	ND*	1053,1±65,5	ND*	1,3±0,2
V142	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	34,4±3,9	ND*	31,4±3,5
V143	8,3±1,2	395,4±133,1	5,6±1,3	5,8±1,5	ND*	1146,0±126,6	ND*	1,2±0,1
V144	8,8±2,4	13,7±2,2	3,2±0,4	7,2±0,8	2,7±0,3	619,0±57,6	ND*	11,1±1,8
V145	8,2±0,6	204,4±12,5	4,5±0,8	6,8±0,4	ND*	1155,5±39,5	ND*	1,4±0,5
V146	8,5±1,9	272,1±22,5	ND*	5,8±1,8	ND*	1220,1±114,7	ND*	1,1±0,2
V147	12,7±1,0	ND*	180,9±136,1	9,7±1,2	ND*	132,5±87,6	ND*	14,9±2,9
V148	10,7±2,7	25,1±6,4	211,5±11,3	94,6±14,9	ND*	976,3±57,9	ND*	2,6±1,0
V149	9,0±1,2	437,6±14,9	ND*	ND*	ND*	1138,0±29,6	2,0±0,2	1,5±0,4

Tabulka P4 - pokračování: Obsah biogenních aminů (mg/l) u mikroorganismů izolovaných během výroby tvarohu (skupina II – výroba 2)

Izolát	Tryptamin	Fenyletylamin	Putrescin	Kadaverin	Histamin	Tyramin	Spermidin	Spermin
V150	6,6±2,0	178,5±21,8	4,7±1,1	6,8±0,7	ND**	1282,0±94,9	ND*	1,2±0,3
V151	12,9±0,6	ND*	6,7±1,4	9,5±0,8	ND*	29,7±1,0	ND*	28,4±1,6
V152	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	26,0±2,0	ND*	28,0±7,1
V153	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	50,3±7,5	ND*	44,7±11,2
V154	ND*	ND*	ND*	ND*	ND*	27,6±1,7	ND*	32,1±3,9
V155	ND*	356,5±39,5	ND*	ND*	ND*	1294,5±84,7	ND*	1,1±0,4

*ND – biogenní amin nedetekován

Množství biogenních aminů vyjádřeno jako průměr ± směrodatná odchylka (n = 6)

PŘÍLOHA III

Tabulka P5: Celkový obsah biogenních aminů (mg/l) u mikroorganismů izolovaných během výroby tvarohu (skupina I)

Fáze výroby	Izolát	Celkový obsah BA	
A	V1	73,9	
	V2	111,9	
B	V3	30,3	
	V4	131,0	
	V5	92,8	
	V6	53,5	
	V7	49,7	
	V8	77,6	
C	V9	95,1	
	V10	112,3	
	V11	64,3	
	V12	31,2	
D	V13	23,8	
	V14	134,8	
	V15	59,5	
	V16	78,8	
	V17	1351,9	
	V18	95,1	
	V19	106,2	
	V20	83,2	
	V21	85,7	
E	V22	1250,6	
	V23	505,3	
	V24	920,6	
	V25	73,3	
	V26	93,2	
F	V27	1237,4	
	V28	779,9	
	V29	236,3	
	V30	77,8	
	V31	64,8	
G	1/1	V32	1143,9
		V33	695,7
		V34	85,2
		V35	82,4
		V36	74,2
		V37	103,8
	1/14	V38	95,1
		V39	129,4
		V40	66,7
	1/25	V41	1109,4
		V42	1201,2
		V43	107,6
		V44	285,4
		V45	246,9

Fáze výroby	Izolát	Celkový obsah BA	
D	V46	56,2	
	V47	74,4	
	V48	78,8	
	V49	80,4	
	V50	64,1	
	V51	63,3	
E	V52	45,3	
	V53	985,9	
	V54	311,1	
F	V55	813,7	
	V56	934,7	
	V57	431,3	
	V58	938,4	
	V59	92,3	
	V60	84,4	
	V61	64,9	
G	2/1	V62	1121,1
		V63	805,3
		V64	699,1
		V65	60,7
		V66	67,1
	2/14	V67	47,3
		V68	75,8
	2/25	V69	512,3
		V70	1238,1
		V71	1180,1
		V72	290,8
		V73	436,9
	V74	167,3	
	V75	74,6	

PŘÍLOHA IV

Tabulka P6: Celkový obsah biogenních aminů (mg/l) u mikroorganismů izolovaných během výroby tvarohu (skupina II)

Fáze výroby	Izolát	Celkový obsah BA	Fáze výroby	Izolát	Celkový obsah BA	
A	V76	1791,1	D	V128	138,5	
	V77	83,8		V129	104,3	
	V78	60,5		V130	1602,6	
B	V79	297,4		V131	795,7	
	V80	1154,4		V132	1412,8	
	V81	1063,9		V133	1099,1	
	V82	349,4		V134	54,1	
	V83	141,5		V135	69,1	
C	V84	143,7	E	V136	1528,7	
	V85	137,3		V137	1234,1	
	V86	256,4		V138	1622,1	
	V87	470		V139	73	
	V88	830,2		V140	71	
	V89	559,9		V141	1321,9	
	V90	832,8	V142	65,8		
	V91	778,4	F	V143	1562,3	
	V92	79,2		V144	665,7	
V93	292	V145		1380,8		
D	V94	402,3		V146	1507,6	
	V95	152,9		V147	350,7	
	V96	865,9		V148	1320,8	
	V97	1184,3	G	2/1	V149	1588,1
	V98	1086,5			V150	1479,8
	V99	97,1			V151	87,2
	V100	107,5		2/25	V152	54
	V101	750,4			V153	95
V102	67,9	V154	59,7			
V103	77,9	V155	1652,1			
E	V104	1140,2				
	V105	1050,1				
	V106	774,6				
	V107	113,8				
	V108	71,8				
	V109	736,1				
V110	63,4					
F	V111	1236,9				
	V112	948,7				
	V113	108				
	V114	666,5				
	V115	1038,7				
G	1/1	V116	1104,4			
		V117	965,3			
		V118	967,2			
		V119	694,4			
		V120	1237,9			
		V121	567,6			
	1/25	V122	62,7			
		V123	84,4			
		V124	392,1			
		V125	43,9			
		V126	47,6			
		V127	1971,9			