

Produkce biogenních aminů v přírodním sýru

Natálie Ogurková

Bakalářská práce
2018



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav technologie potravin

akademický rok: 2017/2018

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Natálie Ogurková**
Osobní číslo: **T15174**
Studijní program: **B2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Chemie a technologie potravin**
Forma studia: **prezenční**

Téma práce: **Produkce biogenních aminů v přírodním sýru**

Zásady pro vypracování:

Teoretická část

1. Specifikujte význam biogenních aminů a popište výskyt biogenních aminů v potravinách.
2. Popište zrání sýrů. Zaměřte se na biochemické procesy vzniku biogenních aminů.
3. Charakterizujte faktory ovlivňující akumulaci biogenních aminů během zrání a skladování sýrů.

Praktická část

1. Vytvořte modelové vzorky sýrů s vybranými kmeny producentů a degradérů biogenních aminů.
2. V rámci skladovacího experimentu sledujte vybrané vlastnosti modelových sýrů.
3. Porovnejte obsah biogenních aminů v modelových šaržích v průběhu zrání.
4. Vyhodnoťte výsledky, diskutujte je s literaturou a vyvoďte závěry.

Rozsah bakalářské práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

- [1] LINARES, Daniel M., Beatriz DEL RÍO, Víctor LADERO, Noelia MARTÍNEZ, María FERNÁNDEZ, María Cruz MARTÍN a Miguel A. ÁLVAREZ. Factors Influencing Biogenic Amines Accumulation in Dairy Products. *Frontiers in Microbiology*. 2012, 3.
[2] DONNELLY, Catherine W. Cheese and microbes. Washington, District of Columbia: ASM Press, 2014. ISBN 978-1-55581-859-3.
[3] ZULJAN, Federico Alberto, Pablo MORTERA, Sergio Hugo ALARCÓN, Víctor Sebastián BLANCATO, Martín ESPARIZ a Christian MAGNI. Lactic acid bacteria decarboxylation reactions in cheese. *International Dairy Journal*. 2016, 62, 53-62.
[4] FOX, P. F. Cheese: chemistry, physics, and microbiology. 3rd ed. London: Elsevier, 2004. ISBN 0122636538.

Vedoucí bakalářské práce: **doc. Ing. Vendula Pachlová, Ph.D.**

Ústav technologie potravin

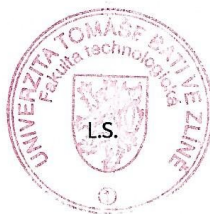
Datum zadání bakalářské práce: **2. února 2018**

Termín odevzdání bakalářské práce: **3. května 2018**

Ve Zlíně dne 2. února 2018



doc. Ing. František Buňka, Ph.D.
děkan



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

Příjmení a jméno: OGURKOVÁ NATALIE

Obor: CHTP

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

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

Ve Zlíně 7.4.2018

OGURKOVÁ NATALIE

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, užíje-li nikoli za účelem přímého nebo nepřímého hospodářského nebo obchodního prospěchu k výuce nebo k vlastní potřebě dílo vytvořené žákem nebo studentem ke splnění školních nebo studijních povinností vyplývajících z jeho právního vztahu ke škole nebo školskému či 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 přihlídí k výši výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

ABSTRAKT

Cílem bakalářské práce bylo posoudit možnosti snížení obsahu biogenních aminů v sýrech za použití vybraných druhů mikroorganismů. Pro tento účel byly vyrobeny modelové šarže sýrů typu gouda (1 šarže kontrolní, 1 šarže s producentem biogenních aminů a 2 šarže s odlišným potenciálním degradérem biogenních aminů), u kterých byl v průběhu 3měsíčního zrání pozorován vliv použité kultury na obsah biogenních aminů. Kontrolní šarže sýrů (pouze se smetanovou kulturou) vykazovala nejnižší obsah volných aminokyselin, z nichž bylo vytvořeno malé množství biogenních aminů. Kultura s použitým producentem biogenních aminů vykazovala nejvyšší množství volných aminokyselin a také i nejvyšší obsah biogenních aminů, což od téhle šarže sýru bylo očekáváno. Šarže sýrů s potenciálními degradéry biogenních aminů také vykazovaly vysoký obsah biogenních aminů, nicméně se jednalo o nižší obsahy než u šarže pouze s producentem. Z výsledků lze usoudit, že použité kmeny v modelových vzorcích sýrů degradovaly biogenní aminy, ale v nižší intenzitě než byla očekávána.

Klíčová slova: biogenní aminy, volné aminokyseliny, sýr, degradace, produkce

ABSTRACT

The aim of this bachelor thesis was to evaluate possibilities of the reduction of biogenic amines in cheese by using the chosen kinds of microorganism. The model batches of the cheese like gouda-cheese have been made for this purpose (1 control batch, 1 batch with a producer of the biogenic amines, 2 batches with the different potential degrader of biogenic amines), where an effect of the used culture on content of biogenic amines was observed during a 3-month's ripening. The control cheese (only with mesophilic culture) evinced the lowest content of free amino acids, of which small quantity of biogenic amines was formed. The culture with the used producer of biogenic amines showed the highest amount of the free amino acids and also the highest content of the biogenic amines, what was expected from this batch. The batches with the potential degraders of biogenic amines evinced high content of biogenic amines, but the content was lower as the content by the batches only with the producer. From the results could be concluded, that the used strains in model formulas of cheese degraded the biogenic amines, but in lower intensity than was expected.

Key words: biogenic amines, free amino acids, cheese, degradation, production

Chtěla bych poděkovat mé vedoucí bakalářské práce doc. Ing. Vendule Pachlové, Ph.D. za odborné vedení, pomoc při vykonávání praktické části, vstřícný přístup, cenné rady, ochotu, čas a trpělivost při vykonávání bakalářské práce.

Dále bych také chtěla poděkovat laborantkám Bc. Veronice Kučabové, Ing. Ludmile Zálešákové a Lence Machálkové za ochotné chování a pomoc, kterou mi při vykonávání praktické části této bakalářské práce poskytli.

OBSAH

ÚVOD	9
I TEORETICKÁ ČÁST	10
1 ZRÁNÍ SÝRŮ	11
1.1 ZMĚNA LAKTÓZY, KYSELINY MLÉČNÉ A CITRÁTU	12
1.2 PROTEOLÝZA A NÁSLEDNÉ PROCESY	13
1.3 LIPOLÝZA A NÁSLEDNÉ PROCESY	16
2 VÝZNAM BIOGENNÍCH AMINŮ A JEJICH VÝSKYT V POTRAVINÁCH	19
2.1 BIOGENNÍ AMINY	19
2.2 VÝSKYT V POTRAVINÁCH	22
2.3 FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ VZNIK BIOGENNÍCH AMINŮ.....	25
2.3.1 Faktory ovlivňující mikrobiální dekarboxylační aktivitu.....	28
II PRAKTICKÁ ČÁST	31
3 CÍL PRÁCE	32
4 MATERIÁL A METODY	33
4.1 VÝROBA MODELOVÝCH VZORKŮ.....	36
4.2 MIKROBIOLOGICKÝ ROZBOR	36
4.2.1 Stanovení celkového počtu mezofilních aerobních a fakultativně anaerobních mikroorganismů.....	37
4.2.2 Stanovení plísní a kvasinek	37
4.2.3 Stanovení enterokoků	37
4.2.4 Stanovení koliformních bakterií.....	38
4.2.5 Stanovení bakterií mléčného kvašení	38
4.2.6 Stanovení G- nfermentujících tyčinek.....	38
4.3 ZÁKLADNÍ CHEMICKÁ ANALÝZA	38
4.3.1 Měření pH	38
4.3.2 Stanovení obsahu sušiny	39
4.3.3 Stanovení obsahu soli.....	39
4.3.2 Stanovení obsahu tuku	39
4.4 TEXTURNÍ PROFILOVÁ ANALÝZA	40
4.5 STANOVENÍ OBSAHU VOLNÝCH AMINOKYSELIN.....	40
4.6 STANOVENÍ OBSAHU BIOGENNÍCH AMINŮ	41
5 VÝSEKDY A DISKUZE	43
5.1 MIKROBIOLOGICKÝ ROZBOR	43
5.2 ZÁKLADNÍ CHEMICKÁ ANALÝZA	46
5.2.1 Stanovení pH	46
5.2.2 Stanovení obsahu sušiny	47
5.2.3 Stanovení obsahu soli.....	48
5.2.4 Stanovení obsahu tuku	49

5.3	STANOVENÍ OBSAHU VOLÝCH AMINOKYSELIN.....	50
5.4	STANOVENÍ OBSAHU BIOGENNÍCH AMINŮ	51
5.5	TEXTURNÍ PROFYLOVÁ ANALÝZA	53
5.6	SOUHRNNÁ DISKUZE	54
ZÁVĚR		58
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....		60
SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....		64
SEZNAM OBRÁZKŮ		65
SEZNAM TABULEK.....		66
SEZNAM PŘÍLOH.....		67

ÚVOD

Při zrání se mění většina složek a sýr tak získává svoje typické vlastnosti, které jsou rozdílné pro daný druh. Chemické a enzymatické změny, které sýr prodělává, se nadále odrazí ve výsledné chuti či tvrdosti sýra. Hlavní složky, které se v sýru mění, jsou laktóza, která se vlivem mikroorganismů rozloží na kyselinu mléčnou. Během lipolýzy jsou uvolňovány volné mastné kyseliny, které v závislosti na přítomné mikroflóře mohou být přeměňovány na sensoricky aktivní složky. K nejvýznamnějším změnám však dochází u bílkovin, které po prodělání proteolýzy poskytují volné aminokyseliny, a z nich poté lze prostřednictvím složitých biochemických reakcí získat látky, které se největší měrou podílejí na vývoji chutě a vůně sýrů.

V průběhu biochemických změn v rámci zrání sýrů mohou vznikat také biogenní aminy. Jedná se o sloučeniny bazické povahy vznikající působením dekarboxyláz nebo působením transamináz z aminokyselin a karbonylových sloučenin. Vyskytují se prakticky ve všech potravinách, které jsou fermentované nebo obsahují bílkoviny. Pro člověka jsou nepostradatelné a mohou sloužit například jako prekurzory nebo regulovat krevní tlak. Pokud však dojde k jejich vyššímu příjmu potravou, mohou mít pro náš organizmus negativní účinky a způsobovat např. bolesti hlavy, zvýšený srdeční tep až anafylaktický šok. Bakalářská práce se zaměřuje na popis vývoje obsahu biogenních aminů v průběhu zrání modelových vzorků sýrů, ve kterých jsou přítomny mikroorganismy schopné produkce, ale současně i degradace biogenních aminů. Úkolem bakalářské práce bylo posoudit možnost snížení obsahu biogenních aminů přídatnou kulturou v reálném prostředí přírodního sýra.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 ZRÁNÍ SÝRŮ

Součástí výrobního procesu přírodních sýrů (technologické schéma sýrů s nízkodohřívanou sýřeninou je znázorněno v Příloze I) je zrání. Jedná se o enzymatický pochod, při němž se většina složek v sýru mění. Sýr získává svoje typické druhové vlastnosti [17, 18]. Mění se při něm textura, chuť, vůně a vzhled a jsou charakteristické pro daný sýr. Sýr je od výroby, po celou dobu zrání až po skladování mikrobiologicky a biochemicky dynamický systémem, u kterého je průběh změn potřeba regulovat pro dosažení produktu požadovaných vlastností. Jakákoliv změna ve složení mléka, odchylka ve výrobním procesu a odlišné podmínky při zrání mohou mít významný vliv na vlastnosti a kvalitu vyrobených sýrů. Většina sýrů se po výrobě uchovává ve zracích sklepech, kde různě dlouhou dobu zrají [16]. Při výrobě sýrů je jedním z důležitých kritérií vhodně zvolit kmeny bakterií mléčného kvašení, které napomáhají vyvolat biochemický proces [18, 20]. Při zrání se účastní převážně uvolněné mikrobiální enzymy a v některých případech i enzymy syřidla. Chemické změny, které probíhají při zrání, se týkají hlavně laktózy a bílkovin, ale do značné míry i solí, mléčného tuku. Působením kyseliny mléčné se nerozpustné soli sýru změny na rozpustné. Jak již bylo zmíněno, pro vytvoření charakteristických vlastností sýra mají velký význam změny bílkovin. Poté následuje desmolytický rozklad aminokyselin za působení deaminázy, při čemž vzniknou keto-kyseliny. Může také probíhat hydrolyza působením amidáz za vzniku amoniaku a oxokyseliny [17].

Biochemické reakce, které se vyskytují v sýrech v průběhu zrání lze rozdělit do čtyř hlavních kategorií:

- proces odbourávání laktózy a katabolismus laktátu,
- metabolismus citrátu,
- proteolýza (proces rozkladu bílkovinné struktury) a katabolismus aminokyselin,
- lipolýza (proces štěpení tuků) a katabolismus volných mastných kyselin [15, 24].

Rozeznáváme dva hlavní způsoby zrání:

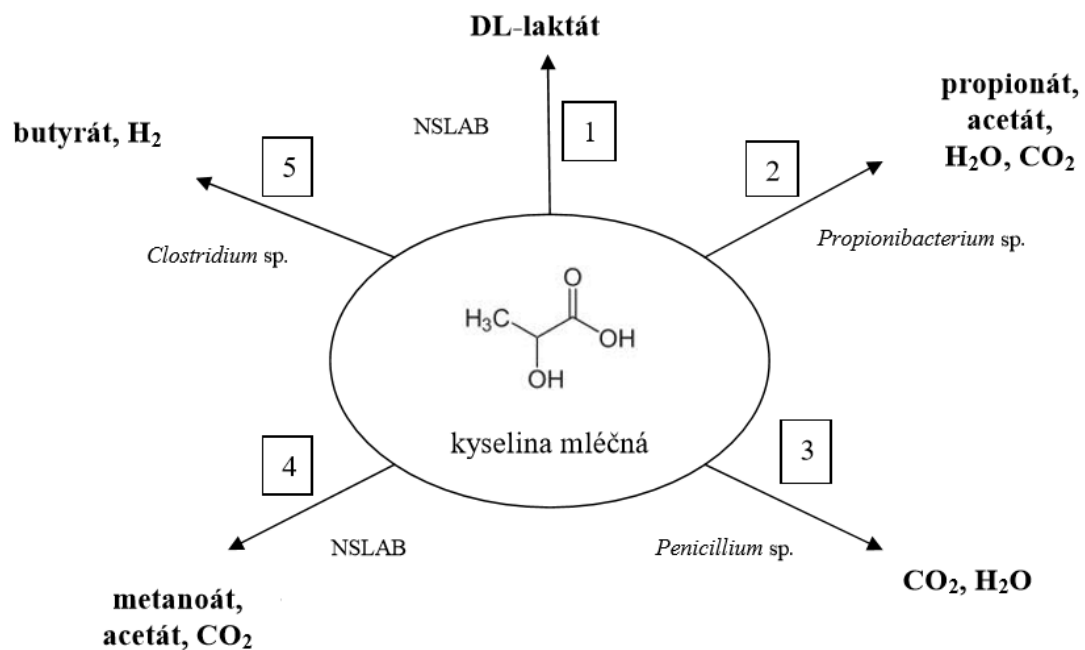
- a) Sýry zrající rovnoměrně v celé hmotě (tvrdé a polotvrdé sýry)
- b) Sýry zrající od povrchu dovnitř (měkké sýry a převážná většina kyselých) [17].

Primární neboli anaerobní zrání probíhá pomalu a rovnoměrně v celé hmotě bez přístupu vzduchu, působením enzymů bakterií mléčného kvašení. BMK se hojně pomnožují při odkapávání a lisování a do 24 hodin spotřebují téměř veškerou laktózu za tvorby kyseliny mléčné. Sekundární neboli aerobní zrání probíhá za přístupu vzduchu rychle od povrchu

(sýry měkké a mnoho sýrů s povrchovou mikroflórou). Uplatňují se zde proteolytické aerobní mikroorganismy, které vytvářejí maz na povrchu sýra. Jejich enzymy prostupují dovnitř těsta, kde štěpí bílkoviny (na amoniak, oxid uhličitý a vodu). Při vysoké relativní vlhkosti a ošetřování sýrů solným roztokem se podpoří tvorba mazu. U těchto sýrů se ale také nejdříve uplatňuje primární zrání rozložením laktózy [17, 18].

1.1 Změny laktózy, kyseliny mléčné a citrátu

Laktóza (mléčný cukr) je disacharid složený z glukózy a galaktózy (4-O- β -D-galaktopyranosyl-D-glukopyranóza), který je bakteriemi mléčného kvašení přeměněn na kyselinu mléčnou. Nejprve je laktóza rozštěpená na monosacharidy glukózu a galaktózu. Rozklad hexózy probíhá různými směry, podle přítomného druhu mikroorganismu (mléčné, máselné, propionové atd.). Prvním krokem při rozkladu monosacharidů je fosforylace. Nejdříve jsou monosacharidy mikroorganismy převedeny na estery kyseliny fosforečné enzymem fosforylázou [21]. Procesy, které vedou k rozkladu laktózy, jsou zobrazeny na Obrázku 1. [23]. Aktivita mikroorganismů začíná již po přidání zákysů a nejvyšší aktivitu lze zaznamenat za 4-5 hodin po zakysání tzn. při odkapání a lisování syrovátky [18]. Hlavní kysání končí zhruba 24 po zasýření, a aby proces proběhnul správně, nesmějí sýry v této době prochládnout ani překysat [18, 20]. Kysáním klesne obsah vápníku v parakaseinovém komplexu, až v konečné fázi vznikne monokalciová sůl parakaseinu, která je snadno rozpustná a bobtnající za působení NaCl obsažené v solné lázni [20, 21]. Vápenaté soli kaseinu napomáhají vzniku homogenní struktury sýrů. Navázáním kyseliny mléčné nebo mikrobiálním rozkladem dochází ke snížení kyselosti sýra. V průběhu 24 hodin se sleduje pH a podle druhu sýra činní pH těsta 5,3 až 5,0 [21]. V případě sýrů ementálského typu kyselinu mléčnou přeměňují propionové bakterie na kyselinu propionovou, octovou a oxid uhličitý, který je hlavním produktem pro tvorbu ok v těstě tvrdých sýrů. Při tvorbě ok v těstě je důležité příznivé pH sýřeniny po výrobě, které se pohybuje v rozsahu 5,1-5,3. V měkkých sýrech se při rozkladu laktózy některými kvasinkami mohou tvořit alkoholy a estery [22, 23].



Obrázek 1. Změny laktózy v průběhu zrání sýrů: 1 - racemizace, 2 - metabolismus způsobený *Propionibacterium* spp., 3 - oxidace, 4 - anaerobní metabolismus pomocí NSLAB, 5 - anaerobní metabolismus pomocí *Clostridium* spp. [23]

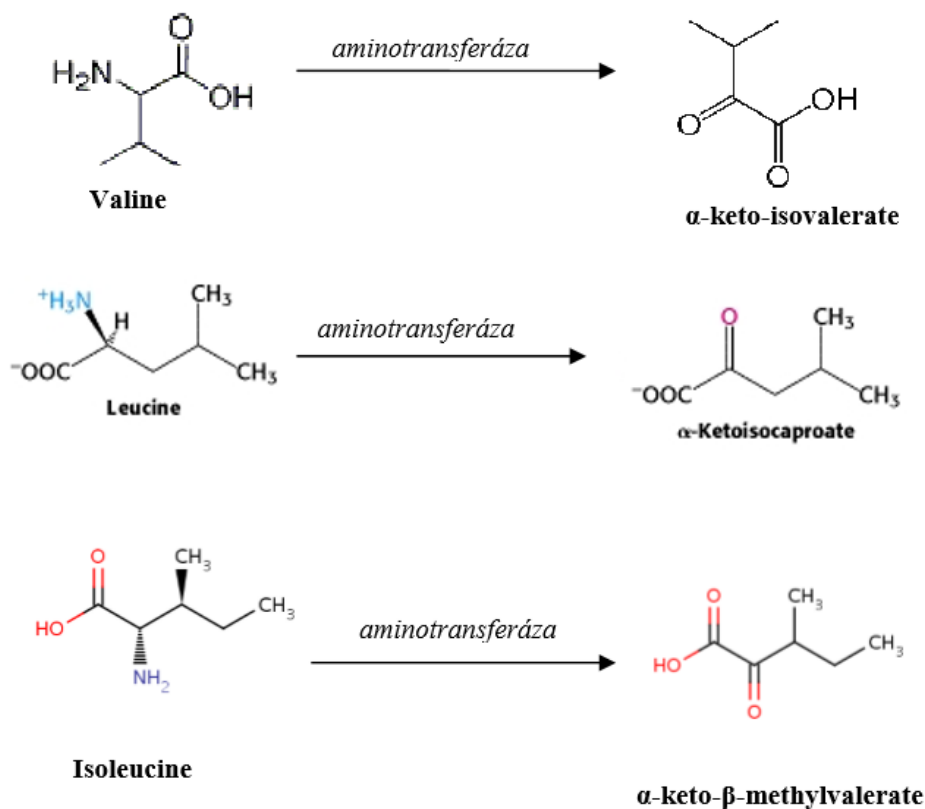
Metabolismus laktózy probíhá za pomoci citrát-pozitivních kmenů laktokoků, mezi které patří *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* var. *diacetylactis*, ale také kmeny *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *cremoris*. Produkty jsou oxid uhličitý sloužící k vytvoření drobných ok, které se nacházejí u sýrů holandského typu, a důležitých chuťových látek, jako je zejména diacetyl, který přispívá k chuti těchto sýrů. Citrát může být metabolizován také za pomoci některých kmenů NSLAB na butanol, kyselinu octovou a diacetyl. Obsah citrátu v sýřenině klesne během půl roku zrání činností NSLAB až na stopové koncentrace [16, 36].

