

Výskyt biogenních aminů v plísňových sýrech

Vendula Bartošáková

Bakalářská práce
2013



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav technologie potravin

akademický rok: 2012/2013

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Vendula BARTOŠÁKOVÁ**
Osobní číslo: **T10045**
Studijní program: **B2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Chemie a technologie potravin**
Forma studia: **prezenční**

Téma práce: **Výskyt biogenních aminů v plísňových sýrech**

Zásady pro vypracování:

I. Teoretická část

1. Výroba a rozdělení plísňových sýrů.
2. Vlastnosti biogenních aminů.
3. Výskyt biogenních aminů v mléčných výrobcích.

II. Praktická část

1. Mikrobiologická analýza plísňových sýrů.
2. Detekce biogenních aminů v plísňových sýrech.
3. Diskuse získaných výsledků a formulace závěrů práce.

Rozsah bakalářské práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

- [1] FOX, P.F., McSWEENEY, P.L.H., COGAN T.M., GUINEE, T.P. Cheese - Chemistry, Physics and Microbiology (3rd Edition). Elsevier, 2004. ISBN 978-0-12-263651-6..
- [2] HUTKINS, R.W. Microbiology and Technology of Fermented Foods. USA: Wiley - IFT Press, 2006. ISBN 978-0-8138-0018-9.
- [3] JAY, J.M., LOESSNER, M.J., GOLDEN, D.A. Modern Food Microbiology (7th Edition) Springer, 2005. ISBN 0-387-23180-3.
- [4] LINARES, D.M., MARTÍN, M.C., LADERO, V., ALVAREZ, M.A., FERNÁNDEZ, M. Biogenic amines in dairy products. Critical Reviews in Food Science and Nutrition 51, 691-703. 2011.
- [5] SPANO, G., RUSSO, P., LONVAUD-FUNEL, A. et al. Biogenic amines in fermented foods. European Journal of Clinical Nutrition 64, S95-S100. 2010.

Vedoucí bakalářské práce:

doc. RNDr. Leona Buňková, Ph.D.

Ústav inženýrství ochrany životního prostředí

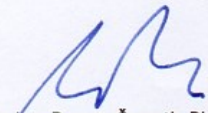
Datum zadání bakalářské práce:

16. ledna 2013

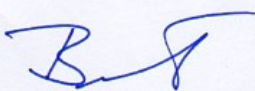
Termín odevzdání bakalářské práce:

2. května 2013

Ve Zlíně dne 4. února 2013


doc. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan




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

Přijmení a jméno: BARTOŠÁKOVÁ VENDULA

Obor: CP3

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

Bartošáková

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ABSTRAKT

Cílem této bakalářské práce bylo stanovit obsah biogenních aminů v plísňových sýrech. Teoretická část je věnována popisu plísňových sýrů a charakteristice biogenních aminů. Experimentální část se zabývá mikrobiologickým rozbohem a dále stanovením obsahu biogenních aminů v jednotlivých vzorcích plísňových sýrů. Ke stanovení obsahu biogenních aminů v testovaných sýrech byla použita vysokoúčinná kapalinová chromatografie. U všech 15 testovaných sýrů byla zjištěna přítomnost biogenních aminů. Biogenní aminy tryptamin, fenyletylamin a histamin nebyly detekovány v žádném z vzorků. Tyramin a spermin byly stanoveny ve všech vzorcích. Maximální hodnota celkového obsahu biogenních aminů byla detekována u sýrů s plísní na povrchu, kde koncentrace dosahovala hodnoty 548 mg/kg.

Klíčová slova: Plísňový sýr, biogenní aminy, vysokoúčinná kapalinová chromatografie

ABSTRACT

The goal of this bachelor thesis is determine the content of biogenic amines in blue cheeses. The theoretical part deals with the characterization of blue cheeses and biogenic amines. The experimental part deals with the microbiological analysis and determination of biogenic amines in tested samples of blue cheese. Biogenic amines in the cheeses were determined using HPLC. Biogenic amines were detected in all 15 tested samples of blue cheese. Tryptamine, phenylethylamine and histamine were not detected. Tyramine and spermine were determined in all tested samples. The maximum value of total biogenic amines was detected in cheese with mold on the surface, where the concentration of biogenic amines was 548 mg/kg.

Keywords: Blue cheese, biogenic amines, high performance liquid chromatography

Tímto děkuji své vedoucí bakalářské práce doc. RNDr. Leoně Buňkové Ph.D. za cenné rady, připomínky, metodické vedení praktické i teoretické části a čas který mi věnovala.

Dále bych chtěla poděkovat laborantkám Ing. Ludmile Zálešákové, Lence Machákové a Bc. Veronice Kučabové za užitečné rady při konání mé praktické části.

OBSAH

ÚVOD	2
I TEORETICKÁ ČÁST	3
1 HISTORIE SÝRAŘSTVÍ	4
1.1 DEFINICE SÝRU	5
1.1.1 Obsah tuku v sýru	6
1.1.2 Obsah bílkovin v sýru.....	6
1.1.3 Obsah minerálních látek a vitaminů.....	6
2 CHARAKTERISTIKA PLÍŠŇOVÝCH SÝRŮ	7
2.1 MĚKKÉ SÝRY S BÍLOU PLÍŠNÍ NA POVRCHU	7
2.2 SÝRY S MODROU PLÍŠNÍ.....	8
2.3 DVOUPLÍŠŇOVÉ SÝRY	9
3 TECHNOLOGIE VÝROBY PLÍŠŇOVÝCH SÝRŮ	10
3.1 POŽADAVKY NA MLÉKO	10
3.2 TEPELNÉ OŠETŘENÍ MLÉKA	11
3.3 ÚPRAVA MLÉKA PŘED SÝŘENÍM.....	11
3.4 SÝŘENÍ MLÉKA.....	11
3.5 ZPRACOVÁNÍ SÝŘENINY, FORMOVÁNÍ.....	12
3.6 SOLENÍ SÝRŮ.....	13
3.7 ZRÁNÍ SÝRŮ	14
3.7.1 Sýry s plísní na povrchu	15
3.7.2 Sýry s plísní v těstě.....	16
4 ČISTÉ MLÉKAŘSKÉ KULTURY VYUŽÍVANÉ PŘI VÝROBĚ PLÍŠŇOVÝCH SÝRŮ	17
4.1 ROKFÓRSKÁ KULTURA.....	17
4.2 CAMEMBERTSKÁ KULTURA.....	18
5 BIOGENNÍ AMINY	21
5.1 VZNIK BIOGENNÍCH AMINŮ	21
5.2 STRUKTURA A VÝSKYT	21
5.3 BIOLOGICKÉ ÚČINKY	23
II PRAKTICKÁ ČÁST	24
6 CÍL PRÁCE	25
7 MATERIÁL, POMŮCKY A METODY	26
7.1 CHARAKTERISTIKA VZORKŮ	26
7.2 MIKROBIOLOGICKÁ ANALÝZA TESTOVANÝCH SÝRŮ	27
7.2.1 Použité zařízení a pomůcky	27