1.2 Proteolýza a následné procesy

Rozklad bílkovin je hydrolytický proces, který probíhá v kyselém i neutrálním prostředí. V mléce se nachází významný zdroj proteolytických enzymů [23]. Rozhodující úlohu při hydrolýze bílkovin mají intracelulární proteolytické enzymy, které jsou do prostředí sýra uvolňovány po lýzi buňky bakterií mléčného kvašení. Jsou to hlavně laktokoky mléčného kvašení a termofilní tyčinky u sýru s vysokodohřívanou sýřeninou. U každého druhu sýra může docházet k odlišné intenzitě proteolýzy. Výsledné produkty tak následně ovlivňují charakteristické vlastnosti [16, 23]. Intenzita proteolýzy může také ovlivnit výslednou tvr-

dost sýra, protože se mění a slábne proteinová matrice [40, 41]. Proteolýza probíhá v postupně na sebe navazujících krocích. Během proteolýzy dochází ke štěpení proteinů, při nichž vznikají peptidy o vysoké molekulové hmotnosti. Tyto peptidy jsou dále hydrolyzovány na peptidy o menší molekulové hmotnosti. V dalším kroku rozkladu vznikají kratší peptidy, dipeptidy a volné aminokyseliny [16, 23].

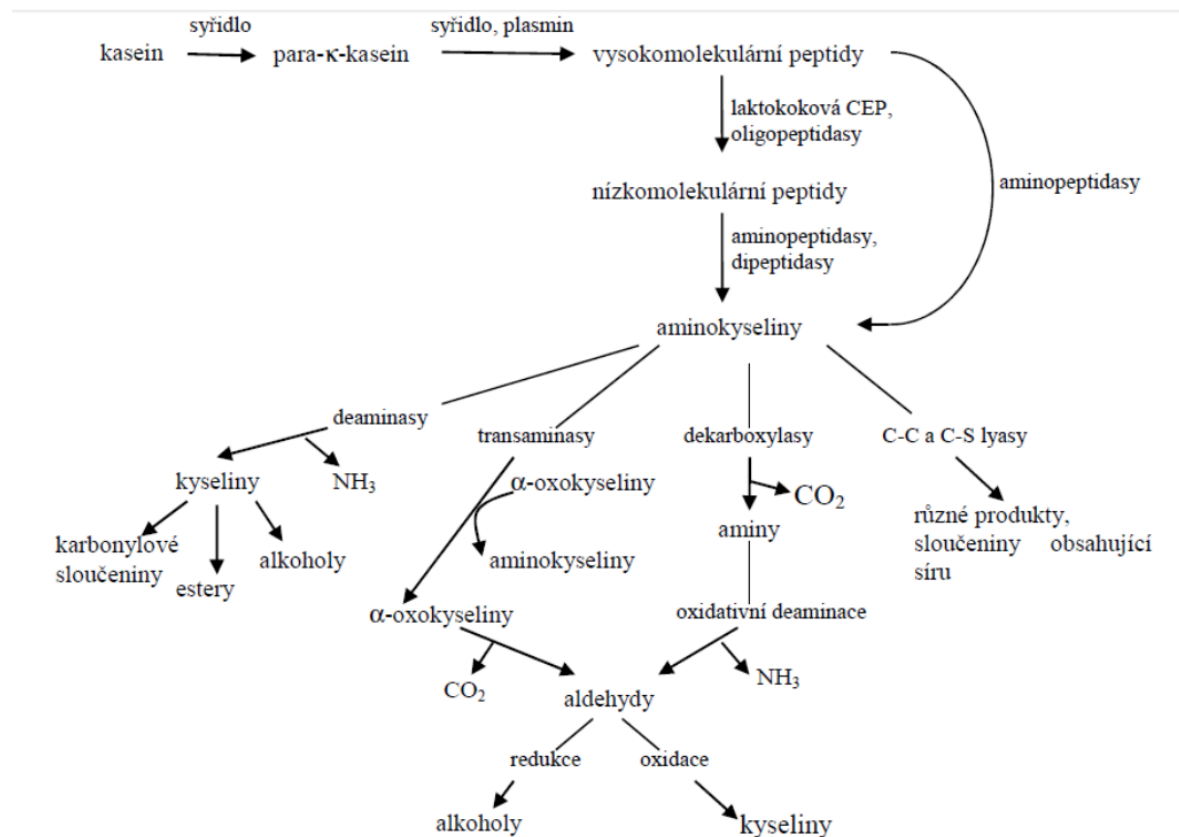
Aminokyseliny jsou konečnými produkty proteolýzy. Poté mohou vstupovat do dalších biochemických reakcí a sloužit jako prekurzory pro vznik sensoricky aktivních látek, kterými jsou zejména aminy, kyseliny, karbonylové sloučeniny nebo sloučeniny obsahující síru [21, 22, 23]. K chuti v mnoha typech sýrů přispívají také malé a střední peptidy. Hořkost mohou způsobovat krátké, hydrofobní peptidy a hořké aminokyseliny jako např. Arg, Met, Val, Leu, Phe, Tyr, Ile, Trp. Některé mohou být také sladké jako např. Gly, Ser, Ala, Pro, Thr. Mezi kyselé můžeme zařadit např. Glu, Asp. Velmi důležité z hlediska tvorby aroma sýrů se jeví sírné sloučeniny. Mezi tyto sloučeniny patří např. metanthiol, dimetyldisulfid. První krok metabolické dráhy je zahájen enzymem aminotransferázy, při které se přeměňuje aminoskupina aminokyselin na danou α -ketokyselinu. Aminotransferáza je činitel, který limituje rychlost produkce těkavých sloučenin při zrání sýrů. Aktivita aminotransferáz na vybrané aminokyseliny je zobrazena na Obrázku 2. [23]. Dané α -ketokyseliny se mohou redukovat na odpovídající hydroxykyseliny. Druhou metabolickou drahou se zahájí činnost lyáz, které jsou schopny štěpit řetězce aminokyselin. Tato metabolická dráha je významná zejména pro aromatické aminokyseliny a metionin. Existují dokonce i jiné metabolické dráhy, jako je například deaminace (odstranění aminoskupiny a následná přeměna na amoniak) nebo dekarboxylace (odštěpení CO_2 z karboxylové skupiny). Vyskytují se dva typy deaminace, které zahrnují redoxní reakce a ty se liší podle charakteru příjemce vodíku [17, 23].



Obrázek 2. Transaminace rozvětvených aminokyselin na odpovídající α -ketokyseliny [23]

Čím déle budou sýry zrát při příznivých teplotách, tím hlubší bude rozklad bílkovin. Chuťové rozdíly mezi jednotlivými sýry, jsou způsobeny nejen rozdílnou koncentrací obsahu jednotlivých aminokyselin, ale i jiným množstvím různých frakcí peptidů, které mohou ovlivňovat chuť sýra. Rozsah neboli stupeň zrání je množství dusíku, který je rozpustný ve vodě (vyjádřeno v procentech). Hloubka zrání je množství dusíku aminokyselin a amoniaku k celkovému dusíku (vyjádřeno v procentech) [22]. Hlavní původní proteinázou v mléce je plazmin, který je důležitý při zrání sýrů a urychluje proteolýzu. Optimální aktivitu vykazuje při teplotě 37 °C a pH 7,5. Do krve se vylučuje jako negativní plazminogen, který je poté aktivován aktivátory (PAs) na plazmin. Plazmin se účastní degradace sraženiny fibrinu při procesu srážení krve. V mléce bývají plazmin, plazminogen a PAs asociovány na micely, ale inhibitory plazminu a inhibitory aktivátoru odchází spolu se syrovátkou. Další funkcí plazminu je ta, že degraduje kaseiny v následujícím pořadí: β -kasein \approx α ₂-kasein $>$ α ₁-kasein. K-kasein je vůči hydrolýze působením plazminu odolný. α ₂-kasein je docela citlivý na činnost plazminu a to způsobuje ztrátu tohoto proteinu, které bylo během zrání sýra pozorováno [23]. Syřidlo chymozin je tradičně využíváno při výrobě sýrů a je získáváno z žaludků sajících telat. Hlavní rolí chymozinu je štěpit κ -kasein mezi 105. (fenylalanin) a

106. (metionin) aminokyselinou. Chymozin dále štěpí kaseiny α_1 mezi 23. (fenylalanin) a 24. (fenylalanin) aminokyselinou. Krátké peptidy se poté rychle hydrolyzují proteinázami startérových kultur. Kasein α_1 je poměrně rezistentní vůči štěpení chymozinem. Štěpná místa jsou především v hydrofobní části molekuly [23, 36]. Schéma průběhu proteolýzy je znázorněna na Obrázku 3. [37].



Obrázek 3. Schéma proteolýzy v sýrech [37]

1.3 Lipolýza a následné procesy

Lipidy ovlivňují texturu sýrů, působí jako zdroj mastných kyselin, které jsou dále katabolizovány na další sensoricky aktivní látky. Dále ještě působí jako rozpouštědlo pro chuťově aktivní látky. Lipidy přítomné v sýrech mohou podléhat oxidačním, nebo rozkladným reakcím. Lipolytické enzymy v sýru mohou být rozděleny na esterázy nebo lipázy. Druhů lipáz existuje několik a podle původu jsou to lipázy endogenní, které pocházejí přímo z mléka (lipoproteinlipáza) nebo mikrobiální lipázy, které jsou v dohřívaných sýrech produkovány rody *Lactococcus* spp. a *Lactobacillus* spp., případně pomocí *Penicillium roqueforti* v sýrech

s plísní v těstě aj. [21, 23]. Během zrání podléhá tuk změnám, při kterém se uplatňují lipolytické enzymy. Na rozkladu tuku se kromě mikrobiologických lipáz podílejí i nativní lipázy, ale pouze při použití syrového mléka a ojediněle při použití mléka, které bylo podrobeno krátkodobé pasteraci. Intenzivní rozklad tuku probíhá u plísňových sýrů (plíseň v těstě či na povrchu) a u sýrů zrajících pod mazem hydrolytickou a méně oxidační cestou, při působení kulturních plísní. Lipázy jsou hydrolázy a katalyzují hydrolyzu esterovou vazbou, kterou se naváže mastná kyselina na glycerol. Lipázy mohou být různě specifické:

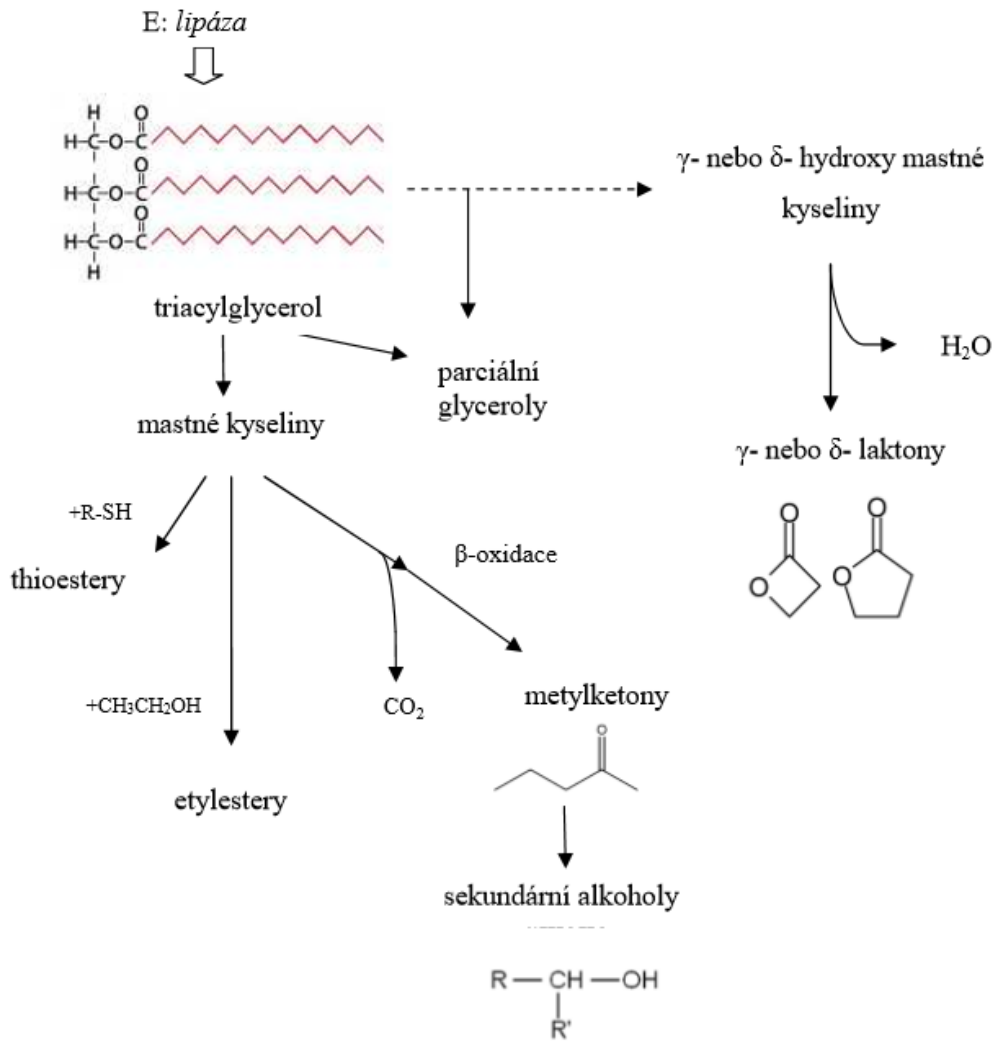
- 1) obvykle hydrolyzují 1,2- a 2,3 - diacylglyceridy a poté 2 - monoacylglyceridy
- 2) vykazují specifitu pro mastné kyseliny, které mají určitou délku svého mastného řetězce
- 3) některé vykazují specifitu pro nasycené nebo nenasycené mastné kyseliny [23].

V plísňových sýrech z uvolněných mastných kyselin vznikají různé karbonylové sloučeniny jako methylketony, které se podílejí na tvorbě chuti a aromatu sýrů. Rozklad tuku, který je nežádoucí a projevuje se plesnivou chutí a zatuchlým zápachem způsobuje enzym lipáza rodů *Alcaligenes*, *Proteus*, *Bacillus*, ale hlavně plísně rodů *Aspergillus*, a *Mucor*. U čerstvých a přezrálých tučných sýrů se vyskytuje chuť zmydelněného tuku. [21]

V sýrech se nachází volné mastné kyseliny (z anglického free fatty acid, FFA), které jsou prekurzory mnoha významných aromatických látek, jako jsou například methylketony, laktony, estery, alkany a sekundární alkoholy. Konečným produktem metabolických drah, které probíhají v průběhu zrání, je obvykle etanol (je to sekundárním produkt při fermentaci laktózy nebo při katabolizmu aminokyselin). Metabolismus volných mastných kyselin dává vzniku reakcí esterů volných mastných kyselin s alkoholem. Další estery, které se v sýrech mohou nacházet, jsou metylester, propylester a butylester. Reakce volných mastných kyselin jsou zobrazeny na Obrázku 4. [23].

Laktony jsou cyklické sloučeniny, silně aromatické a podílí se na celkové chuti sýrů. Produkce laktonů v sýrech při zrání je omezena hladinou obsahu jejich prekurzorů – hydroxykyselin. Vznikají intramolekulární esterifikací hydroxykyselin a jejich dehydratací vznikne cyklická struktura. α -laktony a β -laktony jsou reaktivní sloučeniny na rozdíl od γ -laktony a δ -laktony, které jsou poměrně stálé a vyskytují se v sýrech. Hydroxykyseliny mohou vzniknout také redukcí ketonů. Mléčná žláza má δ -oxidační systém pro katabolismus mastných kyselin a proto oxidace v mléčné žláze je nejspíš hlavním zdrojem pro prekurzory laktonů. Laktony ale mohou vznikat i jiným způsobem než je uvolněním hydroxykyselin z triacyl-

glycerolu, např. dodekalaktony mohou vzniknout z nenasycených mastných kyselin s dlouhým řetězcem při působení *Penicillium roqueforti*. Hydroxykyseliny mohou vznikat činností lipoxygenáz a dalších enzymů [16, 23].



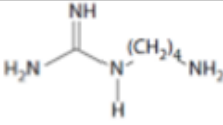
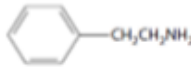
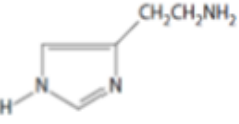
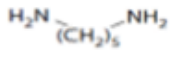
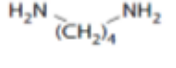
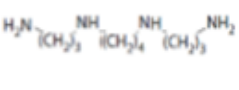
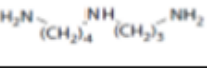
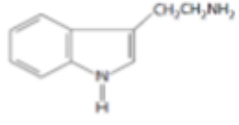
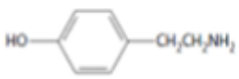
Obrázek 4. Katabolismus volných mastných kyselin [23]

2 VÝZNAM BIOGENNÍCH AMINŮ A JEJICH VÝSKYT V POTRAVINÁCH

2.1 Biogenní aminy

Biogenní aminy (BA) jsou nízkomolekulární organické látky vznikající dekarboxylací aminokyselin (dekarboxyláza obsahující jako kofaktor pyridoxal-fosfát) nebo působením transamináz z aminokyselin a karbonylových sloučenin. Dekarboxylací se odstraní karboxylová kyselina dané aminokyseliny a vzniká příslušný biogenní amin a oxid uhličitý [1]. Biogenní aminy jsou bazické povahy a vykazují různé biologické účinky [2]. Obecně mohou být biogenní aminy zdrojem dusíku v různých biochemických reakcích a dále mohou spoluvytvářet aroma výsledného produktu [1]. Biogenní aminy se přirozeně vyskytují v potravinách živočišného původu jako například tyramin, histamin, kadaverin a putrescin, ale také v potravinách rostlinného původu a jsou jimi například tyramin a synefrin [1]. K tvorbě biogenních aminů při zrání sýrů může docházet aktivitou mikroflóry, která kontaminovala mléko nebo meziprodukt během výroby. Riziko kontaminace klesá se zvyšujícím se hygienickým standardem výroby. Vyloučení kontaminace je však velmi problematické a naráží na mnoho překážek. I při dodržování správné hygienické praxe a dobré technologie zpracování, mohou obsahovat sýry z pasterovaného či nepasterovaného mléka množství biogenních aminů, která mohou být významná pro zdraví člověka [25]. Při výrobě některých dlouhodobě zrajících sýrů může docházet k vzrůstu obsahu biogenních aminů [1, 2]. V sýrech z ovčího mléka byl nalezen větší počet a množství biogenních aminů než u sýrů s kravského a kozího mléka. Odstraňování vzniklých biogenních aminů, které se v potravinách vyskytnou, není jednoduché a je popsáno v další podkapitole. K částečnému snížení dochází vlivem tepelného zahřevu u zpracovaných výrobků a jejich reakcí s redukujícími cukry neboli s rozkladnými produkty cukrů v Maillardových reakcích. Účinnost eliminace biogenních aminů prostřednictvím tepelné úpravy je ale problematické, neboť biogenní aminy jsou sloučeniny odolné proti vysokým teplotám (např. kulinárním zpracováním) [25]. Jednotlivé biogenní aminy, jejich strukturní vzorec se systematickými a triviálními názvy, původními aminokyselinami a enzymy jsou uvedeny v Tabulce 1.

Tabulka 1. Nejběžnější biogenní aminy v potravinách [9]

Biogenní amin	Sumární vzorec	Molekulová hmotnost [g·mol ⁻¹]	Chemický název	Strukturní název	Enzym	Původní AMK
Agmatin	C ₅ H ₁₄ N ₄	130,19	4-(aminobutyl) guanidine; 1-amino-4-guanidobutan		Arginindekarboxyláza	Arginin
Fenylethylamin	C ₈ H ₁₁ N	121,18	benzen etanolamin		Fenylalanindekarboxyláza	Fenylalanin
Histamin	C ₅ H ₉ N ₃	111,15	1H-imidazol-4- etanamin; 2-(4-imidazolyl)- etylamin		Histidindekarboxyláza	Histidin
Kadaverin	C ₅ H ₁₄ N ₂	102,18	1,5-pentandiamin; pentametyldiamin		Lysindekarboxyláza	Lysin
Putrescin	C ₄ H ₁₂ N ₂	88,15	1,4-butan-diamin; tetrametyldiamin		Ornithindekarboxyláza	Ornithin
Spermin	C ₁₀ H ₁₉ N ₃	202,34	N,N'-Bis(3- aminopropyl)-1,4- diaminobutan		Argininoxidáza	Arginin
Spermidin	C ₇ H ₁₉ N ₃	145,24	N-(3-aminopropyl)- 1,4-butan-diamin		Argininoxidáza	Arginin
Tryptamin	C ₁₀ H ₁₂ N ₂	160,21	1H-indole-3- etanamin; 3-(2-aminoetyl) indol		Tryptofandekarboxyláza	Tryptofan
Tyramin	C ₈ H ₁₁ NO	137,18	4-(2-aminoetyl) fenol; 2-p-hydroxy fenyl ethyl amine		Tyrosindekarboxyláza	Tyrosin

Biogenní aminy lze dělit rovněž podle jejich struktury:

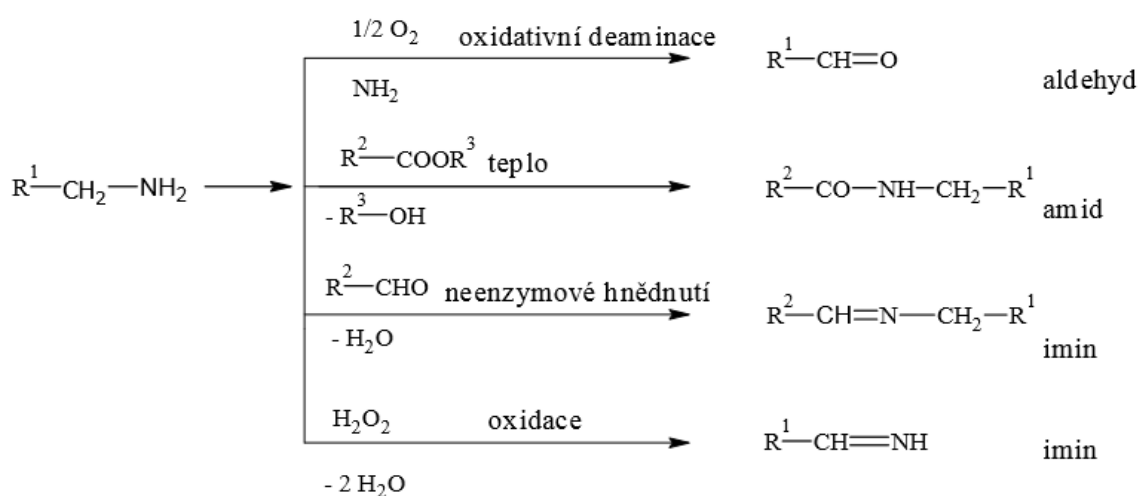
- 1) Alifatické (kadaverin (CAD), putrescin (PUT), spermidin (SPD), spermin (SPM))
- 2) Aromatické (fenylethylamin (PEA), tyramin (TYR))
- 3) Heterocyklické (histamin (HIS), tryptamin (TRY))

Biogenní aminy můžeme také rozdělit podle původu na endogenní a exogenní.

Endogenní biogenní aminy vznikají přirozenými pochody organismu a v nízkých koncentracích se mohou nacházet prakticky ve všech potravinách.

Exogenní biogenní aminy vznikají jako důsledek mikrobiální aktivity (dekarboxylací daných aminokyselin) např. při kvasných procesech (tyramin, histamin). Vyšší koncentrace jsou důsledkem pokročilejšího kažení potravin [1].

Enzymové reakce vedou k derivátům biogenních aminů a dalším sloučeninám a oxidativní deaminací mohou poskytovat aldehydy. Oxygenázy, methyltransferázy, a další enzymy se uplatňují při tzv. transformacích biogenních aminů na další produkty. Vstupují i do reakce neenzymového hnědnutí, kde vzniknou jakou primární reakční produkty příslušné iminy, které se také tvoří oxidací aminů, např. peroxidem vodíku nebo hydroperoxydy lipidů [1, 2]. Hlavní reakce BA, které vznikají při oxidaci, za působení tepla nebo neenzymového hnědnutí jsou uvedeny na Obrázku č. 5. [2].



Obrázek 5. Hlavní reakce biogenních aminů [2]

Význam biogenních aminů spočívá v tom, že jsou součástí fyziologického metabolismu člověka, zvířat, rostlin a mikroorganismů. Biogenní aminy jsou pro organismus nepostradatelné, ale ve větších koncentracích jsou zdravotně závadné až toxické [3, 4]. U živých organismů mohou být zdrojem dusíku, prekurzory pro syntézu hormonů, alkaloidů (např. tropanové alkaloidy rostlin), nukleových kyselin a proteinů. V organismu ovlivňují procesy jako je např. regulace tělesné teploty, příjem živin, regulace krevního tlaku [11]. Pokud budeme mluvit o významných účincích daných BA na organismus, tak např. histamin má významnou roli při alergických odezvách organismu. Při zánětlivých a alergických reakcích a v centrálním nervovém systému funguje jako neurotransmitter [3, 4]. Tyrosin a tryptamin jsou významné při výstavbě hormonů a v rostlinách se z nich odvozuje řada alkaloidů. Tryptamin má navíc vliv na funkci peristaltiky střev a také na psychické funkce [4]. Tyramin vykazuje antioxidační aktivitu. Z dopaminu při oxidaci vznikne hormon dřevě nadledvinek nonadrenalin (norepinefrin) a jeho působení s *S*-adenosyl-methioninem vnikne

další hormon nadledvinek adrenalin (epinefrin). Oxidace dopaminu *via* dopachrom vede k melaninovým pigmentům (černohnědá barva kůže, vlasů,..) [2, 7].

Při vyšších koncentracích však mohou biogenní aminy působit toxikologicky. Navíc mohou být biogenní aminy prekurzory karcinogenních N-nitroso sloučenin a to hlavně sekundární aminy (R-NH₂-R), které vyváří stabilní nebezpečné produkty, na rozdíl od primárních aminů (NH₂-R). Organismus člověka má k dispozici detoxikační mechanismy, jako je aktivita aminooxidázy (monoaminooxidáza – MAO, diaminooxidáza – DAO), které odbourávají biogenní aminy ve střevě. Polyaminooxidáza (PAO) napomáhá odbourávání spermidinu a sperminu [1]. Při vyhodnocování toxického účinku je nutné zvažovat hlavně přítomnost konkrétního aminu, ale i ostatní faktory, kterými jsou množství spotřebované potraviny, přítomnost dalších toxických látek apod. Kvůli tomu je velmi obtížné stanovit hranici toxicity biogenních aminů. Navíc detoxikační mechanismy jsou nedostatečné u jedinců s alergií, konzumujících alkohol nebo léčiva s účinkem inhibitorů MAO a při vysokém příjmu biogenních aminů ve stravě [3]. Příznaky způsobené konzumací nadměrných dávek a špatné schopnosti detoxikace biogenních aminů jsou zvracení, dýchací potíže, pocení, průjem, vyrážky, bušení srdce, hypotenze (histamin) nebo hypertenze (tyramin) bolesti hlavy a migrény (fenylethylamin, tyramin). U sperminu a spermidinu je možný vznik N-nitrosaminů reakcí s kyselinou dusitou. N-nitrosaminům je připisována karcinogenita, mutagenita a teratogenita [3, 11].

Předpokládá se, že při příjmu vyššího množství potravin např. s koncentrací histaminu vyšším než 400 mg/kg je ohroženo zdraví. Další výzkum ukázal, že 75 mg čistého perorálního histaminu vyvolává příznaky u 50 % zdravých žen bez známky potravinové intolerance a příjem přibližně 1000 mg histaminu je rozhodně spojen s těžkými intoxikacemi [31].

2.2 Výskyt v potravinách

Jak již bylo zmíněno, biogenní aminy se vyskytují prakticky ve všech potravinách jako běžné produkty metabolismu [2]. Jejich zvýšené obsahy jsou však způsobeny mikrobiální aktivitou přítomných mikroorganismů. Navíc bylo prokázáno, že kadaverin a putrescin mohou zvýšit toxicitu histaminu a reagovat s dusitanem za vzniku karcinogenních nitrosaminů [30]. Enterokoky a heterofermentativní bacily se považují za hlavní producenty tyraminu a histaminu. I další bakterie mléčného kvašení a některé gramnegativní bakterie rovněž mohou být producenti biogenních aminů v sýrech [7, 11]. Analytické metody použité pro kvantifikaci BA jsou založeny především na chromatografických metodách: tenkovrstvá chromatografie

(TLC), plynová chromatografie (GC), kapilární elektroforéza (CE) a vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC). Nejčastěji se používá HPLC pro metodu analýzy BA. Novější molekulární metody založené na hybridizaci DNA a PCR amplifikaci jsou používány pro rychlou a citlivou detekci určitých biogenních aminů produkujících bakterií. Cílem je dosáhnout včasné detekce, a tudíž prevence otravy histaminem [32, 33]. Pro obsah v potravinách jsou stanoveny legislativní limity a jsou stanoveny rozdílně v různých zemích. Nařízení komise (ES) č. 2073/2005 sjednocuje minimální požadavky pro země EU a udává limit obsahu histaminu v rybách a rybích výrobcích. Je zde ustanoveno přípustné množství histaminu v produktech rybolovu na 100 mg/kg. V produktech rybolovu, které bylo ošetřeno enzymatickým zráním v láku na 200 mg/kg [28, 29].

Podle způsobu tvorby biogenních aminů můžeme potraviny rozdělovat do dvou skupin.

1. Fermentované potraviny: zde jsou biogenní aminy produkovány hlavně při fermentaci a zrání. Zde patří fermentované masné výrobky, některé ryby a rybí výrobky, zrající sýry, alkoholické nápoje (víno, pivo) a kysaná zelenina.
2. Nefermentované potraviny: zde jsou biogenní aminy výsledkem působení kontaminující mikroflóry. Vyskytují se hlavně v rybách a rybích výrobcích a v mase v průběhu skladování. V tomto případě, mohou být biogenní aminy ukazatelem mikrobiologické kontaminace, resp. jejich množství ukazatelem kvality [2, 5, 34].

Bylo provedeno kvalitativní posouzení rizik biogenních aminů u fermentovaných potravin, které provedl panel pro biologické nebezpečí (BIOHAZ) EFSA (2011) - (Evropský úřad pro bezpečnost potravin). S využitím údajů z odborné literatury dospěl panel BIOHAZ k závěru, že akumulace BA ve fermentovaných potravinách je komplexní proces, který je ovlivněn mnoha faktory a jejich interakcemi, jejichž kombinace je četná, variabilní a specifická pro daný produkt [31].

Výskyt biogenních aminů v rostlinných materiálech není tak vysoký, aby ohrozil zdraví. Do rostlinných materiálů zařadíme hlavně výskyt v ovoci, zelenině, ovocných džusech a kakaových bobech. V džusech vyrobených téměř ze všech druhů citrusového i ostatního ovoce byl prokázán obsah všech biogenních aminů. Mezi nejvíce zastoupené patřil putrescin. V pomerančových džusech byl nalezen tryptamin a noradrenalin. V banánech byl obsah tyraminu, noradrenalinu, tryptaminu, serotoninu. Ve švestkách se vyskytoval tyramin a noradrenalin. V zelenině, do které zařadíme i čínské zelí, ledový salát a čekanku, byly nalezeny

obsahy biogenních aminů. Nejvíce vyskytující se byl spermidin. Fermentovaná zelenina obsahovala histamin, který byl také nalezen v kysaném zelí [30, 32].

V rybách a v produktech z ryb se vyskytoval histamin, tyramin, kadaverin a putrescin. Histidin se přirozeně vyskytuje v rybích svalech mnoha druhů ryb patřících do rodiny *Scombridae*. Obecně platí, že tvorba biogenních aminů v rybích produktech je ovlivněna především dobou skladování a teplotou. Maximální hladina histaminu v produktech z ryb je stanovena nařízením. [28, 29].

Víno a pivo jsou velmi populární fermentované výrobky. Ve víně nejčastěji se vyskytující biogenní aminy jsou histamin, fenylethylamin, tyramin, putrescin, kadaverin, spermidin, spermin, tryptamin a agamatin. Bylo zjištěno, že putrescin je nejhojnější BA ve víně. Spermidin a putrescin byly identifikovány jako dva dominantní aminy v hroznu a moštu. Během alkoholové fermentace může metabolismus kvasinkových kmenů produkovat některé BA. Bylo zjištěno, že bílé víno obecně obsahuje nižší hladiny BA než červené, protože v procesu výroby bílého vína nedochází k malolaktické fermentaci [30, 32]. Biogenní aminy, které jsou obsaženy v pivu, jsou rozděleny na dvě skupiny. První skupina zahrnuje putrescin, spermidin, spermin a agmatin a ty lze považovat za primární složky pocházející ze sladu. Druhá skupina BA vzniká činností kontaminující mikroflóry a řadíme zde histamin, tyramin a kadaverin. Na tvorbě tyraminu a tryptaminu se podílí bakterie rodu *Pediococcus* sp. Z laktobacilů se na tvorbě BA podílí hlavně *Lactobacillus brevis*. V nealkoholických pivech se množství biogenních aminů výrazně neliší od alkoholických. To nám říká, že odlišná výroba neovlivňuje množství těchto látek. Vysoká spotřeba piva v České republice, může být příčinou nadměrného příjmu biogenních aminů pro náš organizmus. [35]

V sýrech se nejčastěji vyskytují BA, jako je histamin, tyramin, kadaverin, putrescin, tryptamin a 2 - fenylethylamin [7, 11, 24]. V sýru typu Gouda se mohou vyskytovat laktobacily se zvýšenou proteolytickou aktivitou, produkující biogenní aminy až v počtu 10^7 KTJ·g⁻¹ [23]. U bakterií mléčného kvašení (*Lactococcus*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*) izolovaných z potravin byla u mnoha kmenů prokázána tvorba aminů [6]. V Tabulce č. 2 jsou uvedeny mikroorganizmy, které produkují dané biogenní aminy. Obecně v sýrech produkují biogenní aminy: *Lactobacillus bulgaricus*, *L. plantarum*, *L. casei*, *L. acidophilus*, *L. buchneri*; *Streptococcus faecium*; *Bacillus macerans* [4].

Tabulka 2. Mikroorganismy produkující BA v přírodním sýru [2]

Potravina	Mikroorganismy	Produkované aminy
sýry	<i>Lactobacillus buchneri</i> , <i>L. bulgaricus</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. casei</i> <i>L. acidophilus</i> , <i>Enterococcus faecium</i> , <i>Streptococcus mitis</i> <i>Bacillus macerans</i> , <i>Propionibacterium sp.</i>	His, Kad Put, Tyr, Trp

His – histamin, Tyr – tyramin, Kad – kadaverin, Put – putrescin, Agm – agmatin,
Spd – spermidin, Spn – spermin, His – histamin, Trp – tryptofan

2.3 Faktory ovlivňující vznik biogenních aminů

Základní podmínky pro vznik biogenních aminů jsou následující:

- Přítomnost a dostupnost aminokyselin v substrátu
- Přítomnost a aktivita mikroorganismů s dekarboxylázovou aktivitou
- Podmínky ovlivňující aktivitu a růst mikroorganismů [3, 11, 12].

Tyto základní podmínky ovlivňují kolísání obsahů biogenních aminů. Způsob vzniku biogenních aminů je také možný při transaminaci aldehydů a ketonů [1]. Faktory, jako je použití počáteční kultury a enzymů, ošetření mléka, pH, množství proteolýzy, teplota a doba dozrávání, přítomnost kyslíku, aktivita vody, relativní vlhkost a dostupnost mikroorganismů mohou mít také vliv na tvorbu BA. Druh mikroorganismu, který se v potravíně nachází, také ovlivňuje množství a typ biogenního aminu [1, 25, 30]. Pro snížení koncentrace BA je možno použít již zmíněnou tzv. diaminooxidázu, ale tento způsob dekontaminace je omezen použitelností v praxi, protože při příjmu vysokých dávek biogenních aminů z potravin není tento detoxifikační systém schopen všechny dostatečně odstranit [27]. Tvorbě biogenních aminů v potravinách se tradičně zabraňovalo především omezením mikrobiálního růstu chlazením a mrazem. Proto je třeba jako alternativy považovat sekundární kontrolní opatření k prevenci tvorby biogenních aminů v potravinách nebo ke snížení jejich vzniklých hladin. Pouze některé budou nákladově efektivní a praktické pro použití v praxi [25].

V současnosti se vyvíjí přístupy pro snížení obsahu biogenních aminů v potravinách, které zahrnují

- použití kultur, které degradují histamin,
- aplikace hydrostatických tlaků (HHP),

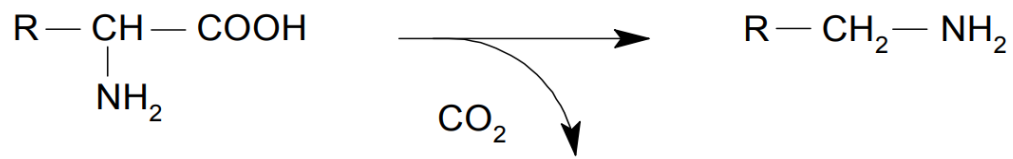
- ozařování,
- nové přístupy v balení (modifikovaná atmosféra MAP),
- použití aditiv do potravin, které mění environmentální podmínky.

Ke snížení obsahu biogenních aminů může být rovněž použita kombinace výše zmíněných metod jako např. v případě současného využití vysokého hydrostatického tlaku a amin-negativních startérů. Je ale ovšem nutná optimalizace podobných přístupů [25].

Degradace vzniklých biogenních aminů v potravinách lze dostáhnou využitím enzymu aminooxidáza. Aminooxidáza může být izolována z mikroorganismů. Oxidázy katalyzují deaminaci biogenních aminů za vzniku aldehydu, peroxidu vodíku a amoniaku. K degradaci biogenních aminů je možno použít bakterie, které tento enzym tvoří. Mezi rody bakterií, které jsou schopny degradovat biogenní aminy za pomoci enzymu aminooxidázy, patří *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Brevibacterium* a *Halomonas*. Je také ale známo, že některé druhy vláknitých hub mají též aminooxidázovou aktivitu a využívají aminy jako zdroj dusíku. Použití enzymů, jako je diaminoxidáza (DAO), které degradují biogenní aminy a použití bakterií, které mají tento enzym, jsou možnými nástroji k degradaci již vytvořených biogenních aminů a nejsou v současné době uznávány jako konzervační metody [25].

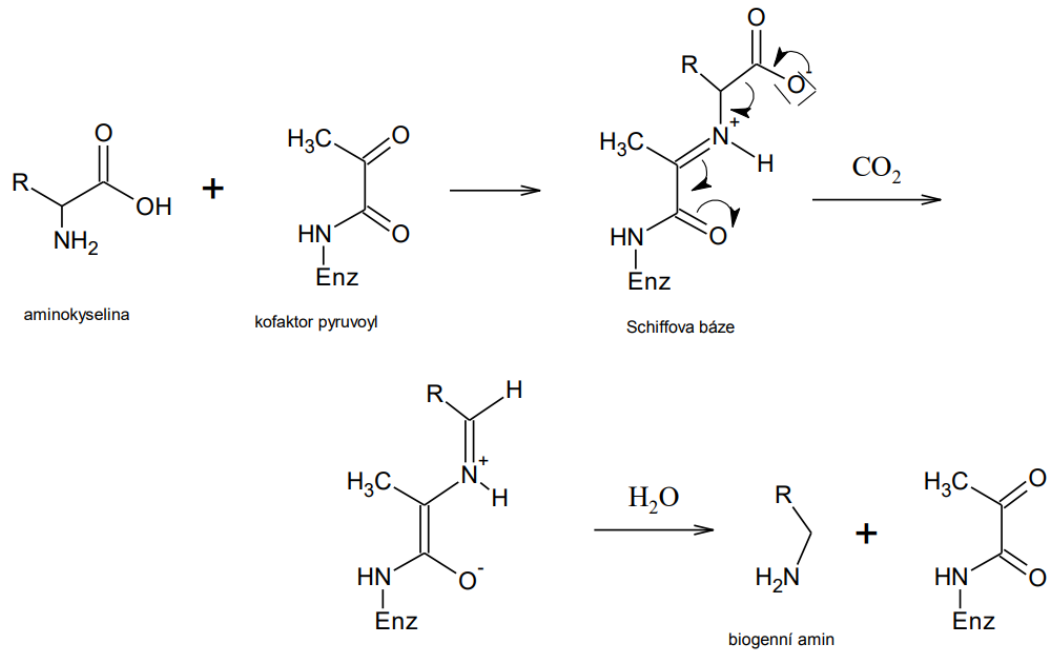
Tvorba biogenních aminů v sýru se může objevit během zrání, ve kterém je kasein degradován a volná aminokyselina může být přeměněna na BA pomocí mikrobiálních dekarboxyláz. Dochází k odštěpení molekuly oxidu uhličitého ze substrátu [15]. Při dekarboxylaci volných aminokyselin (činností bakteriálních dekarboxyláz) mohou vzniknout toxická množství biogenních aminů. Vzniklá množství biogenních aminů v sýrech ovlivňují faktory, které byly již zmíněny [30]. Dekarboxylace je chemická reakce a je katalyzovaná enzymem dekarboxylázou, která se řadí do skupiny lyáz a koenzymem je pyridoxal-5-fosfát. Hnilobné druhy bakterií, ale i řada druhů bakterií mléčného kvašení vykazují tuto funkci [15].