7.2.2	Testované mikroorganismy	27
7.2.3	Složení živných médií.....	28
7.2.4	Příprava vzorků sýrů a metodika jednotlivých stanovení	30
7.2.5	Odečítání výsledků	31
7.3	STANOVENÍ BIOGENNÍCH AMINŮ	32
7.3.1	Přístroje a pomůcky	32
7.3.2	Chemikálie	32
7.3.3	Příprava vzorků sýrů pro stanovení biogenních aminů.....	33
7.3.4	Chromatografické stanovení biogenních aminů	34
8	VÝSLEDKY A DISKUZE	35
8.1	STANOVENÍ POČTU MIKROORGANISMŮ	35
8.1.1	Počty mikroorganismů ve vzorcích sýrů s plísní na povrchu.....	35
8.1.2	Počty mikroorganismů ve vzorcích sýrů s plísní uvnitř hmoty	36
8.2	VÝSLEDKY ANALÝZY BIOGENNÍCH AMINŮ	37
8.2.1	Obsah biogenních aminů ve vzorcích sýrů s plísní na povrchu	37
8.2.2	Obsah biogenních aminů ve vzorcích skupiny B.....	38
8.3	SOUHRNNÁ DISKUZE	39
	ZÁVĚR	42
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	43
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....	50
	SEZNAM OBRÁZKŮ.....	51
	SEZNAM TABULEK	52
	SEZNAM PŘÍLOH	53

ÚVOD

Nejnovější trendy v oblasti bezpečnosti potravin podmiňují zkoumání látek vyskytujících se v potravinách, které mohou ovlivnit zdraví člověka. Mezi tyto látky řadíme i biogenní aminy (BA), které se v malém množství vyskytují v organismu člověka a ovlivňují některé metabolické procesy. Přestože jsou látkami nepostradatelnými, ve vysokých koncentracích mají vasoaktivní a psychoaktivní účinky [1].

Biogenní aminy jsou nízkomolekulární bazické dusíkaté látky, které vykazují biologické účinky. Obvykle vznikají dekarboxylací volné aminokyseliny potraviny účinkem mikrobiálního enzymu. Účinnými producenty jsou např. mléčné bakterie [1,2].

Při hodnocení obsahu biogenních aminů je nutné dbát na to, jestli se jedná o výrobky fermentované nebo nefermentované, jelikož u fermentovaných výrobků jsou biogenní aminy přirozenou součástí. Stanovení biogenních aminů se provádí chromatograficky (TLC, HPLC, GC). Jejich analýza je důležitá z hlediska jejich toxicity a také možnosti jejich využití jako indikátoru čerstvosti nebo kažení potravin [2].

Teoretická část se zabývá surovinami pro výrobu sýrů a samotnou výrobou jednotlivých druhů plísňových sýrů. Dále jsou popsány vlastnosti a charakteristika biogenních aminů, jejich výskyt v sýrech a působení na lidský organismus.

V praktické části byla provedena detekce biogenních aminů v 15 vzorcích plísňových sýrů, získaných z běžné obchodní sítě.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 HISTORIE SÝRAŘSTVÍ

První sýry s největší pravděpodobností objevily náhodou kočovné kmeny jižní Asie a Středního východu. Když někteří bojovníci nalili čerstvé mléko do kožených vaků, aby mohli v průběhu boje a dlouhých jízd utišit žízeň zjistili, že tekuté mléko se změnilo v bledou, lehce nakyslou tekutinu, v níž plavaly husté chuchvalce bílé sýřeniny. Kožené vaky se vyráběly ze žaludků mladých zvířat, které pravděpodobně obsahovaly srážecí enzymy. Zbytek učinilo slunce (vyšší teplota) a pohyby klusajícího koně [3].

Dá se nalézt mnoho stop, které se týkají historie výroby sýrů. Podle archeologů se nejstarší nálezy datují do doby asi 6000 let př. n. l. Sumerové uchovávali sýr již zhruba 4000 let př. n. l. V mytologických příbězích starých Řeků lze taktéž nalézt zmínky o sýru. Rovněž v Bibli se o tomto produktu píše, a to jako o vítaném zdroji potravy a o daru. Malby na stěnách různých staveb dokazují znalosti výroby sýra již ve starém Egyptě [3].

Výrobu sýra přivedli k dokonalosti Římané. Ve svých obrovských domech mohli ovlivňovat jednotlivá stádia zrání sýrů. K důležitým faktorům, které daly vzniknout velké rozmanitosti druhů a chutí se řadí vlhkost, teplo a průvan stejně jako kouř z kamen, omývání sýrů a přidávání bylinek [3].

Mnoho současných sýrů se začalo profilovat ve středověku. Francouzi znali již dlouhou dobu sýr jako je roquefort, který vznikl v roce 1070 [3].

V době renesance prohlašovali vysoce urození pánové evropských královských dvorů, že požívání sýra je nezdravé a barbarské. Naštěstí se jiní, včetně mnichů, kteří kvalitu sýra neustále vylepšovali a vytvářeli nové druhy, tímto názorem neřídili. Ve Francii se již od roku 1791 proslavil sýr camembert. V období 19. století objevili vědci, mezi nimi i Louis Pasteur, vliv mikroorganismů na kvasné procesy, mimo jiné i u sýrů. Kolébkou výroby sýrů jsou francouzské kláštery. V roce 962 vznikl Maroilles, což byl první sýr vyrobený mnichy žijícími na severu Francie. Řád trapistů vyráběl sýry, aby si zpestřil svůj jídelníček v době půstu. Francouzské sýry, nejsou pouze staletá tradice, ale je to především vysoká kvalita kontrolovaná odbornými státními institucemi. Sýry nejvyšší kvality jsou označeny symbolem AOC (Appellation d'Origine Contrôlée). Jedná se o soubor právních předpisů, který je vydán francouzskou vládou a stanovuje podmínky produkce sýrů. Předpisy AOC přesně určují [3]:

- terén, na kterém lze pást dobytek,
- původ a druh krmiva pro zvířata,
- plemeno dobytka,
- dobu výroby sýru,
- metodu výroby sýru,
- tvar a velikost sýru,
- způsob skladování sýru,

Ve Francii je více než 30 druhů sýru označených symbolem AOC [4]. Dnes existují velké i malé podniky: mlékárny, které vyrábějí sýr výhradně z pasterizovaného mléka, při jehož zrání používají různé technické postupy. Dnes se také objevuje stále více selských (farmářských) sýráren, kde se sýr vyrábí v malých objemech, tvaruje se ručně a ve fázi zrání je mu věnována individuální pozornost [5].

1.1 Definice sýru

Sýry se z pohledu svého složení řadí k nejkvalitnějším potravinám. Podle standardu FAO/WHO z roku 1963 jsou sýry definovány následovně: Sýr je mléčný výrobek vyrobený srážením mléčné bílkoviny z mléka působením syřidla nebo jiných koagulačních činidel, prokysáním a oddělením podílu syrovátky. Principem je oddělení určitého podílu syrovátky ze sraženiny mléka stanovené tučnosti [6, 7]. Zrajícím sýrem je sýr, u kterého následně po prokysání došlo k dalším biochemickým a fyzikálním procesům [6].