Bude-li substrátem aminokyselina, odštěpuje se z karboxylové skupiny oxid a dochází ke vzniku aminu, jak je uvedeno na Obrázku 6.

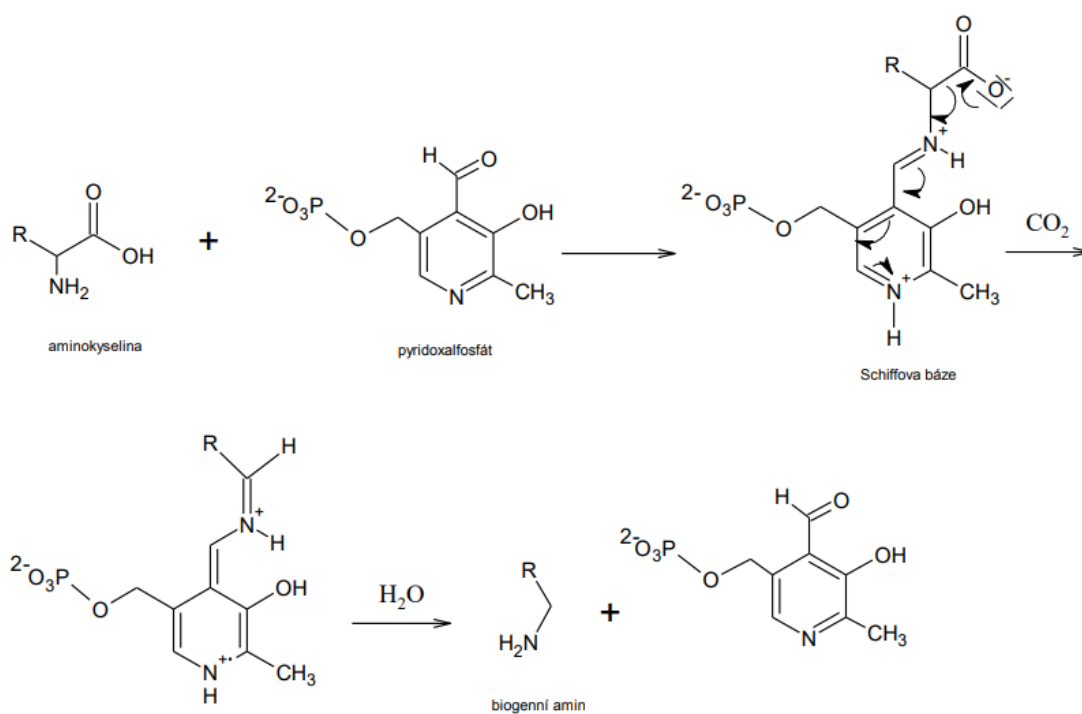


Obrázek 6. Obecná reakce vzniku biogenních aminů [15]

Dekarboxylace volných L-aminokyselin je reakce, při které se odštěpí α -karboxylová skupina a vznikne příslušný amin a oxid uhličitý. Tyto reakce mohou probíhat dvěma mechanismy [13]. Na Obrázku 7 je znázorněna dekarboxylace přes pyruvoylový zbytek a na Obrázku 8 dekarboxylace přes pyridoxalfosfát. Reakce aminoskupiny α -aminokyseliny s karbonylovou skupinou prostetické skupiny enzymu vznikají přechodné iminosloučeniny, které se nazývají jako Schiffovy báze [14].



Obrázek 7. Dekarboxylace L-aminokyselin přes pyruvoylový zbytek. [14]



Obrázek 8. Dekarboxylace L-aminokyselin přes pyridoxalfosfát [13]

2.3.1 Faktory ovlivňující mikrobiální dekarboxylační aktivitu

Pro snížení obsahu biogenních aminů je potřeba vybírat technologicky významné mikroorganismy se sníženou dekarboxylázovou aktivitou nebo nejlépe úplně bez dekarboxylázové aktivity [3, 25]. Mezi nejdůležitější zástupce s dekarboxylázovou aktivitou patří laktobacily, které se do sýrů během výroby mohou přidávat jako doplňkové kultury, ale mohou se tam nacházet i jako NSLAB [3, 11, 32]. Řada bakterií má i enzymy, které oxidují biogenní aminy v potravinách (aminokonjugátové bakterie) např. *Lactobacillus plantarum* a *Lactobacillus paracasei* subsp. *L. paracasei* patří i mezi amin-negativní bakterie. Tyto amin-negativní mikroorganismy byly navrženy jako potenciální startéry pro výrobu sýrů [25].

Aby byl obsah biogenních aminů v potravinách snížen je zapotřebí mikroorganizmům nastavit vhodné podmínky. Nejdůležitějšími faktory, které ovlivňují aktivitu mikrobiálních dekarboxylačních enzymů, je několik:

1. Dostupnost substrátu

Přítomnost volných aminokyselin a zkvasitelných sacharidů. Ideální koncentrace glukózy v substrátu je 0,5 – 2 %, zatímco koncentrace nad 3 % může syntézu inhibovat.

2. pH

Koncentrace vodíkových iontů ovlivňuje a v některých případech i inhibuje růst mikroorganismu. Pro dekarboxylační mikroorganismy je optimální pH v rozmezí od 4,0 do 5,5. Nízké pH napomáhá produkci a také má vliv na aktivitu dekarboxylázových enzymů, produkce zásaditých biogenních aminů tak slouží jako obrana proti kyselému prostředí [3, 26, 30].

3. Teplota

Vhodná teplota např. pro tvorbu histaminu je při 20 °C, při 5 °C se tvoří méně z důvodu poklesu aktivity daného mikroorganismu [3, 26]. Obecně platí, že se rychlost tvorby biogenních aminů zvyšuje s rostoucí teplotou [26]. Zmrazení je účinnější, než chlazení při prevenci tvorby biogenních aminů. Při zahřívání může dojít ke zničení bakterií produkujících histamin v potravinách. Pokud dojde k rekontaminaci a teplotním výkyvům po tepelném zpracování, může docházet k tvorbě histaminu v tepelně zpracovaném produktu. Nicméně, jak již bylo uvedeno, histamin je tepelně stabilní, takže použití tepelného ošetření po vytvoření histaminu ve výrobku nezajistí jeho bezpečnost [25, 30].

4. Přítomnost solí

Přítomnost solí obecně inhibuje tvorbu biogenních aminů z důvodu toho, že mikroorganismy, které tvoří daný biogenní amin, nemusí být halotolerantní a také v přítomnosti chloridu sodného se inhibuje aktivita histidin-dekarboxylázy.

5. Přítomnost kyslíku

Přítomný kyslík, jako ovlivňující faktor je nejednoznačný. Na tvorbě biogenních aminů se mohou podílet mikroorganismy aerobní, fakultativně anaerobní i anaerobní.

6. Hygiena a doba skladování

Při získávání a zpracování surovin je nutno dodržovat a aplikovat hygienické zásady, které nám napomohou zamezit kontaminaci cizí mikroflórou. Doba skladování má také vliv na obsah biogenních aminů. Při prodlužování doby skladování roste obsah biogenních aminů v potravinách a to zejména v sýrech dlouho zrajících pod fólií než pod kůrou [3, 30].

7. Hydrostatický tlak

Vysoký hydrostatický tlak je metoda konzervace, která poškozuje buněčné membrány mikroorganismů, což má za následek inaktivaci nebo subletální účinek na buňku. Díky inaktivaci mikroorganismů prodlužuje vysoký hydrostatický tlak skladovatelnost při zachování původní chuti a vlastností. Metoda byla aplikována na mnoho potravin včetně sýra, ale inhibice tvorby biogenních aminů závisí na úrovni aplikovaného tlaku [25].

II. PRAKTICKÁ ČÁST

3 CÍL PRÁCE

Cílem bakalářské práce bylo popsat vývoj biogenních aminů v závislosti na přídavku vybraných kmenů mikroorganismů a době zrání sýrů holandského typu. Základní cíl byl rozdělen do několika dílčích cílů:

- vyrobit modelové šarže sýrů s producentem biogenních aminů *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 946 a potenciálními degradéry biogenních aminů *Citrobacter freundii* KS 32 a *Pseudomonas fragi* KS 43
- v rámci skladovacího experimentu sledovat vybrané vlastnosti modelových sýrů
- porovnat obsah biogenních aminů v modelových šaržích během zrání

4 MATERIÁL A METODY

4.1 Výroba modelových vzorků sýrů

Materiál a pomůcky

- syrové kravské mléko
- lyofilizovaná mezofilní smetanová kultura Laktoflora (MILCOM a. s., Česká republika)
- chlorid vápenatý 36 % (MILCOM a. s., Česká republika)
- syřidlo Chymax M (Chr. Hansen, Dánsko)
- potravinářská sůl (Herold řeznické potřeby s. r. o., Česká republika)
- antimykotický přípravek Delvocid (O.K. Servis BioPro s. r. o., Česká republika)
- kyselina peroctová Divosan Activ (Diversey, Česká republika)
- laboratorní odstředivka FT15 (Armfield Inc., Velká Británie)
- výrobce sýrů (Driml, Česká republika)
- analytické váhy (A&D GH-200 EC, LABICOM s. r. o., Česká republika)
- vakuová balička Mini Jumbo (Henkelman, Nizozemsko)
- zrací komora (Candy, Itálie)
- germicidní UV lampa NBVE 110/55 (Ultra Viol, Polsko)
- termostat Microbiological IL53 (VWR, Evropská Unie)
- odměrné válce, plastové zkumavky, automatická pipeta, kádinky, naběračka

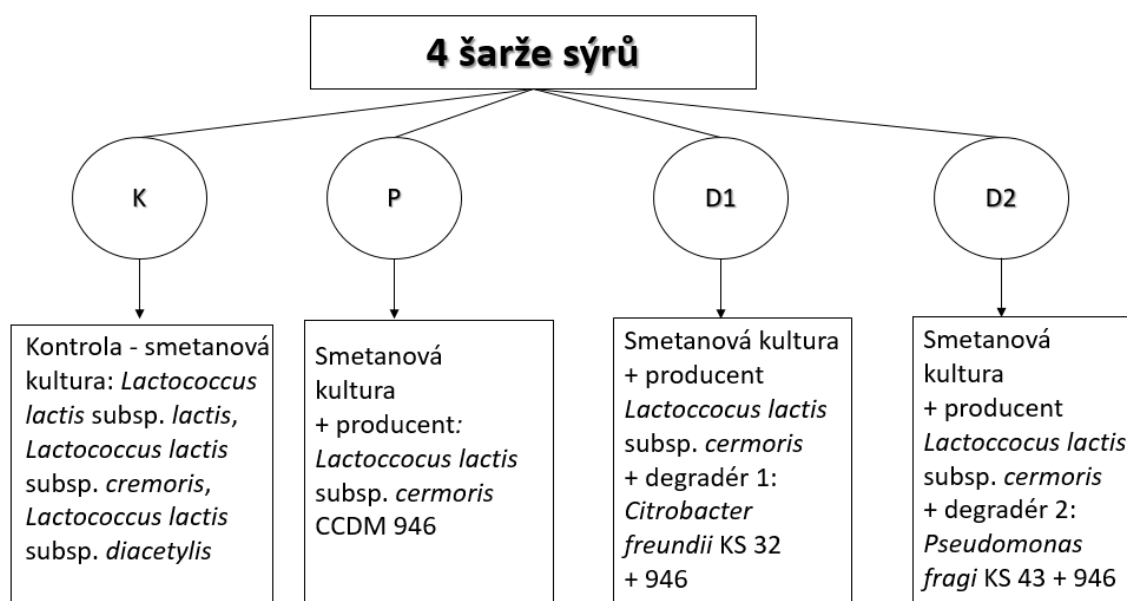
Postup výroby

Byly vyrobeny celkem čtyři šarže sýrů s nízkodohřívanou sýřeninou typu gouda, které byly posléze používány pro zrací pokus. Prvním krokem výroby bylo předehtání mléka na teplotu 37 ± 1 °C z důvodu snížení viskozity pro lepší odstředění. Po předehtání bylo mléko převedeno na odstředivku pro oddělení mléka a smetany. Následně bylo mléko nastandardizováno na obsah tuku v mléce 3 % pro dosažení výsledné požadované tučnosti 45 % tvs. Nastandardizované mléko bylo převedeno do výrobce sýrů. Byla použita krátkodobá šetrná pasteurace pro polotvrdé sýry. Mléko bylo zahříváno na teplotu 74°C/20s. Pasterované mléko se

ochladilo a vytemperovalo na inokulační a sýřící teplotu $32\pm 1^\circ\text{C}$. Mléko o objemu 35 litrů bylo inokulováno předem připraveným provozním zákyssem o celkovém objemu 160 ml:

- 160 ml smetanového provozního zákysu v případě kontrolní šarže (označení šarže K): *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Lactococcus lactis* subsp. *diacetylus*
- 120 ml smetanového provozního zákysu a 40 ml zákysu s kmenem, který produkuje biogenní aminy *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 946 (označení šarže P)
- 80 ml smetanového provozního zákysu, 40 ml zákysu s produkujícím kmenem CCDM 946 a 40 ml zákysu s kmenem *Citrobacter freundii* KS 32, který je testován na degradaci biogenních aminů (označení šarže D1)
- 80 ml smetanového provozního zákysu, 40 ml zákysu s produkujícím kmenem CCDM 946 a 40 ml zákysu s kmenem *Pseudomonas fragi* KS 43, který je testován na degradaci biogenních aminů (označení šarže D2)

Schéma inokulace jednotlivými kulturami v daných šaržích je znázorněno na Obrázku 9.



Obrázek 9. Schéma výroby s použitím daných mikroorganizmů

Dále se k mléku ve výrobníku přidalo 17,5 ml nasyceného roztoku CaCl_2 , aby bylo podpořeno sýření. Připravená směs se důkladně promíchala a kultura se nechala 20 minut reaktivovat za současného míchání. Po uplynulých 20 minutách se přidalo syřidlo o objemu 1120 μl . Směs se krátce intenzivně promíchala a ponechala se stát v klidu 30 minut. Po uplynutí

době se vzniklá sýřenina prokrojila pomocí sýrařské harfy podélně i příčně. Prokrojená sýřenina se opět nechala v klidu stát 10 minut, ve které docházelo k uvolňování syrovátky. Následně se pomocí sýrařské harfy s vertikálními strunami sýřenina ručně drobila po dobu 5 minut. Po této době se sýřenina míchala pomocí míchadla 30 minut, kdy docházelo k vytužování sýrařských zrn. Po vytužení se za stálého míchání odebírala syrovátka v objemu 10,5 l (cca do 30 % původního objemu mléka). K sýrařskému zrnu se po malých dávkách přidávala voda o objemu 7 l (cca do 70 % objemu odebrané syrovátky) o teplotě 60 °C pro vzrůst teploty systému na 37 °C, tak aby docházelo k dohřívání sýra. Dohřívání sýra muselo být pozvolné, aby se zrno neuzavřelo z důvodu rychlého přidání teplé vody. Po udržení požadované teploty 37 °C se použila regulace pomocí řídicí jednotky výrobce. Dosoušení zrna probíhalo za stálého míchání po dobu 30 minut, tak aby se zrno neusazovalo na dno výrobce. Sýřenina byla slévána do vany, kde se sýrařské zrno předlisovalo 20 minut. Předlisovaná sýřenina byla rozkrájena a vložena do 12 forem, které byly vyloženy plachetkou. Sýry se lisovaly pomocí 4 lisů ve trojici dle lisovacího plánu

1. lisování

Doba lisování	Zátěž na páce
30 min	5 kg
30 min	15 kg
30 min	25 kg

Otočení sýrů

2. lisování

Doba lisování	Zátěž na páce
60 min	25 kg

Vylisované sýry se vložily do nádob a umístily do lednice k prokysání do druhého dne (6 ± 2 °C). Druhý den byly sýry vloženy do solné lázně o teplotě 8 °C a soleny 3 hodiny. Cekem byly připraveny 4 solné lázně. Po solení byly sýry ošetřeny antimykotickou suspenzí (Delvocid XT1, DSM, Nizozemsko). Sýry se zabalily do vakuové smrštitelné fólie. Označené

sýry se daly zrát do zrací komory (10 ± 1 °C) po potřebnou dobu. Odběry modelových vzorků pro analýzy byly provedeny 1., 14., 28., 56. a 84. den zrání.

4.2 Mikrobiologický rozbor

Mikrobiologický rozbor byl proveden na Ústavu inženýrství ochrany životního prostředí, Fakulty technologické.

Pro stanovení mikroorganismů byly použity kultivační půdy PCA (pro všechny mikroorganismy), ENDO a VRBA (enterobakterie), Slanetz-Bartley (enterokoky), CHYGA (plísňe a kvasinky), M17 (mléčné koky), MRS (laktobacily) a agar s penicilinem a pimarcinem (G- nefermentující tyčinky) – pouze pro šarži D2. Stanovení na ostatních půdách bylo provedeno pro všechny vzorky sýra. Mikrobiologické stanovení bylo prováděno 1., 14., 28., 56., a 84. den.

Počet mikroorganismů byl vyjádřen jako KTJ (kolonie tvořící jednotku), z angl. CFU (colony forming unit), který je vztažen na jednotku objemu nebo hmotnosti, podle povahy vzorku, tedy KTJ/ml nebo KTJ/g.

Vypočte se dle vzorce:

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

$\sum C$ – součet kolonií ze všech ploten vybraných pro výpočet

V – objem inokula v ml

n_1 – počet ploten vybraných k výpočtu z prvního zvoleného ředění

n_2 – počet ploten vybraných k výpočtu z druhého zvoleného ředění

d – faktor ředění odpovídající prvnímu pro výpočet zvolenému ředění

4.2.1 Stanovení celkového počtu mezofilních aerobních a fakultativně anaerobních mikroorganismů

Celkový počet mikroorganismů (CPM) byl stanoven podle normy ČSN EN ISO 4833. Bylo naváženo 5 g vzorku sýra, který byl naředěn devítinásobkem fyziologického roztoku. Vzorek se nechával homogenizovat a bylo získáno 0. ředění. Poté se připravilo příslušné deset-

kové ředění (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4}) do připravených sterilních zkumavek se 4,5 ml fyziologického roztoku. Očkování se provádělo roztěrem 0,1 ml na sterilní Petriho misku s půdou připravenou půdou PCA. Vždy bylo provedeno čtyř desítkové vhodné ředění a očkováno na čtyři Petriho misky. Kultivace probíhala při teplotě 30 °C 48 hodin.

Kultivační půda PCA je neselektivní médium a slouží ke stanovení celkového počtu mezofilních aerobních a fakultativně anaerobních mikroorganismů.

4.2.2 Stanovení plísní a kvasinek

Plísně a kvasinky byly stanoveny podle ČSN ISO 21527-1. Bylo naváženo 5 g vzorku sýra, který se naředil devítinásobkem fyziologického roztoku. Následovala homogenizace, kterou se získalo 0. ředění. Poté bylo připraveno příslušné desítkové ředění (10^{-1} , 10^{-1} , 10^{-2}) do připravených sterilních zkumavek se 4,5 ml fyziologického roztoku. Očkování se provádělo roztěrem 0,1 ml na sterilní půdu CHYGA. Provedeny byly tři desítkové ředění a očkovalo se na tři Petriho misky. Kultivace na půdě CHYGA probíhala při pokojové teplotě 48 hodin.

4.2.3 Stanovení enterokoků

Enterokoky byly stanoveny dle ČSN ISO 7899-2. Bylo třeba navážit 5 g vzorku sýra, který se naředil devítinásobkem fyziologického roztoku. Následovala homogenizace, se kterou bylo získáno 0. ředění. Poté se připravilo desítkové ředění (10^{-1} , 10^{-1} , 10^{-2}) do sterilních zkumavek, ve kterých bylo 4,5 ml fyziologického roztoku. Očkování se provádělo přelivem 0,1 ml vzorku na sterilní půdu SB. Vždy byly provedeny tři desítkové ředění a očkováno bylo na tři Petriho misky. Kultivace probíhala při teplotě 37 °C /48 hodin.

4.2.4 Stanovení koliformních bakterií

Koliformní bakterie byly stanoveny podle ČSN EN ISO 4832. Bylo naváženo 5 g vzorku sýra, který se naředil devítinásobkem fyziologického roztoku. Následovala homogenizace, se kterou jsme získali 0. ředění. Poté bylo připraveno desítkové ředění (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3}) do připravených sterilních zkumavek se 4,5 ml fyziologického roztoku. Očkování se provádělo roztěrem 0,1 ml na sterilní pomnožovací půdu s půdou Endův agar a VRBA. Byly provedeny tři desítkové ředění a očkováno bylo na tři Petriho misky. Kultivace probíhala při teplotě 37 °C /48 hodin. Půdy pro koliformní bakterie slouží ke stanovení enterobaktrií. Endův agar slouží k potlačení G+ bakterií a k důkazu aldehydů, které vznikají jako štěpné produkty laktózy.

4.2.5 Stanovení bakterií mléčného kvašení

Bakterie mléčného kvašení byly stanoveny dle ČSN ISO 15214. Bylo naváženo 5 g vzorku sýru, který se naředil devítinásobkem fyziologického roztoku. Následovala homogenizace, se kterou jsme získali 0. ředění. Poté bylo připraveno příslušné desítkové ředění (10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5}) do předem připravených sterilních zkumavek se 4,5 ml fyziologického roztoku. Očkování se provádělo roztěrem 0,1 ml na sterilní pomnožovací médium s půdou M17 a MRS. Vždy byly provedeny čtyři desítkové ředění a očkovalo se na čtyři Petriho misky. Kultivace na půdě M17 probíhala při teplotě 30 °C /48 hodin a inkubace na půdě MRS probíhala při teplotě 30 °C /48 hodin v aerostatu za přítomnosti oxidu uhličitého.

Půda M17 je živné médium, které slouží pro stanovení mléčných koků (streptokoky, laktokoky, leukonostoky) a stanovily se dle ČSN ISO 15214. Kultivační půda MRS slouží ke stanovení laktobacilů.

4.2.6 Stanovení G- nefermentujících tyčinek

G- nefermentující tyčinky se stanovily podle normy ČSN ISO 13720. Tahle norma popisuje stanovení počtu bakterií rodu *Pseudomonas* v mléce a mléčných výrobcích. Stanovení se použilo pouze pro šarži sýra D2. Tuhle metodou lze zachytit všechny pigmentující i nepigmentující psychrofilních bakterie rodu *Pseudomonas*. Na kultivační půdu Agar s penicilinem a pimarinem bylo nanášeno 0,1 ml příslušného desítkového ředění vzorku sýra a rozetřeno po celé plotně pomocí hokejky. Petriho misky se umístily do inkubátoru a nechaly se kultivovat při teplotě 25°C/48 hodin.

4.3 Základní chemická analýza

4.3.1 Měření pH

Po stanovení texturních vlastností nastal měření pH. Probíhalo opět měření v den 1., 14., 28., 56. a 84. Kalibrovaným pH metrem (EUTECH INSTRUMENTS, Nizozemsko) jsme vzorek sýra změřily celkem šestkrát v celém povrchu hmoty.

4.3.2 Stanovení obsahu sušiny

Sušina byla stanovena podle normy ČSN EN ISO 5534. Sledovaný vzorek sýra se rozemlel, aby bylo možné ho lépe navažovat pro další analýzy. Stanovení obsahu sušiny bylo prováděno den 1., 14., 28., 56. a 84. Vždy se navažovaly cca 3g, které byly vloženy do zvážených misek s mořským pískem. Misky se vzorkem se promíchaly a vložily do sušárny (Venticell, Brněnská Medicinská Technika a. s., ČR) a sušeny při teplotě 105 ± 1 °C po dobu 5 hodin. Obsah sušiny se vypočítal pomocí vzorce:

$$\text{obsah sušiny [\% hmotnostní]} = \frac{(m_3 - m_1)}{m_2}$$

m_1 - hmotnost misky s pískem [g]

m_2 – hmotnost vzorku před sušením [g]

m_3 – hmotnost misky s pískem a vzorkem po vysušení [g]

4.3.3 Stanovení obsahu soli

Obsah soli se stanovil potenciometricky podle ČSN EN ISO 5943. Stanovení obsahu soli bylo provedeno v den 14., 28., 56. a 84. Před stanovením bylo nutno provést standardizaci roztoku dusičnanu stříbrného. Na analytických vahách (A&D GH-200 EC) byl navážen 1 g homogenizovaného vzorku sýra. Vzorek se následně rozmělnil v třecí misce s 5 – 10 ml destilované vody o teplotě cca 60 °C. Ke vzorku se přidalo 2 ml HNO_3 (ředěná 1:4). Vzorek se doplnil destilovanou vodou na objem 120 – 130 ml tak, aby se mohly ponořit elektrody a teploměr. Kádinka se umístila na magnetickou míchačku a bylo titrováno roztokem dusičnanu stříbrného o koncentraci $c = 0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Zaznamenávaly se hodnoty napětí při 0 ml přídavku dusičnanu stříbrného a následně vždy po 0,5 ml přídavku dusičnanu stříbrného. Titrace se ukončila po dosažení napětí 400 mV. Objem byl určen výpočtem z druhé derivace. Byla provedena tři opakování.

4.3.4 Stanovení obsahu tuku

Stanovení obsahu tuku se provádělo v den 1., 14., 28., 56. a 84. Na skleněnou lodičku vsazenou do butyrometru bylo naváženo 3,00 g vzorku sýru. Horním otvorem butyrometru se vpustilo asi 14 ml kyseliny sírové. Butyrometr se zazátkoval a vložil do vodní lázně o teplotě 65 °C za promíchávání. Po rozpuštění sýru se přidal 1 ml amylalkohol a zředěná kyselina

sírová (tak aby sahala do 2/3 stupnice butyrometru). Poté se butyrometr zazátkoval, několikrát obrátil a vytemperován v lázni o teplotě 65 °C. Poté následovalo 5 minut odstředování. Po odstředění se ponechal butyrometr 5 minut ve vodní lázni o teplotě 65 °C a na stupnici se přímo odečetly hmotnostní procenta tuku. Procentuální podíl tuku z celé sušiny (tuk v sušině) byl vyjádřen pomocí výpočtu:

$$x = \frac{100 \cdot t}{s}$$

s – sušina v %

t – tučnost v %

x – tuk v sušině v %

4.4 Texturní profilová analýza

Analýza texturních vlastností vzorků sýrů byla provedena pomocí přístroje TA.XT Plus (Stable Micro Systems Ltd., Godalming, Velká Británie) a sondy o průměru 100 mm. Ze středu vzorku sýra byl vykrojen válec o průměru 35 mm a výšce 20 mm. Provedl se kompresní test ve dvou cyklech se stlačením vzorku o 25 % jeho původní výšky rychlostí 2 mm/s. Ze zátěžové křivky se hodnotila tvrdost jako maximální síla v N dosažená během prvního stlačení. Dále se posoudila kohezivnost vzorku jako podíl ploch píků druhého a prvního kompresního cyklu. U každého vzorku byla provedena tři opakování.

4.5 Stanovení obsahu volných aminokyselin

Pro stanovení volných aminokyselin se vzorek nejdříve rozemlel a lyofilizoval (lyofilizátor ALPHA 1-4 LSC, CHRIST, LABICOM s. r. o., ČR).

Před samotným stanovením byla provedena třístupňová extrakce ze sušené hmoty sýru pomocí lithno-citrátového pufru a derivatizace.

Postup extrakce:

Do zkumavky byl navážen 1 g lyofilizovaného vzorku a přidán lithno-citrátový pufr v množství 10 ml. Vzorek byl nejprve dokonale promíchán na vortexu a následných 30 minut na třepačce (LT2). Následovalo odstředění při 6000 ot./min po dobu 10 min (odstředivka EBA

21, Hettich ZENTRIFUGEN, Germany, Tuttlingen). Supernatant byl přelit do odměrné baňky o objemu 25 ml, přidán lithno-citrátový pufr v množství 7 ml a celý postup byl opakován. Postup byl opakován ještě jednou po opětovném přidavku 7 ml lithno-citrátového pufru. Odměrná baňka byla doplněna po rysku lithno-citrátovým pufrem. Vzorky byly napietovány do eppendorfových zkumavek a následovalo odstředění při 15000 ot./min po dobu 45 minut (odstředivka MIKRO 200R, Hettich ZENTRIFUGEN, Germany, Tuttlingen). Poté byl vzorek přefiltrován přes stříkačkový filtr o velikosti pórů 0,45 μm .

Použité chemikálie pro extrakci:

- Kyselina citronová, p. a. LACHNER s.r.o. (Neratovice)
- Citronan lithný, p. a. ZMBD Chemik s.r.o.
- Chlorid lithný, p. a. ZMBD Chemik s.r.o.
- Hydroxid lithný, p. a. ZMBD Chemik s.r.o.

Postup derivatizace:

K 5 μl vzorku se přidalo 35 μl borátového pufru (0,2M, pH 7,3) a AQC (1 mg/1 ml ACN) při působení teploty 55 $^{\circ}\text{C}$ po dobu 10 min. Vzorek byl zchlazen. Po zchlazení se přidalo 170 μl kyseliny mravenčí 20mM a dávkovalo se do systému.

Použité chemikálie pro derivatizaci:

- Borátový pufr, MERCK s. r. o.
- AQC, WATREX s. r. o.

Pro vlastní stanovení byl použit vysoce účinný kapalinový chromatograf Agilent Technologies, Santa Clara, USA. Analytická kolona s předkolonou XBridge® BEH Plus C18 (3 x 10 mm, 2,5 μm), Waters, Irsko.

Chemikálie pro HPLC

- Acetonitril CHROMASOLV® Plus
- Methanol CHROMASOLV® Plus
- Acetátový pufr s 5 % přidavkem acetonitrilu
- Milli-Q voda upravená přístrojem TheaquaMAX™ Ultra 370 Series
- Standardy FAA – Sigma-Aldrich

U každého vzorku byly provedeny tři extrakce a z toho byl každý extrakt dvakrát analyzován.

4.6 Stanovení obsahu biogenních aminů

Před samotnou analýzou vzorků byla provedena lyofilizace stejně jako u stanovení obsahu volných aminokyselin a následně třístupňová extrakce a derivatizace. Z každého odebraného vzorku v centrifugační zkumavce o objemu 50 ml bylo odpipetováno vždy 5 ml vzorku do kádinky a zředěno stejným množstvím kyseliny chloristé o koncentraci 1,2 mol/l. Do předem připravených popsaných derivatizačních vialek o objemu 10 ml se odpipetovalo 100 µl vnitřního standardu 1,7-heptandiaminu, 1 ml zředěného vzorku, 1,5 ml karbonátového pufru o pH 11,1 – 11,2 a čerstvě připravený dansylchlorid o koncentraci 5 g/l, který byl zředěn acetonem. Po 24 hodinách, kdy probíhalo třepání směsi v temnu, se přidalo 200 µl prolinu a probíhalo třepání ještě 1 hodinu. Po přidavku 3 ml heptanu se protřepávalo 3 minuty ručně. Pak se z horní vrstvy vzorku odebral 1 ml s obsaženými deriváty biogenních aminů. Následovalo odpaření heptanu inertním dusíkem při 60 °C a odparek se zředil acetonitrilem (1,5 ml). Samotné stanovení připravených vzorků proběhlo pomocí vysokoučinného kapalinového chromatografu Dionex HPLC UltiMate 3000, Německo. Analytická kolona s předkolonou ZORBAC RRHD Eclipse Plus C18, Agilent Technologies, USA.

Použité chemikálie:

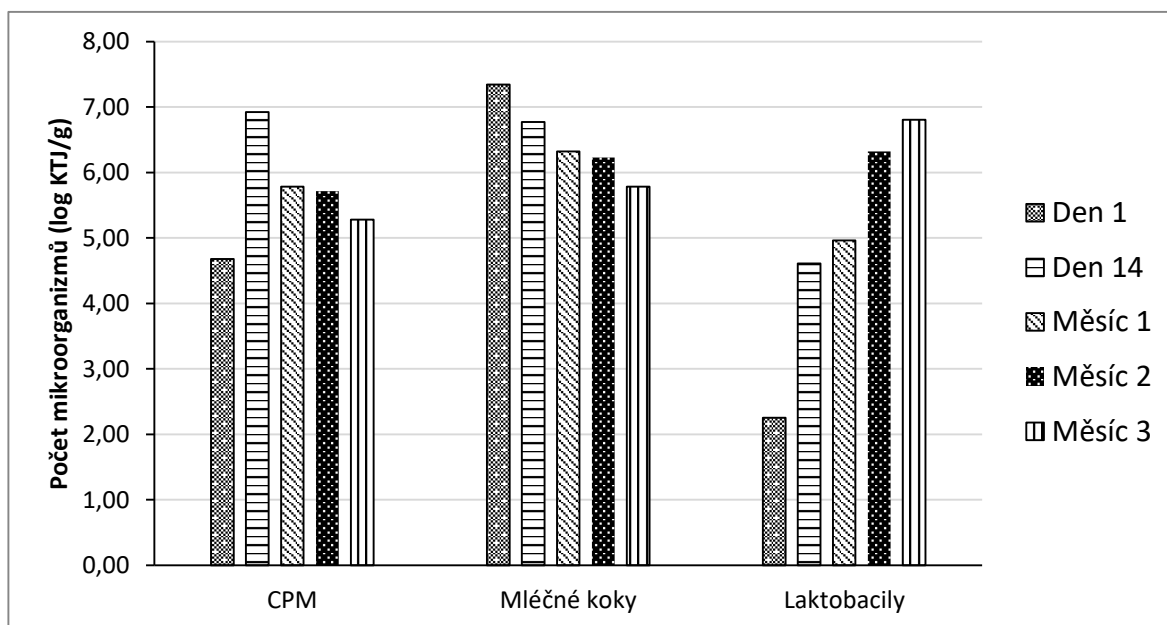
- Acetonitril CHROMASOLV® Plus
- Milli-Q voda upravená přístrojem TheaquaMAX™ Ultra 370 Series

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1 Mikrobiologický rozbor

Před tepelným ošetřením i po něm bylo mléko určené pro výrobu sýrů podrobena mikrobiologickému rozboru z důvodu požadavku vysoké mikrobiologické kvality. U výsledných sýrů byly stanoveny následující skupiny mikroorganismů: celkový počet mikroorganismů, koliformní bakterie, enterokoky, bakterie mléčného kvašení a mezofilní laktokoky a streptokoky.

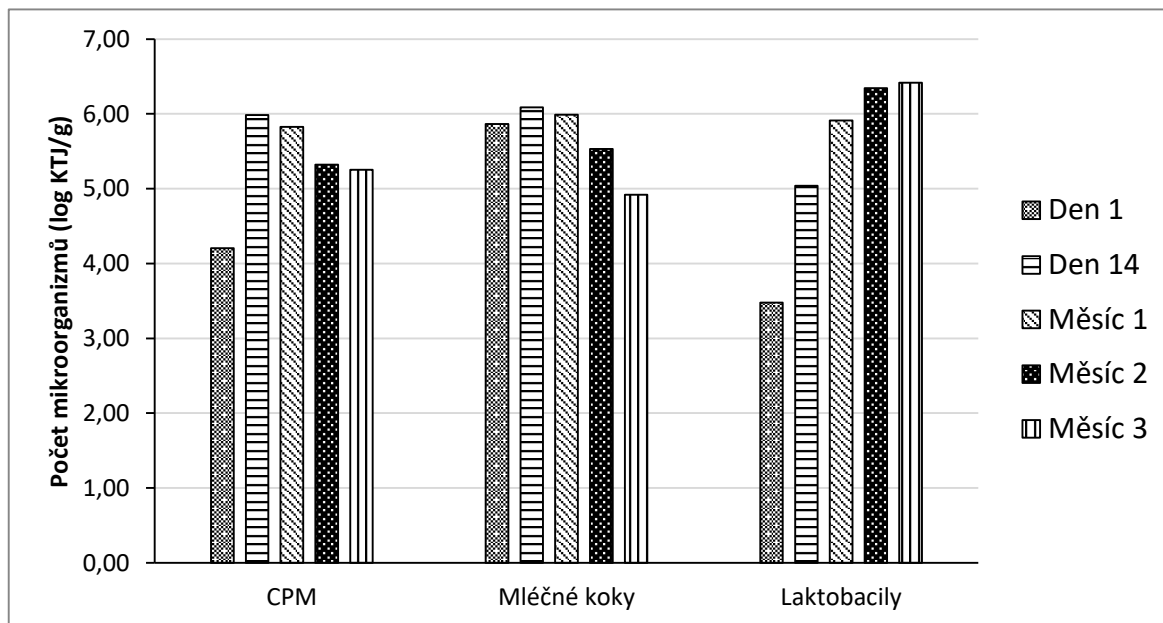
Mikroorganismy v šarži kontrolního sýra (K) jsou zobrazeny na Obrázku 10. V grafu lze vidět, že celkový počet mikroorganismů byl první den nejnižší a dosahoval hodnot 4,68 KTJ/g, ale ve 14 dnu zrání vzrostl až na 6,92 log KTJ/g. S postupem zrání celkový počet mikroorganismů klesal a dostal se až na výslednou hodnotu 5,28 log KTJ/g v 3. měsíci zrání. Počet mléčných koků s dobou zrání klesal ze 7,34 log KTJ/g na 5,79 log KTJ/g, ale počet laktobacilů od 1. dne zrání vzrůstal z 2,26 log KTJ/g na 6,81 KTJ/g.



Obrázek 10. Graf pro stanovení mikroorganismů v kontrolní šarži (K)

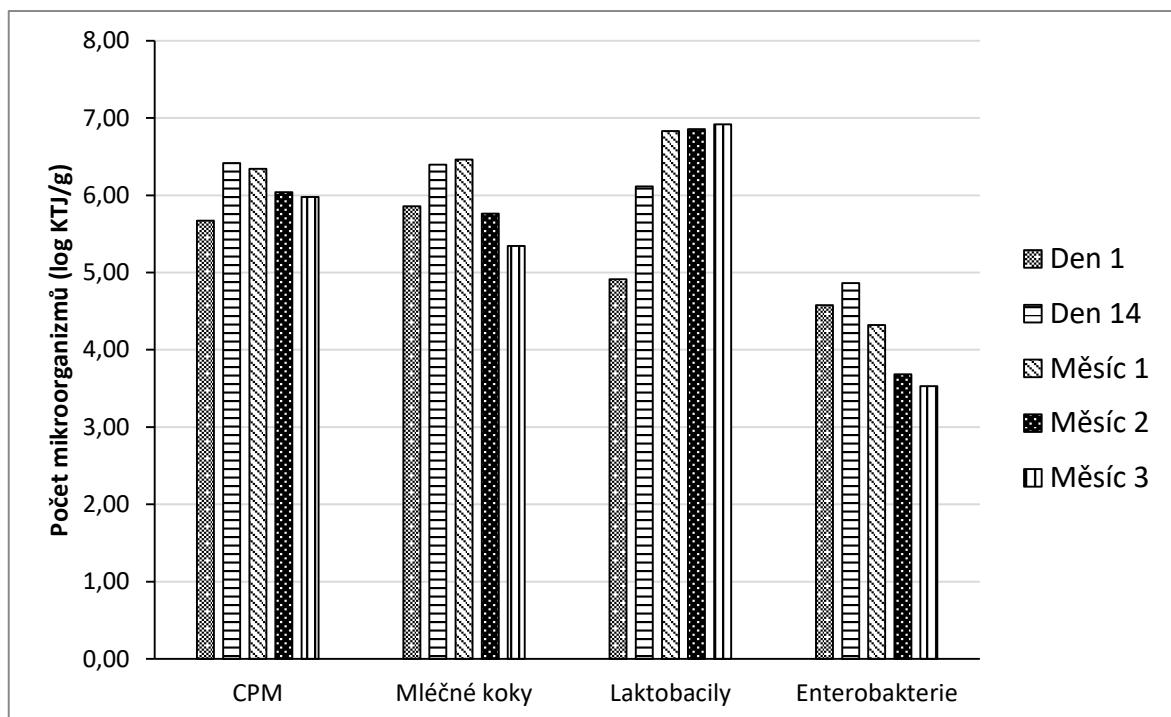
Vývoj mikroorganismů v šarži P s producentem biogenních aminů je zobrazena na Obrázku 11. V grafu můžeme vidět, že celkový počet mikroorganismů byl ve 14. dnu zrání nejvyšší a dosahoval hodnot 5,99 log KTJ/g a s dobou zrání jejich počet klesal na hodnotu 5,26 log

KTJ/g. Počet mléčných koků ve 14. dnu zrání mírně vzrostl na hodnotu 6,09 log KTJ/g, ale s dobou zrání začal klesat na hodnotu 4,29 log KTJ/g. Laktobacily od 1. dne zrání vzrůstaly z hodnoty 3,48 log KTJ/g na 6,41 log KTJ/g