Z nutričního hlediska jsou sýry plnohodnotnými výrobky, které obsahují všechny esenciální aminokyseliny. Zdrojem využitelné energie jsou bílkoviny a mléčný tuk. Mléko obsahuje laktosu, která je při výrobě sýrů převedena na kyselinu mléčnou a další produkty kvašení. V sýrech má velký význam obsah vápníku, jehož množství se liší podle typu. Čím je menší vliv kyselého srážení při zpracování sýřeniny a větší vliv syřidlového neboli enzymatického srážení, tím vyšší je obsah vápníku v daném výrobku, tedy při nižším pH se obsah využitelného vápníku snižuje. S obsahem vápníku v sýrech souvisí i obsah fosforu. Využitelnost fosforu je závislá na obsahu vápníku v krvi. Je-li jeden z těchto prvků podán ve zvýšeném množství, vede to obvykle ke zvýšení vstřebatelnosti druhého. V tučných sýrech jsou přítomny vitaminy A a D, u všech druhů jsou obsaženy vitaminy skupiny B [6].

1.1.1 Obsah tuku v sýru

Vyhláška uvádí, že obsah tuku nemá být uváděn v absolutních hodnotách, ale jako obsah tuku v sušině [5,7]. Podíl tuku v sýru nelze přesně vztáhnout k hmotnosti sýru, ale pouze k jeho sušině. Do prodeje může být předán pouze sýr s obsahem tuku, který odpovídá zařazení do dané kategorie. Jedná se o následující stupně [5]:

Stupeň tučnosti	Tuk v sušině
Vysokotučný	Minimálně 60%, nejvýše 85%
Smetanový	Minimálně 50%
Plnotučný	Minimálně 45%
Tučný	Minimálně 40%
Tříčtvrteční	Minimálně 30%
Čtvrteční	Minimálně 10%
Netučný	Minimálně 10%

1.1.2 Obsah bílkovin v sýru

Mléko se skládá ze dvou důležitých bílkovinných složek. Obsahuje 80 % kaseinu a 20 % sérových (syrovátkových) proteinů. Při lisování sýru odcházejí sérové proteiny spolu s podílem syrovátky. Bílkoviny v sýru obsahují esenciální aminokyseliny nezbytné pro lidskou výživu, zvláště lysin, který chybí v rostlinných bílkovinách [6, 8].

1.1.3 Obsah minerálních látek a vitaminů

Nejdůležitější minerální látkou v sýru je vápník a hned po něm následuje hořčík. Vápník podporuje stavbu a udržování dobrého stavu kostí a zubů. Dále se podílí na celé řadě procesů látkové výměny. Hořčík se také podílí na mnoha procesech látkové výměny. Aktivuje více než 300 enzymatických reakcí. Hořčík je důležitý pro energetické reakce, např. svalové kontrakce. Dále reguluje stabilitu a vzrušivost buněčných membrán. Je fyziologickým protějškem vápníku. Kromě toho sýr obsahuje vitamin A, případně jeho předchůzí stupeň betakaroten. V sýrech jsou také obsaženy vitaminy skupiny B, především B₂, B₁₂ a kyselina pantotenová. Ty v lidském organismu regulují a řídí různé procesy látkové výměny, především pro získání energie, krve tvorbu a výstavbu látek vlastních tělu [5].

2 CHARAKTERISTIKA PLÍŠŇOVÝCH SÝRŮ

Plíšňové sýry je možné dělit podle jejich charakteristické plísně, kdy záleží na typu a růstu plísně. Patří sem sýry zrající (plíšňové) s tvorbou charakteristické plísně na povrchu a sýry s tvorbou charakteristické plísně uvnitř hmoty. Typickým znakem těchto sýrů je měkká konzistence [6, 9].

2.1 Měkké sýry s bílou plísní na povrchu

Tyto francouzské sýry jsou typické svou měkkou dužinou a také povrchem, který je pokryt bílou plísní *Penicillium camemberti*. Dvou až šestitýdenní zrání ve speciálních prostorách, kde je vysoká vlhkost umožňuje rozvinutí ušlechtilé bílé plísně rodu *Penicillium*. Sýry tím nabývají výrazné chuti a výjimečné krémové pružné konzistence [6, 10].

K neznámějším sýrům tohoto druhu patří [4]:

- *Camembert de Normandie* - je jeden z neznámějších sýrů na světě, který pochází z Pays d'Auge v Normandii. Má kruhový tvar o průměru 10,5-11,5 cm a výšce 3 cm. Váží asi 250 g a balí se do tenkých dřevěných krabiček. Nejlepší sýry se dosud vyrábějí ručně z nepasterizovaného mléka na farmách v původní oblasti Normandie. Tento sýr získal pečeť AOC ještě před rokem 1983 a tak se stal nejčastěji napodobovaným sýrem na světě. Originál poznáme podle přídomku „de Normandie“. Označuje sýr AOC, který může být vyroben pouze v Normandii podle přesně definované tradiční metody. Tento sýr má velmi jemnou kůrku pokrytou bílou ušlechtilou plísní, která může vykazovat načervenalé stopy. Sýrové těsto, které má světle slámovou barvu, by mělo být stejnoměrně vyzrálé a uprostřed by se nemělo drobit. Dobrý sýr má čisté bylinkové aroma s příjemnou žampionovou vůní. Chuť je smetanová s příchutí svěží trávy. Camembert nemá být příliš výrazný, aby byl cítit čpavek [5, 11].
- *Brie* - původní sýr Brie pochází z kraje Seine-et-Marne v Île de France. Podobá se plochému dortu o průmětu 25-40 cm. Ve Francii dnes nesou pečeť AOC dva sýry Brie de Meaux a Brie de Melun.
 - *Brie de Meaux* - se vyrábí ve tvaru plochých disků o hmotnosti 908 g až 3,2 kg. Má bílou, narůžověle béžově kropenatou kůru. Těsto má lesklou slámovou barvu, která tmavne až do barvy teplé slonové kosti. Sýr by měl mít přírodní aroma a vonět po pražených oříšcích s nepatrnou stopou čpavku.

- *Brie de Melun* - má o něco menší průměr (asi 24 cm). Tento sýr je vyráběn z čerstvého mléka. Má vyzrálejší, robustnější a slanější aroma [5, 11].
- *Coulommiers* - patří k sýrům typu brie, přestože je o třetinu menší než jejich největší zástupce. Pro tento sýr neexistuje standardní receptura, a tak nikdy nezískal známku ochrany původu. Má na povrchu bílý plísňový nárůst a povrch je často nerovnoměrný. Při jeho zrání se na něm mohou tvořit hnědé skvrny. Mladý sýr má lehce žampionové aroma a jemnou, lahodnou chuť, kdežto zralý je výraznější [5, 11].
- *Hermelin* - český sýr, který je obdobou francouzského sýru Camembert. Má kulovitý tvar a jemnou ušlechtilou plíseň na povrchu [12].

2.2 Sýry s modrou plísní

Název tohoto typu sýru je odvozen od jemných zelenomodrých žilek plísně, které prorůstají bílý krémový sýr. Pro tuto skupinu je charakteristická modrá plíseň *Penicillium roqueforti*, která je do mléka dodávána tekutá nebo jako prášek. K rozvoji plísně je důležitý vzduch, proto se sýr provzdušňuje propíchnutím jehlami. Během zrání vyrůstá modrá plíseň podél otvoru po jehlách. Tyto sýry jsou vyráběny z kravského mléka, pouze Roquefort se vyrábí z ovčího mléka. Tento druh plísňových sýrů má výraznou, pikantní chuť [10, 13].

Nejznámějšími sýry jsou [4]:

- *Roquefort* – je polotvrdý sýr s vnitřní plísní. Vyrábí se z nepasterizovaného ovčího mléka. Roquefort je sýr válcového tvaru o průměru 19-20 cm a výšce 8,5-10,5 cm. Jeho hmotnost se pohybuje mezi 2,5-2,9 kg. Tento sýr nemá téměř žádnou kůru a jeho měkké, krémově zbarvené těsto je prostoupeno šedozelenými žilkami plísně. Před vysycháním je chráněn hliníkovou fólií. Aroma je mléčně oříškové a ovocně rozinkové. Očkování plísně *Penicillium roqueforti* probíhá buď zároveň s přidáváním syřidla, nebo v momentu, kdy se tvarují sýrové bochníky. V průběhu odkapávání syrovátky se sýr pětkrát denně obrací. Po osolení se bochníky posílají do Roquefortu, kde uvnitř hory Combalou zrají nejméně tři měsíce. Vzduch dovnitř proniká dlouhými trhlinami ve skále, kterým se říká „fleurines“. Vlhký jeskynní vzduch podporuje růst plísně [5, 11].
- *Bleu d’Auvergne* - je francouzský sýr, který vznikl jako napodobenina sýru Roquefort, vyrobeného z kravského místo ovčího mléka. Tento sýr má tvar středně velkého válce. Jeho kůra je velmi tenká, proto je obvykle balen do fólie. Těsto je místy prostoupené

otvory a výraznými zelenomodrými žilkami plísně, je velmi hutné a smetanové a má světle žlutou barvu. Chut' je plná a výrazná, slanost vzrůstá s větší četností žilek.

- *Bleu des Causses* - je velmi podobný sýru Bleu d'Auvergne, ale jeho konzistence je krémovější a jeho chut' složitější se vyznačuje pikantními a kořeněnými tóny
- *Bleu du Haut-Jura* - též pod názvem Bleu de Gex Haut Jura. K výrobě se používá výhradně mléko montbéliardských krav, které se pasou na loukách pohoří Jura. Sýr z čerstvého mléka má výraznější kůrku než ostatní sýry tohoto typu [5, 11].
- *Niva* - vyrábí se ve tvaru válce o hmotnosti přibližně 2 kg. Povrch je celistvý se zřetelnými vpichy. Na řezu je mramorovitý prorost ušlechtilé světle až tmavě zelené plísně. Slabá světle hnědá barva na povrchu je znakem vyzrálosti sýrů. Chut' je slaná, výrazně pikantní. Konzistence je poloměkká může však být i drobivá, nebo roztíratelná, záleží na stupni zralosti [14].
- *Gorgonzola* - se vyrábí v Lombardii a Piemontu ve tvaru válců, které se liší velikostí od 6 do 13 kg. Na výšku měří 16-20 cm, průměr je 25-30 cm. Na povrchu má tlustou, drsnou, bíločervenou krustu, která se může místy drolit. Sýrové těsto je bílé až nažloutlé s četným zelenomodrým žilkováním. Konzistence je krémová a vláčná. Gorgonzola se vyrábí pouze z kravského mléka. Její chut' je pikantní a kořeněná, s příděchem lesní zatuchlosti a hub. Aroma je mnohem výraznější než chut' [5,11].

2.3 Dvouplísňové sýry

- *Cambozola* - je sýr, který je vyráběn v Německu. Jedná se o dvouplísňový zrající sýr s modrou plísní. Má modré žilkování vyskytující se na vnitřní straně a přírodní šedou plíseň na vnější straně. Tento sýr zraje zvláště dlouho při nízké teplotě ve speciálních studených sklepech a výsledkem je smetanová jemná vůně. Sýr vyniká svou ořechovou příchutí [15].
- *Vltavín* - je jedinečný dvouplísňový sýr. Je kombinací dvou chutí klasického camembertu a modré plísně roquefortového typu [16].

3 TECHNOLOGIE VÝROBY PLÍŠŇOVÝCH SÝRŮ

Hlavním výrobním směrem při výrobě plísňových sýrů je sladké srážení. Výroba je založena na sýřenině získané z mléka působením syřidla. Hlavní části výrobního postupu jsou: úprava mléka před sýřením, sýření, zpracování sýřeniny, formování sýřeniny (odkapávání a případné lisování), solení a zrání sýrů. Všechny uvedené operace nejsou prováděny u všech druhů sýrů a také nikoli stejným způsobem. Jejich použití je dáno výrobními podmínkami a vlastnostmi jednotlivých kategorií a druhů sýrů [17, 18, 19, 20].

3.1 Požadavky na mléko

Mléko je základní surovina pro výrobu sýrů. Je to polydisperzní systém, jehož hlavními složkami (přepočtenými na 100 g mléka) jsou voda 87,56 g, bílkoviny (kaseiny a syrovátkové bílkoviny) 3,32 g, tuk 3,69 g, laktosa 4,75 g, minerální látky (rozpuštěné a nerozpuštěné) 0,69 g, dále vitaminy a jiné látky. Mezi činitele, kteří způsobují rozdíly v sušině a kolísání obsahu jednotlivých složek mléka patří [21]:

- plemeno dojnic,
- laktační stádium,
- stáří dojnice,
- zdravotní stav dojnice,
- krmení,
- vliv dojení,
- péče a ošetřování dojnice,
- roční období,

Pro charakteristiku technologických vhodností mléka určeného k výrobě sýrů byly již dříve vytvořeny různé definice, které se stále upřesňují. Technologická vhodnost mléka je dána chemickým složením, mikrobiologickými a fyzikálními vlastnostmi mléka. Jiné definice uvádějí, že vhodnost mléka k dalšímu zpracování závisí na celkovém počtu mikroorganismů, obsahu sporotvorných anaerobních mikroorganismů, koliformních bakterií, na obsahu vápníku, na syřitelnosti a kvasnosti mléka, i na chuti a vůni mléka. Dalším důležitým požadavkem na mléko je, aby neobsahovalo inhibiční látky, které mají negativní účinek na prokysávací schopnost mléka bakteriemi mléčného kvašení [17, 22, 23, 24].