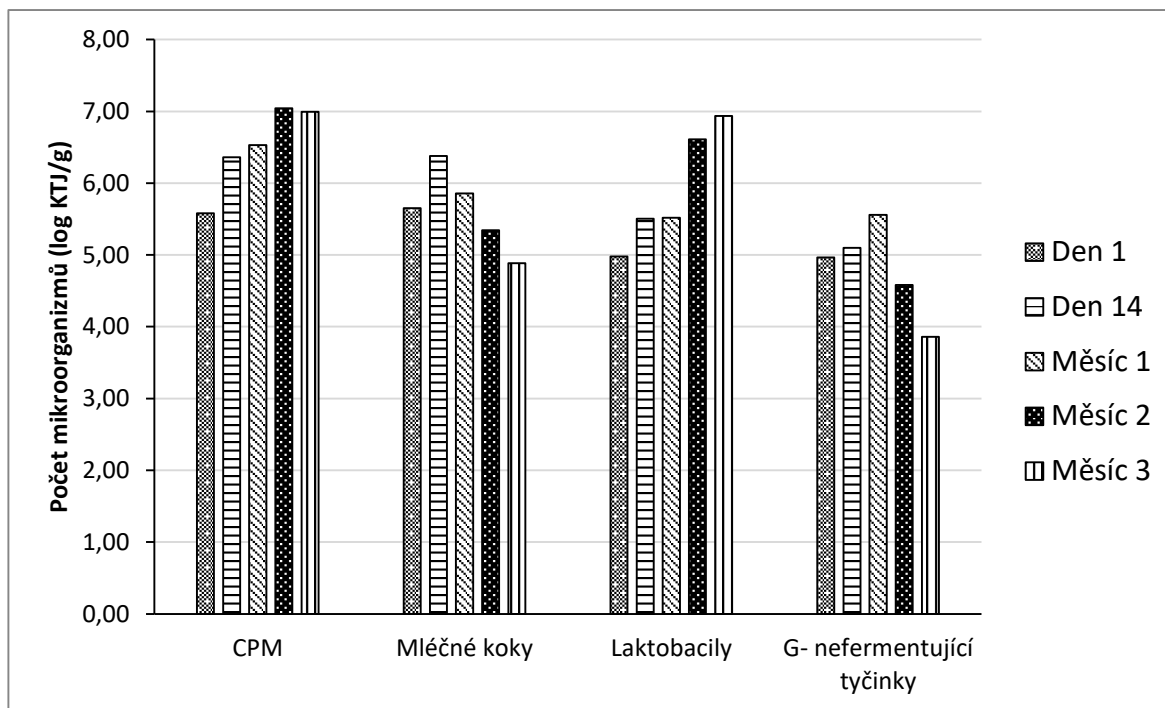
Obrázek 11. Graf pro stanovení MO v šarži s producentem biogenních aminů (P)

V Obrázku 12. je zobrazen vývoj mikroorganismů šarže D1 s potenciálními degradéry biogenních aminů. V grafu je možné vidět, že celkový počet mikroorganismů opět ve 14. dnu zrání vzrostl na hodnotu 6,41 log KTJ/g a s dobou zrání počet klesal na 5,98 log KTJ/g. Mléčné koky ve 14. dnu a 1. měsíci dni zrání vzrostly na hodnoty 6,40-6,46 log KTJ/g a od této doby začal jejich počet klesat na hodnotu 5,34 log KTJ/g. Počet laktobacilů od 1. dne zrání vrůstal a dosáhl hodnoty 6,92 log KTJ/g. Enterobakterie mohou ukazovat na kontaminaci či fekální znečištění. Ve 14. dnu zrání byl jejich počet vyšší než 1. den zrání a dostal se až na hodnotu 4,86 log KTJ/g, ale od 14. dne zrání jejich počet poklesl. V 3. měsíci zrání byl jejich počet 3,53 log KTJ/g.



Obrázek 12. Graf pro stanovení MO v šarži s kulturou degradující biogenní aminy (D1)

Na obrázku 13. je ukázán vývoj počtu sledovaných mikroorganismů v šarži sýrů s druhým potenciálním degradérem biogenních aminů (šarže D2). V grafu můžeme vidět, že na rozdíl od ostatních šarží sýrů, kde celkový počet mikroorganismu klesal, zde naopak jejich počet vzrostl až na hodnotu 7,00 log KTJ/g. Počet mléčných koků ve 14. dnu zrání vzrostl na hodnotu 6,38 log KTJ/g a s dobou zrání jejich počet jako u ostatních šarží klesl na hodnotu 4,89 log KTJ/g. Počty laktobacilů opět s dobou zrání vzrůstaly. Jejich počet na konci zrání byl 6,93 log KTJ/g. Z důvodu použitého kmene z rodu *Pseudomonas* byl u této šarže rovněž sledován počet G- nefermentujících tyčinek, který vzrůstal do 1. měsíce na hodnotu 5,56 log KTJ/g zrání a od této doby se jejich růst snížil na hodnotu 3,86 log KTJ/g.

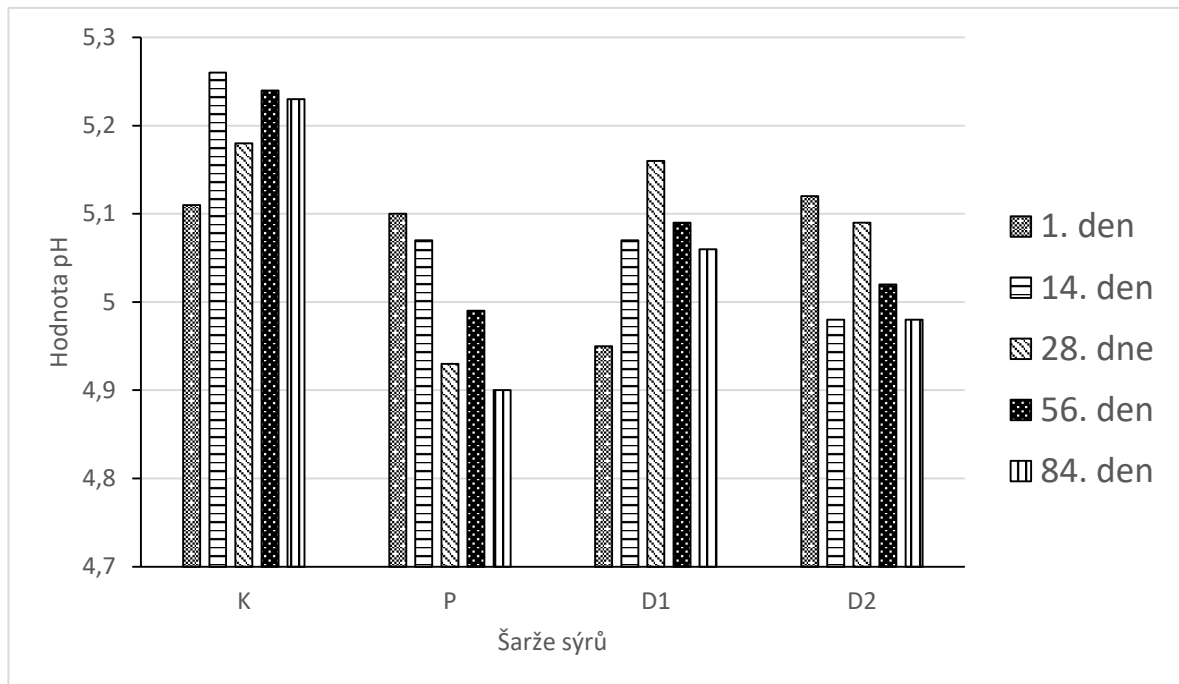


Obrázek 13. Graf pro stanovení MO v šarži degradující biogenní aminy (D2)

5.2 Základní chemická analýza

5.2.1 Stanovení pH

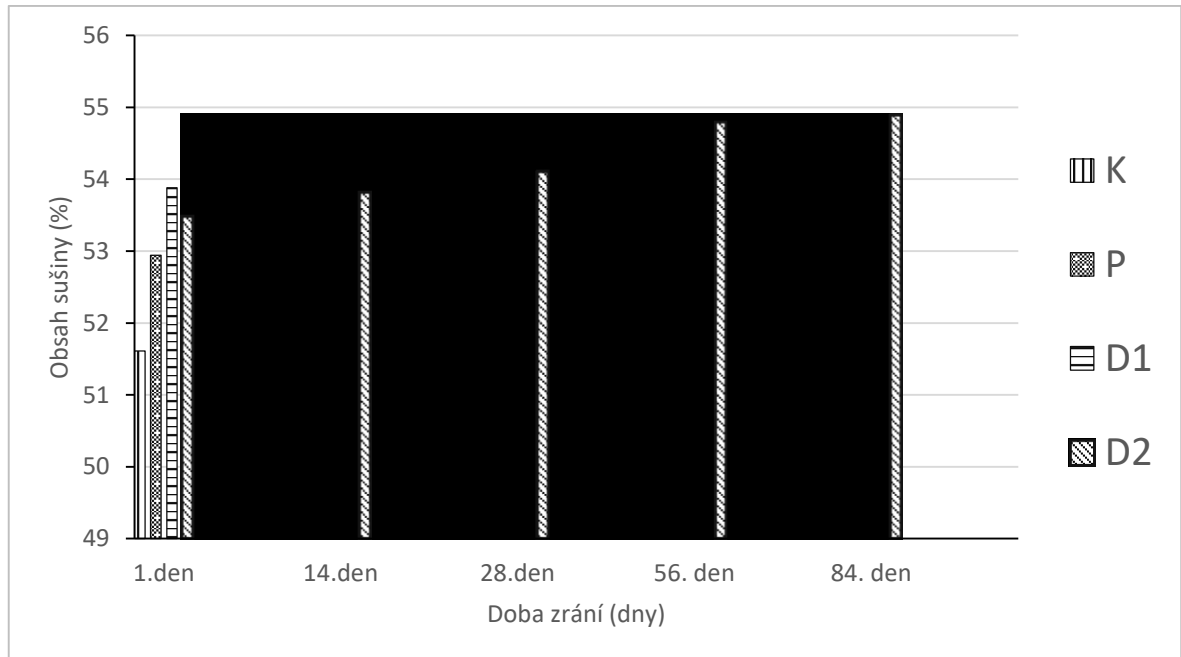
V průběhu zrání 84 dnů se sledoval vývoj pH, výsledky jsou zobrazeny na Obrázku 14. Z grafu je jasně viditelné, že u šarže K a u šarže D1 pH v době zrání narůstalo a u šarže P a D2 pH klesalo. Šarže K dosahovala nejvyššího pH ve 14. dnu zrání kdy bylo na hodnotě 5,26. 28. den zrání poté pH pokleslo na 5,18 a od této doby pH opět stoupalo. U šarže P pH klesalo z hodnoty pH 5,1 a k navýšení došlo pouze 56. den zrání, kdy bylo dosaženo hodnoty pH 4,99. Šarže D1 navyšovala svoje pH v průběhu zrání, kdy nejvyšší hodnoty bylo dosaženo 28. den zrání 5,16. Od tohoto dne pH v průběhu zrání mírně pokleslo na hodnotu 5,06. Šarže D2 prodělala ve 14. dnu zrání výrazné snížení hodnoty pH z 5,12 na pH 4,98. 28. den zrání hodnota pH opět vzrostla na hodnotu 5,09 a od tohoto dne pH klesalo až k hodnotě 4,98. Změny vývoje pH mohou být způsobeny intenzitou zrání v matrici sýru.



Obrázek 14. Graf závislosti průběhu změn pH na době zrání

5.2.2 Stanovení obsahu sušiny

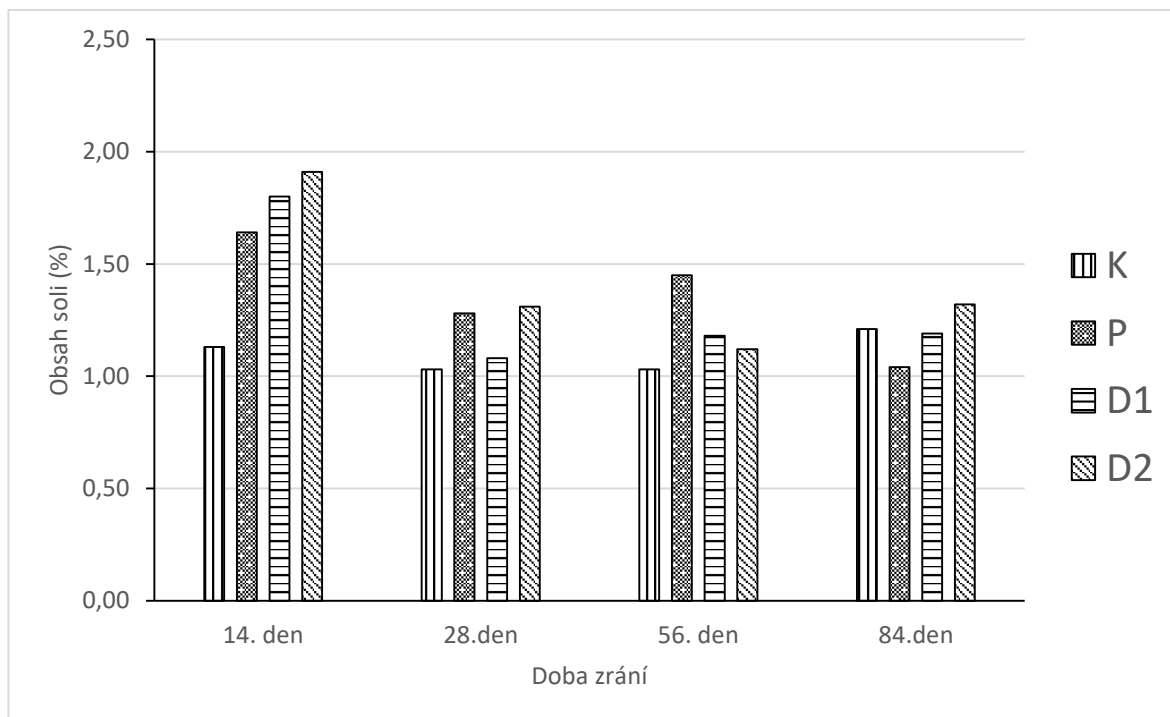
Výsledky stanovení obsahu sušiny v průběhu zrání 84 dnů jsou znázorněny na Obrázku 15. Z grafu je zřejmé, že obsah sušiny v průběhu zrání narůstal hlavně u šarže K a D2. Ze všech vyrobených šarží byl stanoven nejnižší obsah sušiny u kontrolní šarže (K) s výjimkou 14. den, z důvodu zhoršené standardizace mléčného tuku před pasterací mléka. Z 51,6 % obsahu sušiny v 1. dnu zrání, vzrostla sušina u této šarže na hodnotu 52,9 % sušiny. Ve 14. dnu zrání jsou hodnoty všech šarží vyšší (cca 54 % obsahu sušiny). Toto rozdílné stanovení můžeme pravděpodobně přisoudit chybnému měření. Od 28. dne zrání je vidět u šarže P, D1 a D2 obsah sušiny v rozmezí od 54,3 % až 54,4 % a že klesá s dobrou zrání. Od tohoto dne bylo u šarže K zaznamenáno opětovné zvýšení sušiny z 51,9 % na 53 % obsahu sušiny. Totéž se stalo i u šarže D2. Nejvyššího obsahu sušiny téměř 55 % dosahuje šarže sýru D2 v 56. a 84. dnu zrání.



Obrázek 15. Graf závislosti změny obsahu sušiny na době zrání sýra

5.2.3 Stanovení obsahu soli

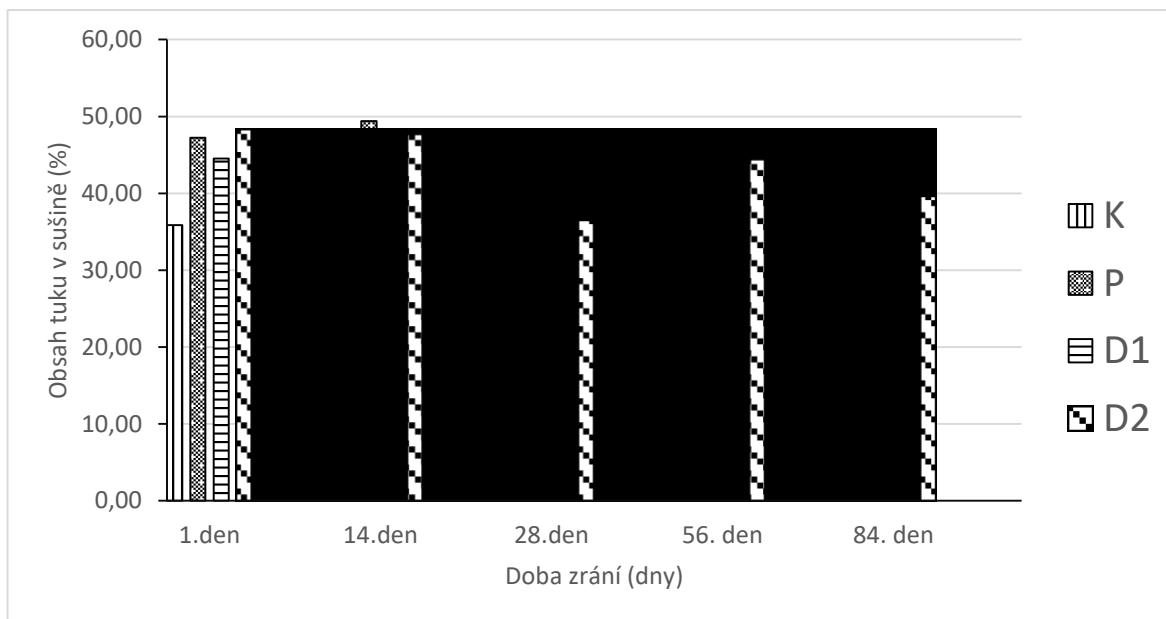
Od 1. dne zrání byl v modelových vzorcích sýrů analyzován obsah soli. Výsledky jsou vyneseny na Obrázku 16. Z grafu je patrné, že 14. den zrání obsah soli postupně vzrůstal. Obsah soli zde byl v rozmezí od 1,1 % - 1,9 %, přičemž nejnižší obsah soli byl pozorován u šarže K a nejvyšší obsah soli měla šarže D2. Ve 28. dnu zrání došlo k poklesu obsahu soli u všech šarží sýra a sůl se pohybovala v rozmezí od 1,0 – 1,3 %. Obsah soli se od 28. dne držel téměř ve stálých hodnotách. K nárůstu obsahu soli došlo u šarže P 56. den zrání z hodnoty 1,3 % na 1,4 %. 84. den zrání klesl obsah soli u této šarže na 1,0 %. 84. den zrání došlo k mírnému navýšení obsahu soli u šarže K, D1 a D2.



Obrázek 16. Graf závislosti obsahu soli na době zrání

5.2.4 Stanovení obsahu tuku v sušině

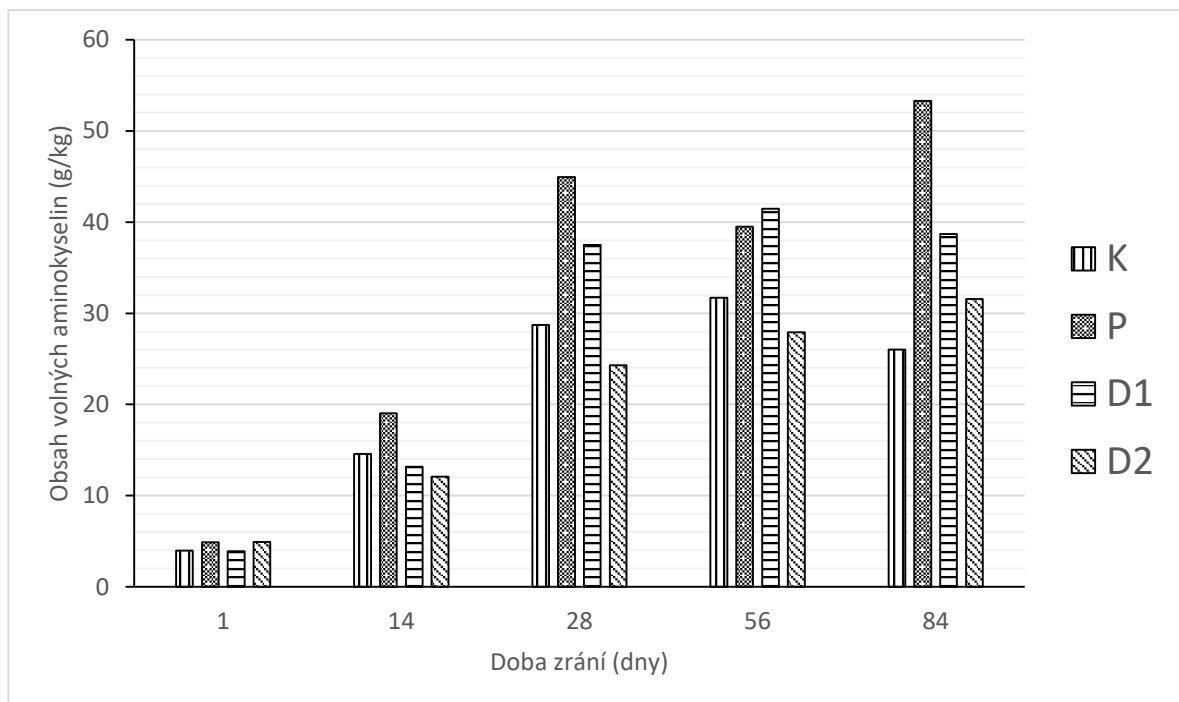
V průběhu zrání vzorků sýrů se prováděla analýza obsahu tuku v sušině po dobu 84 dnů. Výsledky jsou znázorněny na Obrázku 17. Z grafu je patrné, že obsah tuku v sušině postupně klesal s dobou zrání. V 1. dnu zrní byl obsah tuku v sušině v rozmezí od 35,8 (šarže K) – 48,3 % (šarže D2). Obsah tuku v sušině šarže K byl po dobu zrání v rozsahu od 35,8 – 28,9 %, kdy nejnižší hodnota byla naměřena ve 14. dnu zrání z důvodu špatné standardizace tuku v mléce před pasterací. U šarže P ve 28. dni zrání došlo k poklesu obsahu tuku v sušině na 42,6 %, ale 56. den zrání se obsah tuku v sušině opět navýšil. U šarže D1 a D2 se stalo totéž.