3.2 Tepelné ošetření mléka

Při pasteraci mléka se u měkkých sýrů nejčastěji používá teplot 74-78 °C, lze však použít i teplotu 85 °C po dobu 1-2 s. Se zvyšující se pasterační teplotou dochází ke zvýšené denaturaci sérových bílkovin, které neodchází do syrovátky. Tím se zvyšuje výtěžnost, ale i vazba vody. Může dojít i ke snižování sušiny sýru a ke zhoršení jejich jakosti (albumin a globulin zadržují větší podíl vody, která se dalšími technologickými zásahy bez újmy na jakosti sýra nedá odstranit). Při tepelném zpracování se mléko chová jako komplexní systém, kde probíhá řada chemických, fyzikálních a biochemických reakcí. Některé z nich jsou velmi důležité, protože mění vlastnosti mléka nebo i jeho výživnou hodnotu [6, 23, 25]

3.3 Úprava mléka před sýřením

Každý druh sýra má stanovený obsah sušiny, tuku, resp. tuku v sušině. Kvůli tomu je nutné standardizovat obsah tuku v mléce v závislosti na obsahu kaseinu, aby bylo dosaženo požadovaného tuku v sušině. Homogenizace tuku snižuje jeho ztráty do syrovátky, zvyšuje výtěžnost a zároveň kvalitu sýru. Mléko je pro výrobu sýru pasterováno většinou šetrně, nicméně dochází ke změnám v poměru koloidní a rozpustné formy vápníku a zhoršení syřitelnosti mléka. Z tohoto důvodu se pro obnovení syřitelnosti do mléka přidává rozpustný vápník, nejčastěji ve formě chloridu vápenatého. Obvyklý přídavek je 20 g chloridu vápenatého na 100 l mléka. Pokud je tato dávka překročena, může docházet k hořknutí sýra. Přídavek čistých kultur do mléka před sýřením je nezbytnou podmínkou zdárného průběhu celého technologického procesu. Snižováním kyselosti mléka před sýřením dojde k ovlivnění rychlosti sýření, jeho průběhu, kvalitě sýřeniny i zrání sýrů. Mezi primární kultury, které zajišťují prokysání mléka i sýrů a uvolňují enzymy, které se podílejí na tvorbě chuti a vůně v průběhu zrání sýrů, jsou řazeny především bakterie rodu *Lactococcus*, *Leuconostoc* a *Lactobacillus* [6, 18].

Pro sýry s bílou plísní na povrchu se mléko před sýřením očkuje plísníovými kulturami *Penicillium camemberti*, *Penicillium caseicolum* a *Penicillium candidum*. Pro sýry s modrou plísní v těstě se mléko očkuje plísníovou kulturou *Penicillium roqueforti* [6]

3.4 Sýření mléka

Ke srážení mléka dochází působením syřidlového enzymu vhodným spolupůsobením čistých kultur produkujících kyselinu mléčnou. Jako syřidla se používají enzymy, které mají povahu

proteolytických enzymů, proteináz s optimem proteolýzy v kyselé oblasti. Nejdůležitějším požadavkem na syřidlové enzymy je úzká substrátová specifita a vysoká schopnost koagulace mléka, při omezení a s časem pomalu pokračující proteolýzou [6].

Mléko je možné koagulovat téměř všemi proteinázami, ale pouze omezený počet z nich vyhovuje výše uvedeným podmínkám. Dříve se používalo výlučně chymosinových syřidel získaných z telecích slezů sajících telat. Chymosinová syřidla byla v důsledku nedostatku počáteční suroviny nahrazována jinými druhy proteinas živočišného a mikrobiálního původu [6, 18].

Účinek syřidla spočívá v působení proteolytických enzymů na kasein. Nejprve v primární fázi dochází k destabilizaci kaseinové micely a tím ke ztrátě jejich soudržnosti. Snížením náboje micel se micely spojují. Jako fázi sekundární označujeme koagulaci destabilizovaného kaseinu. Podmínkou koagulace jsou volné ionty vápníku (nutnost přídavku chloridu vápenatého) a vhodná teplota. Pokud je teplota 10°C ke koagulaci nedochází. Terciární fázi je působení syřidlového enzymu a uplatňuje se při proteolytickém zrání sýrů. Tuto konečnou fázi musí zásadně ovlivňovat enzymy čistých mlékařských kultur (ČMK) odpovídající druhu sýra [6].

3.5 Zpracování sýřeniny, formování

Proces zpracování sýřeniny zahrnuje soubor operací podle jednotlivých typů sýrů zajišťující vytváření sýrového zrna vhodného pro následné formování. U měkkých sýrů je zpracování sýřeniny jednoduché. Postačuje pokrájení sýřeniny a šetrné nalévání do forem. U veškerých druhů sýrů je rozhodující dodržování standardního časového harmonogramu zpracování včetně průběhu teplotní a kyselostní křivky. Předpoklad dobré a vyrovnané kvality sýru po uzrání je splnění těchto parametrů, které jsou uvedeny v tabulce 1 [6].

U měkkého sýra se vyrobí finální výrobek o sušině 45% a tuku v sušině 40%. Sýřící teplota je 32 °C. Charakter sýra je ovlivněn způsobem zpracování sýřeniny. Lisování pak dokončuje tyto operace oddělení syrovátky a tvarování sýrů. Velikost sýrového zrna a zároveň jeho tuhost při krájení a také vypouštění je dána typem sýra a mechanizačního postupu [26].

Tabulka 1: Časový harmonogram při zpracování sýřeniny na výrobu sýrů [6]

Technologické operace	Měkké sýry
Sýření	40 min
Krájení	15min včetně odpočinku
Odpouštění syrovátky	-
Míchání	10 min
Přídavek vody	-
Dosoušení	-
Celkem zpracování	65 min
Vypouštění	10 min

Formování sýrů odpovídá danému typu a tvaru sýra. Podstatou je, že vytužené zrno musí být co nejrychleji tvarováno tak, aby zpracování jednotlivých výrobních šarží bylo zajištěno v průběhu cca 10 minut. Formování sýrů se provádí ve speciálních tvořítkách. Jsou nejčastěji kovová nebo plastová různého tvaru a velikosti. Jejich plášť je perforovaný z důvodu usnadnění odtoku syrovátky. Měkké sýry se obvykle nelisují, neboť v tomto případě dostatečně vlastní hmotnost syrové hmoty k odtoku dostatečného množství syrovátky. Výsledný tvar a sušinu získávají sýry pod tlakem vytvořeným vlastní hmotností [6].

Při formování sýrů je nezbytné, aby teplota v místnosti byla udržována podle druhu vyráběného sýru, protože zároveň s odkapáváním a lisováním dochází v sýrech k mléčnému kysání [5, 6].

3.6 Solení sýrů

Solení sýrů je nutná operace všech druhů tvarovaných a zrajících sýrů. Procesem solení dochází ke zpevnění povrchu sýra, regulaci obsahu vody v těstě, což má návaznost na konzistenci těsta a jeho mikroflóru, průběh kysání a zrání [6, 17].

Sýry se většinou solí v solné lázni. Koncentrace je 16 - 23% NaCl, teplota je 10-15 °C a kyselost se volí podle druhu vyráběného sýra. Solení sýrů probíhá v časovém intervalu ně-

kolika hodin až dnů. Během solení dochází k difúzi NaCl dovnitř sýra a do solné lázně přechází část syrovátky a rozpustných solí [6, 17].

Po vysolení se sýry nechávají 1-2 dny oschnout a balí se do obalů, ve kterých zrají, popřípadě se bez obalů dopravují do zracích sklepů [6].

3.7 Zrání sýrů

Zrání lze definovat všechny biochemické procesy probíhající v sýrech působením mikrobiálních enzymů, eventuálně syřidlových enzymů. Zrání sýrů ovlivňuje vzhled, chuť, vůni a konzistenci sýra. V průběhu zrání podléhají největším změnám laktosa a mléčné bílkoviny, u některých sýrů také tuk. Také zastoupení solí podléhá určitým změnám [6, 27, 28, 29].

Biochemické procesy, které probíhají v sýrech lze dělit do tří základních fází, které na sebe plynule navazují.

První fáze: Dochází k rozkladu laktosy bakteriemi mléčného kysání za vzniku kyseliny mléčné. K nejvýznamnějšímu rozkladu laktosy dochází v průběhu formování sýrů, během odkapávání a lisování sýrů je nejintenzivnější. V případě že dokysávání není dokončeno při lisování, sýry se ukládají po vyjmutí z tvořitek na police do temperované místnosti k dokysání, které obvykle bývá ukončeno do 20-24 hodin. Při dokysávání sýrů v průběhu solení se používá solná lázeň o vyšší teplotě. Vytvořená kyselina mléčná uvolňuje z kaseinu vápník a dojde ke vzniku mléčnanu vápenatého. V konečné fázi vzniká z kaseinu monokalciumpkaseinát, který bobtná ve vodě a v roztoku NaCl. Vytvoření vápenaté soli kaseinu podstatně ovlivňuje slepování sýřeniny a vznik homogenní struktury sýrů. Kyselina mléčná má vliv na zastoupení solí v sýrech. V průběhu 24 hodin dochází k transformaci anorganických solí v rozpustné soli, které také ovlivňují konečnou kyselost sýra [6].

Sekundární fáze: Dochází ke snížení kyselosti sýra nejen vazbou kyseliny mléčné, nýbrž i jejím mikrobiologickým rozkladem na kyselinu propionovou (příp. octovou), CO₂ a vodu, popřípadě i další sloučeniny nebo její vazbou na rozkladné produkty bílkovin. U měkkých sýrů dochází k mikrobiologickému rozkladu kyseliny mléčné aerobně od povrchu dovnitř mikroflórou na povrch sýra [6].

Třetí fáze: Probíhá proteolýza neboli rozklad bílkovin, a to anaerobně v celé hmotě (tzv. primární zrání) nebo aerobně od povrchu dovnitř (tzv. sekundární zrání). Během zrání dochází k rozkladu mléčných bílkovin. Působením proteolytických enzymů čistých kultur a

syřidla dochází ke vzniku peptidů o vysoké molekulové hmotnosti (obsahují více než 35 reziduí aminokyselin). Vysokomolekulární peptidy jsou ještě hydrolyzovány na peptidy s nízkou molekulovou hmotností (6-15 reziduí aminokyselin) a následující proteolýzou vznikají ještě kratší peptidy, dipeptidy a aminokyseliny, eventuálně jsou i aminokyseliny dále agregovány až na amoniak, sirovodík, vodu a další. Pojem rozsah zrání je chápán jako podíl ve vodě rozpustných dusíkatých látek, tj. albumos a peptonů. Rozsah zrání je významný u měkkých sýrů. Hloubkou zrání se rozumí množství aminokyselin a produktů jejich rozkladu k celkovému dusíku. U plísňových sýrů probíhá společně s velkým rozsahem i významná hloubka proteolýzy bílkovin. U plísňových sýrů (zejména s plísní v těstě) dochází k rozkladu mléčného tuku a za vzniku methylketonů, které těmto sýrům dodávají příznačnou chuť a vůni [6].

Zrání sýrů probíhá ve zracích sklepích. Nejvhodnější podmínky teploty a relativní vlhkosti jsou závislé na druhu sýra. V průběhu zrání se sýry ošetřují: omývají, obracejí, propíchnávají apod. Některé sýry zrají v obalech, které slouží i jako expediční obal, nebo pod nátěrem. Snižuje se pracnost při ošetřování a zároveň ztráty během zrání. Doba zrání u Hermelínu je několik týdnů a u Nivy až několik měsíců [6].

3.7.1 Sýry s plísní na povrchu

Výrobní proces odpovídá technologickým operacím pro měkké sýry. Kromě základní mezofilní kultury se do standardizovaného mléka přidává plísňová suspenze *Penicillium camemberti*. Nejprve se sýry formují, sýřenina se plní do blokových plastových tvořítek a potom odkapává na odkapní dráze. V průběhu odkapávání se asi čtyřikrát obracejí. Odkapané sýry se krátce solí v solné lázni. U nás je nyní používán kontinuální způsob solení nástřikem jemné suché soli na vlhký povrch sýra. Po oschnutí sýry zrají při 12 °C a relativní vlhkosti 10% po dobu 10 dní. Při zrání se sýry denně obracejí. Povrch zralých sýru je rovnoměrně prorostlý bílou plísní, na řezu mají jen malé množství dutin nebakteriálního původu. Jejich konzistence má být jemná, máslovitá, bez jádra. Chuť a vůně by měly být typické po proteolýze i lipolýze vlivem plísňové kultury a také by měly mít žampionovou příchut'. Sýry tohoto typu se vyrábějí s obsahem t. v s. (podíl tuku v sušině) 45 % nebo i vyšším. Mezi nejznámější zástupce této skupiny měkkých sýrů patří Camembert, Hermelín, Brie a Coulomier [6, 30].

3.7.2 Sýry s plísní v těstě

Pro tyto sýry je typická lipolýza mléčného tuku při zrání. Z tohoto důvodu se homogenizuje smetana, kterou se standardizuje mléko. U těchto sýrů se provádí sýření při 31 °C a trvá 60 min. Délka zpracování sýřeniny je 40 min. Do sýrového zrna se očkuje suspenze *Penicillium roqueforti* a malé množství soli. Po vykapání a vysolení se sýry solí buď na sucho, nebo v solné lázni. Tyto sýry zrají při teplotě 9 -12 °C a při vysoké relativní vlhkosti (> 90%). Na počátku zrání může být teplota vyšší a pak se postupně snižuje. Aby se usnadnil růst plísně, sýry se propichují sadou jehel. Celková doba zrání je 5-8 týdnů. Po uplynutí této doby se z povrchu sýrů odstraní maz popřípadě plíseň a balí se do hliníkové fólie. Sýry se dále skladují v nízkých teplotách. Nejpodstatnějšími složkami aromatu plísňových sýrů jsou 2-heptanon, 2-nonanon a další methylketony. Sýry s plísní v těstě jsou na rozmezí polotvrdých a měkkých sýrů. Významným představitelem této skupiny sýrů je Roquefort, který se vyrábí z ovčího mléka. Dalšími zástupci jsou Niva, Danablu, Stilton a Gongonzola [10, 25, 31].

4 ČISTÉ MLÉKAŘSKÉ KULTURY VYUŽÍVANÉ PŘI VÝROBĚ PLÍŠŇOVÝCH SÝRŮ

Sýrařské kysací kultury mají svůj původ hlavně v mléce. Naproti tomu další podstatná skupina sýrařských kultur, tzv. zracích, se dostává do výrobního procesu většinou dávkováním čisté kultury buď přímo do mléka nebo až dodatečně v průběhu zpracování sýřeniny sýra nebo samovolně ze zracího prostředí a zařízení sýrárny, s níž přijdou sýry do styku. Hlavními druhy zracích kultur jsou kultury plísňové [22].