Obrázek 17. Graf závislosti změny obsahu tuku v sušině na době zrání sýra

5.3 Stanovení obsahu volných aminokyselin

Celkový obsah volných aminokyselin se stanovil pro posouzení intenzity zrání. V průběhu zrání a skladování se očekávalo zvyšující se množství, protože aminokyseliny jsou konečnými produkty proteolýzy. Každá šarže modelového sýra měla odlišný obsah sušiny, a proto se výsledky vztahovaly na tukuprostou sušinu. Jejich celkový obsah je znázorněn na Obrázku 18. Z grafu je jasně viditelné, že obsah volných aminokyselin v době zrání narůstal u všech šarží sýrů. V prvním dnu zrání byl obsah volných aminokyselin v rozsahu od 3,8 (D1) do 4,9 g/kg (D2) vzorku sýra. Rychlost narůstání obsahu volných aminokyselin, záviselo také na intenzitě uvolňování aminokyselin z proteinové matrice sýru. U šarže K narůstal obsah volných aminokyselin do 56. dnu zrání, kde bylo dosaženo hodnoty 31,7 g/kg a od této doby obsah volných aminokyselin poklesl na hodnotu 26 g/kg. Totéž bylo zaznamenáno i v případě šarže D2, ale obsah volných aminokyselin byl zde ve vyšších hodnotách (41,4 g/kg). U šarže P v 56. dnu zrání poklesl obsah volných aminokyselin z hodnoty 44,9 g/kg na 39,5 g/kg. U šarže D2 obsah volných aminokyselin narůstal po celou dobu zrání a dosáhlo se hodnoty 31,5 g/kg. Ze všech šarží sýrů byl obsah volných aminokyselin nejvyšší u šarže P a v 84. dnu zrání bylo dosaženo hodnoty 53,3 g/kg.

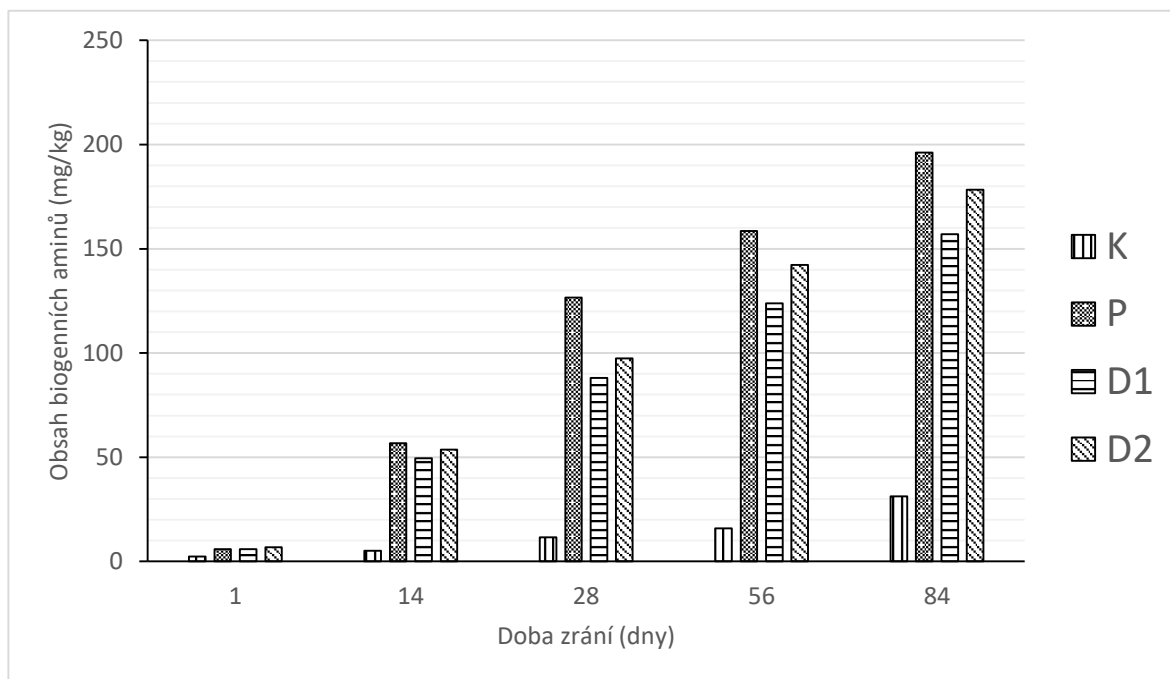


Obrázek 18. Graf závislosti změny obsahu volných aminokyselin na době zrání

5.4 Stanovení obsahu biogenních aminů

Během 84. denních zrání byl sledován obsah biogenních aminů. Volné aminokyseliny jsou prekurzory pro vznik BA.. Stanovení obsahu biogenních aminů je zobrazeno na Obrázku 19. V grafu můžeme vidět, že obsah biogenních aminů závisí na obsahu volných aminokyselin. Nejnižší produkci biogenních aminů má šarže K, kde byla použita pouze smetanová kultura (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Lactococcus lactis* subsp. *diacetylus*). Množství BA v době zrání se pohybovalo od 2,4 mg/kg (1. den zrání) do 31,3 mg/kg (84. dne zrání). Další v produkci BA byla šarže D1, kde byla použita smetanová kultura spolu s producentem a degradérem (*Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 946 + *Citrobacter freundii* KS 32) biogenních aminů. Obsah BA v době zrání se pohyboval v hodnotách od 6 mg/kg (1. den zrání) do 157 mg/kg (84. den zrání). Následovala šarže D2, ve které byla použita smetanová kultura spolu s producentem a degradérem (*Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 946 + *Pseudomonas fragi* KS 43) biogenních aminů. Obsah BA se zde pohyboval v rozmezí od 6,9 mg/kg (1. den zrání) do 178,3 mg/kg (84. den zrání). Nejvyšší obsah BA v době zrání má šarže P, ve které byla použita smetanová kultura spolu s producentem (*Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 946) biogenních aminů. Obsah

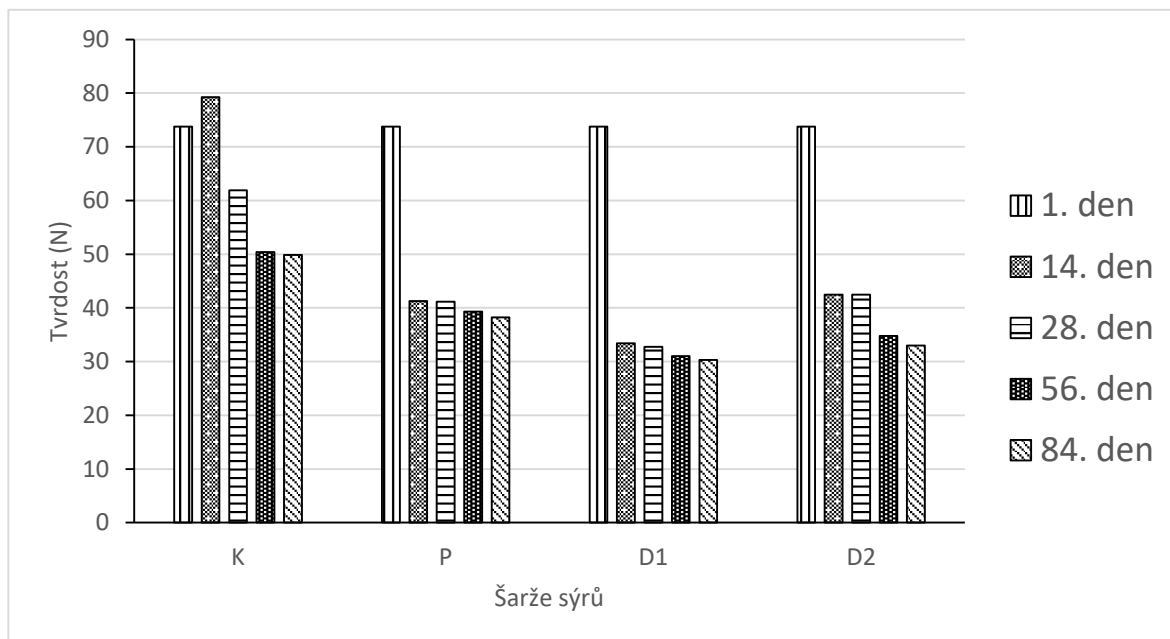
biogenních aminů se v této šarži pohyboval v rozmezí od 6 mg/kg (1. den zrání) do 196,2 mg/kg (84. den zrání). U šarže P byl produkován hlavně tyramin. Šarže P, D1 a D2 začaly od 28. a 56. dne zrání převyšovat bezpečný limit. Ze všech použitých kultur byla nejvhodnější smetanová kultura, protože nevykazovala tak vysokou produkci BA.



Obrázek 19. Graf závislosti změny obsahu biogenních aminů na době zrání

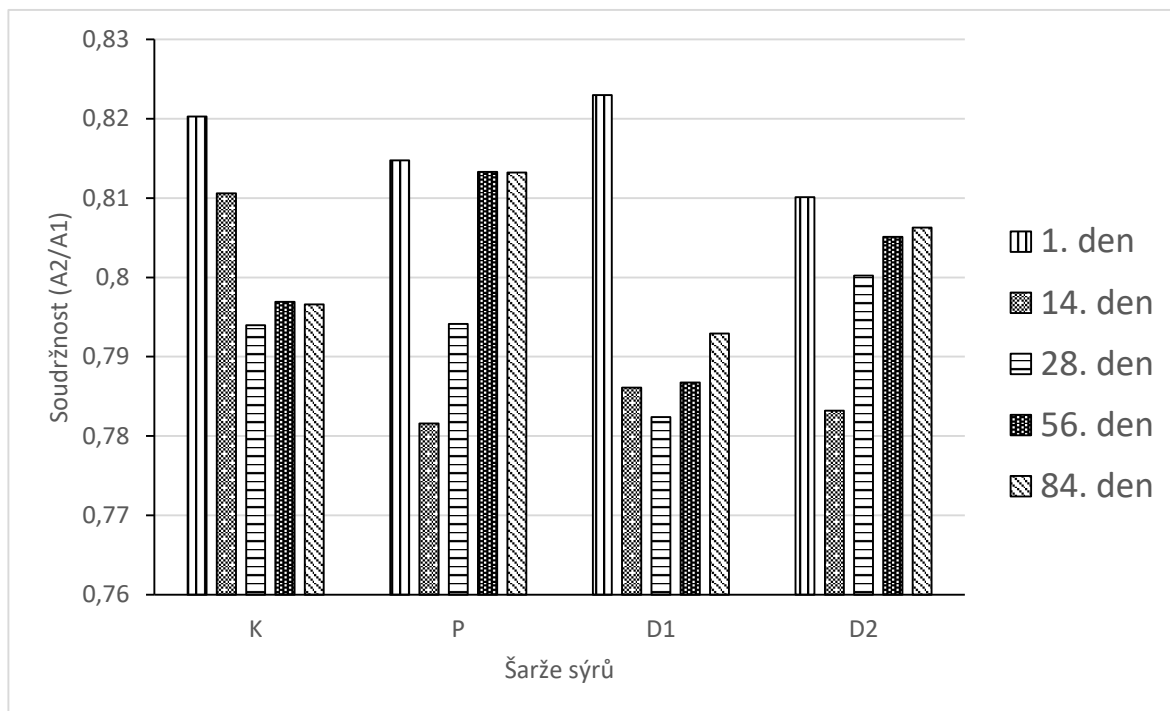
5.5 Texturní profilová analýza

V průběhu 84 denního zrání se u modelových vzorků sýrů prováděla analýza texturních vlastností. Výsledky tvrdosti vyjádřené jako maximální síla (N) použitá pro stlačení vzorku o 25 % původní výšky je znázorněna na Obrázku 20. V grafu lze pozorovat, že 1. den zrání byla tvrdost sýrů u všech šarží srovnatelná a dosahovala 73 N. Z grafu je též patrné, že tvrdost analyzovaných vzorků, klesala s dobou zrání z důvodu proteolýzy. Tvrdost sýrů byla také závislá na obsahu soli a obsahu sušiny. Výraznější pokles byl zaznamenán u vzorků P, kde hodnoty od 14. dne klesaly na hodnotu ze 41 N na 38 N., Dále u šarže D1 se zaznamenal nejvýraznější pokles tvrdosti a bylo to z hodnoty 33 N na 30 N. U šarže D2, byla tvrdost vyšší než P a D1 a taky hodnoty klesaly s dobou zrání ze 42 N na 33 N. Jednoznačně nejvyšších hodnot, dosahovala tvrdost vzorku K 14. den po výrobě (79 N). S dobou zrání docházelo k poklesu tvrdosti sýra u všech šarží.



Obrázek 20. Graf zobrazující tvrdost sýra na době zrání

Soudržnost (kohezivost) byla dalším parametrem, který byl v průběhu 84 denního skladovacího experimentu sledován. Lze ji také vyjádřit jako konzistenci, která nám udává pevnost vnitřních vazeb v potravíně. Je vyjádřena jako poměr plochy píků $A2/A1$. Výsledky jsou znázorněny na Obrázku 21. Nejvyšší soudržnost byla v 1. dnu zrání a pohybovala se v rozmezí od 0,81 – 0,82, kde nejvyšší byla u šarže D1. Od 14. dnu zrání došlo k výraznému poklesu všech šarží kromě šarže K, která prodělala nejmenší změnu a poklesla pouze na hodnotu 0,81. Ostatní šarže poklesly až na hodnotu 0,78 (šarže P). Po 28 dnech zrání se soudržnost sýrů opět postupně navyšovala. U šarže P a D2 byla soudržnost nejvyšší 56. a 84. den zrání. U šarže D1 soudržnost od 28. dne zrání byla v rozmezí od 0,78 – 0,79 a šarže D2 0,80.



Obrázek 21. Graf soudržnosti sýra na době zrání

5.6 Souhrnná diskuze

Během 84. denního zrání sýrů holandského typu se prováděly chemické analýzy, texturní profilové analýza, stanovení volných aminokyselin a mikrobiologická analýza. Všechny šarže vyrobených sýrů zrály ve zrací komoře při 10 ± 2 °C. Při provádění chemické a texturní analýzy bylo vizuálně zpozorováno, že v průběhu zrání (od 14. dne) začaly šarže sýrů D1 a D2 na povrchu mazovatět a byly lepivější, což lze přisoudit aktivitě záměrně inokulovaných kmenů rodů *Citrobacter* a *Pseudomonas*. Tyto druhy mikroorganismů se vyskytují v mléce a v mléčných výrobcích, kde mohou být jako zdroj kontaminace. Do mléka pro výrobu modelových šarží ale byly přidány záměrně jako potenciální degradéry biogenních aminů.

Z mikrobiologické analýzy bylo zjištěno, že u šarží K, P a D1 celkový počet mikroorganismů dosahoval nejvyšších hodnot vždy 14. den zrání a od této doby počty začaly klesat. S výjimkou šarže D2, kde počet od začátku zrání narůstal z důvodu toho, že i G- nefermentující tyčinky na začátku zrání narůstaly. S rostoucí dobou zrání dochází ke snižování starterových mikroorganismů, což je v souladu s tvrzením Foxe et al. [23]. Při pH přesahující hodnotu 5,0, která je optimální pro růst a pomnožení rodu *Lactococcus* si můžeme všimnout, že jsou nárůsty při těchto hodnotách vyšší. Laktobacily patří mezi bakterie mléčného kvašení

(NSLAB) a v průběhu zrání ve všech šaržích narůstaly a pohybovaly se v hodnotách $< 7,00$ log KTJ/g. Zvyšování jejich počtu bývá rychlé na počátku zrání a závisí i na teplotních podmínkách, ve kterých sýry zrají [36]. Koliformní bakterie byly stanoveny plotnovou metodou na Endově agaru. Jejich počet se snižoval v průběhu zrací doby a poklesly na hodnotu 3,53 log KTJ/g. Koliformní bakterie jsou mezofilní bakterie, přičemž jejich optimální teplota je 37 °C, proto se jejich počet v průběhu zrání snižoval [42]. U šarže D2 byl zaznamenán v průběhu zrání pokles G- nefermentujících tyčinek pravděpodobně z důvodu příliš kyselého prostředí. Minimální pH pro růst *Pseudomonas fragi* je 5,0 až 5,3 [42].

Ze základní chemické analýzy bylo zjištěno, že pH v různých šaržích v závislosti na době zrání značně kolísalo. Nízké hodnoty pH na počátku zrání byly způsobeny fermentací laktózy a produkcí kyseliny mléčné startérovými BMK [36]. U šarže K bylo zaznamenáno, že pH v době zrání narůstalo, stejně jako u šarže D1, protože zde mohlo dojít k tvorbě látek zásadité povahy při proteolýze [36]. U šarže K byl od 28. den zrání zaznamenán mírný pokles pH a poté opětovný nárůst, ale u šarže D1 od 28. den zrání pH v době zrání stále klesalo. U šarže P, pH mírně vzrostlo 56. den zrání a D2 to bylo zaznamenáno 28. den zrání.

Obsah sušiny v průběhu zrání narůstal u všech vyrobených šarží, za použití rozdílných kultur a je to popsáno i ostatními autory [23, 36]. Nárůst mohl být způsobený i polopropustností kryovakové folie, ve které byly sýry zabaleny a mohlo tak docházet k odpařování vody a tím způsobený nárůst sušiny. Nejnížší sušinu vykazovala šarže K, kvůli nejnížšímu obsahu tuku v sušině a i nižšímu obsahu soli na rozdíl od ostatních šarží.

Zvýšená koncentrace NaCl 14. den zrání může být přisouzena tomu, že sůl prostupovala od povrchu ke středu sýra a koncentrovala se v povrchové vrstvě v tzv. solném prstenci. Během solení však začala sůl pronikat hlouběji do tzv. solného pásma. Stejněměrné prosolení sýrů nastává až v průběhu zrání [39, 43]. Zastoupení NaCl nebylo v tomto měření rovnoměrné v celém bloku sýra. Výsledný obsah soli, se tak mohl projevit na obsahu sušiny. Při vyšších hodnotách soli byl zpozorován i vyšší obsah sušiny. V důsledku postupného snižování soli, došlo ke snížení celkové tvrdosti sýra.

Obsah tuku v sušině se v 1. den zrání u šarží P, D1 a D2 držel v přibližně stejných hodnotách okolo 45-48 %. Šarže K byla s obsahem tuku v sušině v porovnání s těmito šaržemi podstatně nižší a dosahovala pouze 35,8 % z důvodu špatné standardizace mléka před pasterací. Snižování obsahu tuku v sušině mohlo být způsobeno rostoucí hodnotou pH [41], nebo také během zpracování sýřeniny, kdy část tuku odchází spolu se syrovátkou [44].

Tvrdość sýra v průběhu zrání poklesla u všech šarží, což mohlo být způsobeno např. rovnoměrným zastoupením obsahu soli, ale také i zvýšenou proteolýzou, která způsobí slábnutí proteinové matrice. Proteolýza v průběhu zrání má významný dopad na texturní vlastnosti sýra. Tukové kuličky, které jsou zadrženy v proteinové matici, mohou také ovlivnit výslednou tvrdość. Se zvyšujícím se obsahem tuku, tvrdość sýrů klesá [39]. Snižující se tvrdość sýrů během zrání je popsána i v literatuře [40, 41]. Vzrůst tvrdości sýra u šarže K ve 14. dnu zrání, mohl být zřejmě zapříčiněn bobtnající proteinovou maticí [36]. Vyšší hodnoty na počátku experimentu byly rovněž ovlivněny zhoršenou standardizací obsahu tuku mléka před pasteurací.