4.1 Rokfórská kultura

Kultura *Penicillium roqueforti* je plíseň, která je typická pro rokfórský sýr. U nás se sýry rokfórského typu vyrábí z kravského mléka za spolupůsobení bakterií mléčného kvašení (základní kultury *Lactococcus lactis*) a plísňové kultury *Penicillium roqueforti*. Na jakosti plísňové kultury významně závisí dobré výsledky veškeré výroby sýru Niva [22, 32].

Penicillium roqueforti má asymetrické plodnice, na nichž vyrůstají konidie velikosti 4,0 až 5,0 μm . Plodnicová vlákna jsou široká asi 4,2 μm a dlouhá 35 až 45 μm . Konidiofory jsou dlouhé 200 až 300 μm . *Penicillium roqueforti* roste dobře na sladové a sladinové agarové živné půdě, na syrovátkovém agaru s kvasničným autolyzátem i na půdách obdobného složení, kde byl agar nahrazen želatinou. pH prostředí se upravuje na hodnotu 5,6. Kmen *Penicillium roqueforti* má několik morfologicky a fyziologicky odlišných variant. V podstatě to však bývají dva základní odlišné typy. První varieta tvoří kolonie okrouhlé, ohraničené myceliem, bílé až nažloutlé barvy. Po ukončené sporulaci je barva trávově zelená. Tato varieta mívá obvykle silnou lipolytickou, ale slabší proteolytickou aktivitu. Druhá varieta vytváří kolonie, které jsou nepravidelně rozlézavé s myceliem bílým až nažloutlým, které u starší kultury tmavne. Jakmile se vytvoří spory, kolonie druhé variety dostávají modrozelený nádech. Tato varieta mívá slabší lipolytickou, ale silnou proteolytickou aktivitu. Kultura *Penicillium roqueforti* roste dobře při relativní vlhkosti prostředí vyšší než 70 %. Optimální teplota růstu je mezi 15-23 °C. Dobrý růst je možné pozorovat i při teplotách nižších 5 až 7°C. *Penicillium roqueforti* je méně náročné na kyslík než ostatní plísně, přesto vyžaduje minimální přítomnost 5 % kyslíku. Jestliže je v prostředí obsah soli vyšší než 4 % růst se zpomaluje [22, 32].

Kultura *Penicillium roqueforti* se pěstuje na chlebových kostkách, strouhané žemlovce a agarové půdě. Nejrozšířenější způsob pěstování těchto expedičních kmenů je na polotuhé agarové půdě a má výhody proti předchozím metodám v jednoduchosti vizuálního posouzení porostu plísně i v zavedeném způsobu používání plísňových kultur při výrobě sýrů. Na chlebových kostkách a mleté žemlovce má kultura po ukončení kultivace zelenou nebo modrozelenou barvu a při třepání silně práší. V jednom gramu sušené plísně je obsaženo 2 až 12×10^9 spor [22, 32, 33].

Na sladové agarové půdě musí mít kultura homogenní porost zelené nebo modrozelené barvy, bez tvarových a barevných anomálií. Na porostu plísně je mikroskopicky zřejmá vrstva spor. V jedné lahvičce bývá 10 až 13×10^9 spor [22, 32].

Penicillium roqueforti pěstované jakýmkoliv z uvedených způsobů musí vykazovat dobrou proteolytickou a lipolytickou aktivitu. Po naočkování na sladový agar s mlékem musí po sedmidenní kultivaci při teplotě 23 °C rozložit mléčnou bílkovinu pod celou kolonií. Kultura pěstována na chlebových kostkách nebo na strouhané žemlovce a lyofilizovaná si uchovává svoji životaschopnost po dobu 6 až 9 měsíců [22, 32].

Na polotuhé půdě si *Penicillium roqueforti* udrží aktivitu 3 měsíce ode dne výroby, je-li kultura uložena při teplotě 5 až 10 °C a v temnu [22, 32].

4.2 Camembertská kultura

Kmeny *Penicillium camemberti* a *Penicillium caseicola* slouží k výrobě plísňové kultury používané k výrobě sýrů s povrchovým plísňovým porostem. Tyto plísně, kromě bakteriálních kultur (základní kultury *Lactococcus lactis*), zabezpečují svoji lipolytickou s proteolytickou činností vhodný průběh zrání sýrů typu camembert. Působením produkováných enzymů přispívají ke vzniku požadovaných chuťových a aromatických látek významných pro tuto kategorii sýrů. Kmeny používané k přípravě plísňové kultury jsou originální francouzské kultury popř. kmeny izolované z originálních francouzských sýrů camembert [22, 32].

Penicillium camemberti je kultura, která tvoří na sladovém agaru při teplotě 18 až 23 °C za 7 dní kolonie velikosti 2 až 3 cm. Tyto kolonie jsou vlnité, většinou bílé, ve starších kulturách jsou malinko našedlé. Spodní část kolonie může být bezbarvá nebo bledě žlutá a krémově žlutá. Vůně plísně je žampionová, částečně zatuchlá a připomínající bramborové lus-

ky. Konidiofory jsou 250 až 600 μm x 2,5 až 3,5 μm velké, vyrůstají-li ze substrátu, nebo 40 až 200 μm dlouhé vyrůstají-li ze vzdušných hyf. Větve jsou velké 12 až 18 μm x 2,2 až 3,4 μm . Metuly bývají dvě až tři ve skupině o velikosti 9 až 14 μm x 2,2 až 3,2 μm . Sterigmata jsou obvykle ve skupinách po dvou až pěti o velikosti 9 až 14 μm x 2,2 až 2,8 μm . Konidie mají elipsovitý tvar, později ho mají kruhový o velikosti 3,5 až 5,0 μm x 3,0 až 4,5 μm [22, 32, 33, 34, 35].

Penicillium camemberti se vyznačuje dobrou lipolytickou aktivitou a zároveň silnou proteolytickou činností, kdy dochází k rozkladu mléčné bílkoviny přes albumosy a peptony až na aminokyseliny a amoniak. Růst na Czapek-Doxově agaru je pomalejší oproti růstu na sladovém agaru, ale morfologicky jsou kolonie obdobné [22, 32].

Penicillium caseicolum tvoří kolonie na sladivém agaru po sedmi dnech kultivace při pokojové teplotě veliké 2,0 až 2,5 cm. Jsou bílé nebo patrně nažloutlé, někdy až lehce narůžovělé. Mají vatovitý vzhled a uprostřed jsou zdvižené. Jsou asi 2 až 3 mm vysoké, mírně vrásčité. Spodní část kolonií je bělavá až nažloutlá a paprscitě zvlňená. Konidiofory vyrůstající z mycelia a jsou 400 až 450 μm dlouhé, vyrůstají-li ze substrátu, nebo 50 až 100 μm dlouhé vyrůstají-li ze vzdušných hyf. Bývají 3 až 4 tlusté. Penicillia jsou asymetrická a nepravidelně větvená 60 až 85 μm dlouhá. Mají po dvou až třech metulách a sterigmatech. Větve bývají 15 až 30 μm x 3 až 4 μm velké, metuly 8 až 12 μm x 2,5 až 3,0 sterigmata 10 až 13 μm x 3,3 až 4,5 μm . Kultura *Penicillium caseicolum* má dobrou proteolytickou a lipolytickou aktivitu. Proteolytická aktivita je zde vyšší jak u *Penicillium roqueforti*. Vůně je žampionová, která později připomíná bramborové slupky [22, 32].