Při stanovení obsahu FAA bylo očekáváno jejich zvyšující se množství, protože jsou konečným produktem proteolýzy [16, 23]. Výsledky obsahu volných aminokyselin se mohou vztahovat i na tukuprostou sušinu [41]. Na Obrázku 18. je znázorněn zvyšující se trend obsahu FAA s dobou zrání. Zvyšující se obsah FAA může být způsoben i u sýrů s nižším obsahem tuku v sušině [41], z důvodu zvýšené proteolýzy díky vyššímu obsahu proteinů. Nejvyšší obsah FAA byl zaznamenán u šarže P, kde byl ale také zaznamenán pokles ve 56. dnu zrání. Mohlo to být zapříčiněno intenzivní produkcí biogenních aminů kmenem *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 946. Obsah FAA se mohl navýšit i změnou pH, které se může zvyšovat v důsledku produkce látek zásadité povahy prostřednictvím proteolýzy a následných produktů [36, 43]. K poklesu FAA ve 84. dnu zrání došlo také u šarže K a D1. Mohlo to být zapříčiněno sníženou aktivitou proteolýzy způsobenou nižší aktivitou BMK a jejich enzymů, při vyšším obsahu tuku v sušině, což je v souladu s literaturou [45]. U šarže D2 byl pozorován po celou dobu zrání nárůst FAA bez poklesu.

V organismu jsou pro nás biogenní aminy důležité, protože jsou v nízkých množstvích organismem zmetabolizovány a ovlivňují procesy jako je např. regulace tělesné teploty a krevního tlaku [11], ale při vyšších dávkách mohou způsobovat zdravotní rizika a působit toxicky [3,4]. Produkce biogenních aminů je způsobena grampozitivními i gramnegativními bakteriemi a kvasinkami. Mezi BMK, které produkují BA, patří např. kmeny z rodů *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Enterococcus*, atd. Mezi obvyklé producenty biogenních aminů, patří také gramnegativní bakterie z čeledi *Enterobacteriaceae* nebo *Pseudomonas* spp. Na vznik BA mají vliv přítomné aminokyseliny a mikroorganismy s dekarboxylázovou aktivitou, které mají vhodné podmínky pro růst a rozmnožování [3, 11, 12]. Snižování obsahu BA lze zajistit při použití vysokého tlaku, použitím kultury, která degraduje biogenní aminy, ozářováním, použitím modifikované atmosféry, nebo přidávkem aditiv. Také ale lze použít enzym

aminooxidázu, který napomáhá degradovat BA nebo použít bakterie, které tento enzym produkují a patří mezi ně např. *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Micrococcus* atd. [25].

Snahou bakalářské práce bylo posoudit možnost snížení obsahu BA v sýrech, za použití rozdílných kultur. Při výrobě sýrů byla použita kultura jak s producentem tak i degradérem biogenních aminů. U šarže K byla použita pouze smetanová kultura (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Lactococcus lactis* subsp. *diacetylus*) a obsah biogenních aminů byl zde nejnižší. Nejvyšší obsah u šarže K byl zjištěn v 84. dnu zrání, kde hodnota dosahovala 31,3 mg/kg sýru, přičemž tyto hodnoty nejsou rizikové pro konzumenta. Nejvyššího obsahu dosahovala šarže P, kde byla použita kultura s producentem biogenních aminů (*Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 946). U šarže P bylo předpokládáno, že obsah BA bude vysoký, protože byl použit dekarboxyláza pozitivní kmen. Šarže dosahovala v 84. dnu zrání 196,2 mg/kg BA, což je téměř dvojnásobek množství, které je spojováno s bezpečností potravin. Dle ten Brink je již 100 mg/kg biogenních aminů považováno jako rizikové [46]. Toto množství překračovala šarže P už 28. den zrání a šarže D1 a D2 56. den zrání. Při použití mikroorganismů (šarže D1 a D2), které degradují biogenní aminy, se obsah výrazně nesnížil, ale obsah byl nižší, než u šarže P. U šarže D1 bylo zaznamenáno, že má nižší obsah biogenních aminů než D2. V 84. dnu zrání byl obsah u D1 nižší cca o 21 mg/kg sýru. Degradér *Citrobacter freundii* KS 32 (šarže D1) tudíž vykazoval vyšší schopnost snížit obsah BA než degradér *Pseudomonas fragi* KS 43 (šarže D2).

Přestože D1 a D2 vykazovaly od 56. dne zrání potenciálně rizikové koncentrace biogenních aminů (nad 100 mg/kg), tak u nich byla po celou dobu skladování stanovena nižší koncentrace BA v porovnání s šarží P. Při dalším testování mikroorganismů a faktorů pro snižování BA v přírodních sýrech, lze v budoucnu navázat na výsledky práce dalším výzkumem, který může mít pozitivní dopad ve snížení BA v přírodních sýrech na takové množství, které nebudou mít negativní vliv pro konzumenta.

ZÁVĚR

Bakalářská práce byla zaměřena na možnosti snížení obsahu biogenních aminů v přírodním sýru holandského typu v průběhu 84. dní zrání. V teoretické části byly popsány jednotlivé procesy průběhu zrání sýrů.

Praktická část bakalářské práce byla zaměřena na výrobu modelových vzorků sýrů za použití různých mikroorganismů, které měly produkovat nebo degradovat biogenní aminy. V průběhu tříměsíčního zrání byly odebírány vzorky pro provedení jednotlivých analýz: mikrobiologický rozbor, základní chemická analýza (obsah sušiny, obsah tuku v sušině, stanovení pH, obsah soli), texturní profilová analýza, stanovení volných aminokyselin a biogenních aminů.

Z provedeného experimentu byly zjištěny výsledky:

- hodnoty pH měly rozdílné trendy pro různé šarže na základě použitých mikroorganismů
- celkový počet mikroorganismů klesal s dobou zrání s výjimkou šarže D2
- mléčné koky vykazovaly na začátku zrání mírný nárůst a následně jejich počet ubýval v době zrání u všech šarží
- množství laktobacilů bylo na počátku zrání nejnižší a v průběhu zrání docházelo k nárůstu u všech šarží
- nežádoucí mikroorganismy (enterobakterie) byly přítomny v nízkých počtech a v průběhu zrání jejich množství klesalo
- obsah soli na počátku zrání narůstal a během zrání se už nijak významně nelišil
- tvrdost sýrů byla na počátku zrání vyrovnaná a v době zrání klesala, přičemž intenzivnější pokles tvrdosti byl pozorován u šarží P, D1 a D2
- soudržnost sýrů byla na počátku zrání téměř vyrovnaná a v době zrání se jejich soudržnost navyšovala
- obsah volných aminokyselin v době zrání narůstal a nejvyšší hodnoty byly zaznamenány u šarže sýru s producentem biogenních aminů (šarže P)
- množství biogenních aminů mělo u všech šarží zvyšující se charakter a kromě šarže K přesahovaly doporučené množství téměř až dvojnásobně

- v šarži P s producentem biogenních aminů se potvrdily vysoké obsahy BA v průběhu skladovacího experimentu, sýry s takto vysokými koncentracemi BA by mohly způsobit zdravotní rizika pro konzumenta
- přestože v šaržích D1 a D2 (s degradéry BA) bylo množství biogenních aminů vysoké, tak v porovnání s modelovými sýry ze šarže P (s producentem BA) byly stanoveny nižší hodnoty BA, v dalších studiích je tedy možné navázat na výsledky této práce v hledání možností snížení obsahu biogenních aminů ve zrajících sýrech

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] VELÍŠEK, J., HAJŠLOVÁ J. *Chemie potravin II*. OSSIS, Tábor 2009, ISBN 978-80-86659-16-9.
- [2] VELÍŠEK, J., CEJPEK, K., DAVÍDEK, D., MÍKOVÁ, K., PÁNEK, J., POKORNÝ, J. *Chemie potravin 3*. 2. vyd. Tábor: OSSIS, 2002. 368 str. ISBN 80-86659-02-3.
- [3] KOMPRDA, T. *Obecná hygiena potravin*. Brno, MZLU, 2004, 145 s. ISBN 978-80-7157-757-7.
- [4] DOSTÁL, J., KAPLAN, P. *Lékařská chemie II*. Brno, MU, 2003, 223 s. ISBN 80-210-2731-2.
- [5] IZQUIERDO-PILIDO, M., et al. Polyamine and biogenic amine evolution during food processing. In BARDÓCZ, S.; WHITE, A. (ed.). *Polyamines in health and nutrition*. United States of America: Springer, 1999. ISBN 0-412-82220-2.
- [6] TŮMA, Š., PLOCKOVÁ, M. Protektivní kultury pro výrobu polotvrdých sýrů. In ŠTĚTINA, J.; ČURDA, L. *Celostátní přehlídka sýrů 2007 : Výsledky přehlídek a sborník přednášek semináře „Mléko a sýry“*. Praha 6: Vysoká škola chemicko technologická v Praze, 2007. s. 31–36.
- [7] HALÁZS, A., BARÁTH Á., SIMON-SARKADI, L., HOLZAPFEL, W.: Biogenic amines and their production by microorganisms in food. *Trends in Food Science & Technology*, 1994, 5 (2), p. 42–49.
- [8] DIČÁKOVÁ, Z.; DUDRIKOVÁ, E. Biogénne amíny ako chemické nebezpečenstvo. In *Rizikové faktory potravinového reťazca*. Nitra: Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre. Fakulta biotechnológie a potravinárstva, 2006. ISBN 80-8069-760-4.
- [9] FERNANDES, Ch. a GLORIA, M. 2015. Bioactive Amines. *Handbook of Food Analysis*, Third Edition - Two Volume Set [online]. CRC Press, Vol II-301 [cit. 2018-02-20]. DOI: 10.1201/b18668-56. ISBN 978-1-4665-5654-6. Dostupné z: <http://www.crcnet-base.com/doi/10.1201/b18668-56>
- [10] OPLETAL, L. a SKŘIVÁNKOVÁ, V. *Přírodní látky a jejich biologická aktivita: Využití látek pro ovlivnění fyziologických procesů hospodářských zvířat*. Karolinum, 2010, 654 s. ISBN 9788024618012.
- [11] KOROVIČOVÁ, J., KOHAJDOVÁ, Z. Biogenic amines in food. *Chemical Papers*, 2005, vol. 59, no. 1, p. 70–79.

- [12] SANTOS SILLA, M. H. Biogenic amines: their importance in foods. *International Journal of Food Microbiology*, 1996, 29, p. 213–231.
- [13] KOHAJDOVÁ, Z., KAROVIČOVÁ, J. – GREIF, G. 2008. Biogénne amíny v potravinách. In *Potravinárstvo* [online]. 2. február 2008, roč. 2, č. 1 [cit. 2018-03-02].s. 30-49 Dostupné: <http://www.potravinarstvo.com/dokumenty/potravinarstvo_no1_2008.pdf>. ISSN 1337-0960.
- [14] BACH, R., CANEPA, C. Theoretical model for pyruvoyl-dependent enzymatic decarboxylation of α -amino acids. *Journal of the American Chemical Society*, 1997, vol. 119, no. 49, p. 11725–11733.
- [15] KARAVIČOVÁ, J., KOHAJDOVÁ Z. Biogenic Amines in Food. *Chemical Papers*. 2003, vol. 59, iss. 1, p. 70-79.
- [16] McSWEENEY, P.L.H. Biochemistry of cheese ripening, *International Journal of Dairy Technology*. Vol. 57, no. 2/3. 127 – 144 s, 2004.
- [17] HAMPL, P. *Obecná chemická technologie, přehled potravinářského kvasného průmyslu*. Praha: SNTL 1962.
- [18] ZIMÁK, E. *Technologie pro 4. ročník SPŠ studijního oboru zpracování mléka*. Praha: SNTL, 1988, 364 s.[19] SELECKÝ, Ján. *Slovenské syry*. Bratislava: Eko konzult, 2013, 328 s. ISBN 978-80-8079-168-1.
- [20] DRDÁK, M., J. STUDNICKÝ, E. MÓROVÁ a J. KAROVIČOVÁ. *Základy potravinářských technologií*. 1. Bratislava: Malé centrum, 1996, 512 s. ISBN 80-967064-1-1.
- [21] GAJDŮŠEK, S. *Mlékařství II.* : Mendlova zemědělská a lesnická univerzita. Brno:[s.n.], 2002. 142 s.
- [22] DOLEŽÁLEK, J.: *Mikrobiologie mlékárenského a tukařského průmyslu*. 1962. SNTL, Praha.
- [23] FOX, P.F., McSWEENEY, P.L.H., COGAN, T.M., GUINEE, T.P.: *Cheese - Chemistry, Physics and Microbiology*, London: Champan & Hall.
- [24] FLASAROVÁ, R., PACHLOVÁ, V., BUŇKOVÁ, L., MENŠÍKOVÁ, A., GEORGOVÁ, N., DRÁB, V. a BUŇKA, F. Biogenic amine production by *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* strains in the model system of Dutch-type cheese. *Food Chemistry*. 2016, 194, 68-75. DOI: 10.1016/j.foodchem.2015.07.069. ISSN 0308814.
- [25] NAILA, A. et al., 2010. Control of Biogenic Amines in Food-Existing and Emerging Approaches. *Journal of Food Science*. 75(7), R139-R150. DOI: 10.1111/j.1750 3841.2010.01774.x. ISSN 00221147.

- [26] EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ). Scientific Opinion on Scientific Opinion on risk based control of biogenic amine formation in fermented foods. UTB ve Zlíně, Fakulta technologická 78 *EFSA Journal* [online] 2011, 9(10) [cit. 2018-03-07]. 2393.[93pp.] doi:10.2903/j.efsa.2011.2393. Dostupné z: <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/2393>
- [27] MOHEDANO, M.L. et al., 2015. Controlling the formation of biogenic amines in fermented foods. *Advances in Fermented Foods and Beverages* [online]. Elsevier, s. 273 [cit. 2018-03-07]. DOI: 10.1016/B978-1-78242-015-6.00012-8. ISBN 9781782420156. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9781782420156000128>
- [28] Nařízení komise (ES) 2073/2005 o mikrobiologických kritériích pro potraviny.
- [29] Vyhláška č. 305/2004 Sb. (platné znění) ze dne 6. května, kterou se stanoví druhy kontaminujících a toxikologicky významných látek a jejich přípustné množství v potravinách.
- [30] DOEUN, D., DAVAATSEREN, M., CHUNG, Myung-Sub. Biogenic amines in foods. *Food science and biotechnology*, 2017, 26(6), s. 1463-1474.
- [31] ALVAREZ, M. A. a Ma Victoria MORENO-ARRIBAS. The problem of biogenic amines in fermented foods and the use of potential biogenic amine-degrading microorganisms as a solution. *Trends in Food Science*. 2014, 39(2), 146-155. DOI: 10.1016/j.tifs.2014.07.007. ISSN 09242244.
- [32] ERIM, F. BEDIA, Recent analytical approaches to the analysis of biogenic amines in food samples. *Trac-trends in analytical chemistry*, 2013, 52(SI), s. 239-247.
- [33] FERNANDEZ-NO, I. C., BOEHME, K., GALLARDO, J. Differential characterization of biogenic amine-producing bacteria involved in food poisoning using MALDI-TOF mass fingerprinting. *Electrophoresis*, 2010, 31(6), s. 1116-1127.
- [34] ÖNAL, A. A review: Current analytical methods for the determination of biogenic amines in foods. *Food Chemistry*, 103, 1475-1486. 2007.
- [35] KALACĚ, P., KRĚŽEK, M. A Review of Biogenic Amines and Polyamines in Beer. *Journal of The Institute of Brewing*, 2009, vol. 109, iss. 2, s. 123-128.
- [36] FOX, P. F., McSWEENEY, P. L. H., GUINEE, T. P., COGAN, T. M. *Fundamentals of cheese science*. Gaithersburg: 2000. 638 s. ISBN 0-83-42-1260-9.
- [37] JANŠTOVÁ, B., VORLOVÁ, L., NAVRÁTILOVÁ, P., KRÁLOVÁ, M., NECIDOVÁ, L., MAŘICOVÁ, E. *Technologie mléka a mléčných výrobků*. 1. vydání. VFU Brno, 2012. 141 s. ISBN 978-807305637-7.

- [38] CHEN, A. H., J. W. LARKIN, C. J. CLARK a W. E. IRWIN. Textural analysis of cheese. *Journal of dairy science* [online]. 1979, 6, 901-907 [cit. 2017-04-17]. DOI: [http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(79\)83346-9](http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(79)83346-9).
- [39] ŠUSTOVÁ K. Solení sýrů. *Farmářská výroba sýrů a kysaných mléčných výrobků IX*. MENDELU, 2012, ISBN 978-80-7375-613-0.
- [40] McMAHON, D. J. Issues with Lower Fat and Lower Salt Cheeses. *Australian Journal of Dairy Technology*, 2010, vol. 65, no. 3 s. 200-205. ISSN:0004-9433.
- [41] FENELON, M. A., GUINEE, T. P. Primary proteolysis and textural changes during ripening in Cheddar cheese manufactured to different fat content. *International Dairy Journal*, 2000, 10(3), s. 151 – 158.
- [42] ŽIŽKA, B., KORBELOVÁ, M.: *Mikrobiologie I. pro SPŠ potravinářské*, Tiskářské závody, s.p., Příbram, Praha, 1992.
- [43] PACHLOVÁ, V., BUŇKA, F., BUŇKOVÁ, L., WEISEROVÁ, E., BUDINSKÝ, P., ŽALUDEK, M., KRÁČMAR, S. The effect of three different ripening/storage conditions on the distribution of selected parameters in individual parts of Dutch-type cheese. *International Journal of Food Science and Technology*, 2011, 46, s. 101 – 108.
- [44] ONG, L., DEGASTINE, R., AUTY, M. E., KENTISH, S., GRAS, S. Coagulation temperature affects the microstructure and composition of full fat Cheddar cheese. *Dairy Science and Technology*, 2011, 91, s. 739 – 758.
- [45] EXTERKATE, F. A., ALTING, A. C. The role of starter peptidases in the initial proteolytic events leading to amino acids in Gouda cheese. *International Dairy Journal* [online]. 1995, vol. 5, issue 1, s. 15-28 [cit. 2018-05-08]. DOI: 10.1016/0958-6946(94)p1596-6.
- [46] ten Brink, B., Damink, C., Joosten, H. M. L. J., & Huis in't Veld, J. H. J. (1990). Occurrence and formation of biologically active amines in foods. *International Journal of Food Microbiology*, 11, 73–84.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

BA	Biogenní aminy
NSLAB	Nonstarterové kultury bakterií mléčného kvašení
MO	Mikroorganismus
FFA	Free fatty acid (volné mastné kyseliny)
FAA	Free amino acid (volné aminokyseliny)
MAO	Monoaminoxidáza
DAO	Diaminoxidáza
BMK	Bakterie mléčného kvašení
KTJ	Kolonie tvořících jednotek
K	Kontrolní šarže
P	Šarže s producentem BA
D1	Šarže s 1. degradérem BA
D2	Šarže s 2. degradérem BA

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1. Metabolismus laktózy v průběhu zrání sýrů: 1 - racemizace, 2 - metabolismus způsobený <i>Propionibacterium</i> spp., 3 - oxidace, 4 - anaerobní metabolismus pomocí NSLAB, - anaerobní metabolismus pomocí <i>Clostridium</i> spp. [23]	13
Obr. 2. Transaminace rozvětvených aminokyselin na odpovídající α ketokyseliny.....	15
Obr. 3. Schéma proteolýzyv sýru.....	16
Obr. 4. Katabolismus volných mastných kyselin [23].....	18
Obr. 5. Hlavní reakce biogenních aminů [2].....	21
Obr. 6. Obecná reakce vzniku biogenních aminů [15].....	27
Obr. 7. Dekarboxylace L-aminokyselin přes pyruvoylový zbytek. [14].....	27
Obr. 8. Dekarboxylace L-aminokyselin přes pyridoxalfostát [13].....	28
Obr. 9. Schéma výroby s použitím daných mikroorganismů.....	34
Obr. 10. Graf pro stanovení mikroorganismů v kontrolní šarži (K).....	43
Obr. 11. Graf pro stanovení MO v šarži s producentem biogenních aminů (P).....	44
Obr. 12. Graf pro stanovení MO v šarži s kulturou degradující biogenní aminy (D1).....	45
Obr. 13. Graf pro stanovení MO v šarži degradující biogenní aminy (D2).....	46
Obr. 14. Graf závislosti průběhu změn pH na době zrání.....	47
Obr. 15. Graf závislosti změny obsahu sušiny na době zrání sýra.....	48
Obr. 16. Graf závislosti obsahu soli na době zrání.....	49
Obr. 17. Graf závislosti změny obsahu tuku v sušině na době zrání sýra.....	50
Obr. 18. Graf závislosti změny obsahu volných aminokyselin na době zrání.....	51
Obr. 19. Graf závislosti změny obsahu biogenních aminů na době zrání.....	52
Obr. 20. Graf zobrazující tvrdost sýra na době zrání.....	53
Obr. 21. Graf soudržnosti sýra na době zrání.....	54

SEZNAM TABULEK

Tab. 1. Nejběžnější biogenní aminy v potravinách [9].....	21
Tab. 2. Mikroorganismy produkující BA v přírodním sýru [2].....	25

SEZNAM PŘÍLOH

Příloha I: Obecné schéma výroby sýrů s nízkodohřívanou sýřeninou

PŘÍLOHA I. OBECNÉ SCHÉMA VÝROBY SÝRŮ S NÍZKODOHŘÍVANOU SÝŘENINOU