Expediční kulturu camembertské plísně tvoří směs kmenů *Penicillium camemberti* a *Penicillium caseicolum* [22, 32].

V průběhu kultivační doby vyroste na žemlových kostkách sněhobílý nebo slabě nažloutlý vatovitý povlak, ale u kmenu *Penicillium caseicolum* je tento povlak lehce narůžovělý. Žemlové kostky musí být od sebe jednoduše oddělitelné a sporulace musí být znatelná. Kultura musí vykazovat dobrou proteolytickou a lipolytickou aktivitu, tzn., že kolonie vyrostlé na sladovém agaru musí pod celou kolonií vykazovat po sedmi dnech kultivace při teplotě 23 °C rozloženou mléčnou bílkovinu [22, 32].

Vůně plísně je také žampionová, částečně zatuchlá a připomínající bramborové slupky, Spodní vrstva kolonií na sladovém agaru je bělavá, může být bledě žlutá nebo dosahuje ne-jintenzivnějšího žlutého zbarvení [22, 32].

5 BIOGENNÍ AMINY

Biogenní aminy jsou důležité dusíkaté látky, alifatické, aromatické nebo heterocyklické báze, které jsou odvozeny od aminokyselin, vykazující různé biologické účinky, neboť v živočišných tkáních a rostlinných pletivech plní různé funkce [36, 37, 38].

5.1 Vznik biogenních aminů

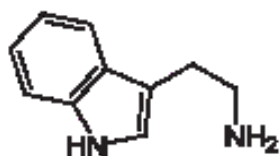
Biogenní aminy vznikají z aminokyselin působením dekarboxylas obsahujících jako kofaktor pyridoxalfosfát nebo z aminokyselin a karbonylových sloučenin působením transaminas [36, 39].

Endogenní biogenní aminy jsou produkty metabolismu a v nízkých koncentracích jsou přirozenou složkou prakticky všech potravin. Exogenní biogenní aminy vznikají v potravinách v důsledku mikrobiální kontaminace a také při kvasných procesech [36, 40].

Z histidinu vzniká histamin (histidindekarboxylasa), z tyrosinu tyramin (tyrosindekarboxylasa) a tryptofanu (dekarboxylasa aromatických aminokyselin známá také jako dopadekarboxylasa nebo tryptofandekarboxylasa) vznikají dopamin, resp. tryptamin. Dekarboxylace lysinu (lysindekarboxylasa) poskytuje kadaverin (1,5-diaminopentan), z ornitinu (tvoří se z argininu působením arginasy) vzniká působením ornithindekarboxylasy putrescin (1,4-diaminobutan) [36, 41].

5.2 Struktura a výskyt

vyskytují téměř ve všech potravinách jako běžné produkty metabolismu. Ve vyšším množství se nacházejí ve fermentovaných výrobcích (např. sýry), kde vznikají mikrobiální kontaminací. V nízkých koncentracích jsou nezbytné pro mnoho fyziologických funkcí, jako jsou regulace tělesné teploty, objem žaludku, žaludeční pH a činnost mozku. [36, 42, 43].



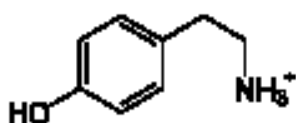
Obrázek 1: Tryptamin



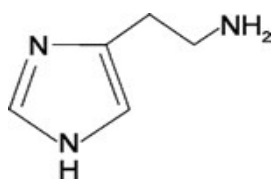
Obrázek 2: Kadaverin



Obrázek 3: Putrescin



Obrázek 4: Tyramin



Obrázek 5: Histamin [36]

Tabulka 2: Významné mikroorganismy v sýrech produkující biogenní aminy [36]

Potravina	Mikroorganismy	Produkovávané aminy
Sýry	<i>Lactobacillus buchneri</i> , <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>Enterococcus faecium</i> , <i>Propionibacterium spp.</i>	Histamin, kadaverin, putrescin, tyramin, tryptamin

V sýrech bývají hlavními zástupci biogenních aminů: histamin, kadaverin, putrescin a tyramin. Obsah biogenních aminů vzrůstá při výrobě některých sýrů, a to zejména zrajících. Tento nárůst je zřejmý hlavně v počátečních fázích fermentace výrobků a je závislý na druhu přítomných mikroorganismů. Při zrání sýrů dochází k výrazné tvorbě biogenních aminů zejména v provozech s nevyhovující hygienickou úrovní, tedy působením kontaminující mikroflóry. Při dobré technologii a dodržování správných hygienických zásad obsahují i dlouhodobě zrající sýry poměrně malá množství biogenních aminů [36, 44].

5.3 Biologické účinky

Biogenní aminy jsou pro organismus nepostradatelné, ale ve vysokých koncentracích se mohou projevovat jako látky:

- psychoaktivní aminy - působí jako přenašeči v centrálním nervovém systému
- vasoaktivní aminy- působí přímo nebo nepřímo na vaskulární systém. Vasoaktivní aminy můžeme podle účinku rozdělit:
 - vasokontrabilní aminy (např. tyramin)
 - vasodilatační aminy (např. histamin)

Symptomy konzumace vysokých dávek biogenních aminů jsou zvracení, dýchací potíže, pocení, bušení srdce, hypotenze (histamin) nebo hypertenze (tyramin) a migrény (tyramin). Hlavními enzymy, které ve střevech odbourávají biogenní aminy, jsou monoaminoxidas a diaminoxidas. Přítomnost biogenních aminů, je důležitá nejen z toxikologického hlediska, ale může být také použit jako ukazatel znehodnocení [36, 37, 45, 46].

II. PRAKTICKÁ ČÁST

6 CÍL PRÁCE

Cílem bakalářské práce bylo stanovení obsahu biogenních aminů ve vybraných plísňových sýrech. Tyto výrobky byly zakoupeny v běžné obchodní síti v ČR.

Cílem teoretické části práce bylo:

- definovat jednotlivé druhy plísňových sýrů a popsat jejich výrobu,
- charakterizovat biogenní aminy,
- popsat výskyt biogenních aminů v plísňových sýrech

Cílem praktické části bakalářské práce bylo:

- v obchodní síti zakoupit vzorky plísňových sýrů,
- provést mikrobiologickou analýzu plísňových sýrů,
- stanovit obsah biogenních aminů ve vzorcích sýrů,
- na základě výsledků formulovat závěry.

7 MATERIÁL, POMŮCKY A METODY

7.1 Charakteristika vzorků

V bakalářské práci byl stanoven obsah osmi biogenních aminů (tryptaminu, fenyletylaminu, putrescinu, kadaverinu, histaminu, tyraminu, spermidinu a sperminu) u 15 vzorků plísňových sýrů. U 9 vzorků se jednalo o plísňové sýry s bílou plísní na povrchu a u zbývajících 6 vzorků o plísňové sýry s modrou plísní v těstě. V tabulce č. 3 jsou uvedeny základní údaje výše uvedených zkoumaných sýrů. Všechny výrobky byly přírodní, bez příchutě. Sýry byly zakoupeny v běžné obchodní síti v ČR a v období mezi mikrobiologickou a analýzou a analýzou biogenních aminů byly skladovány při teplotě min. -18°C.

Tabulka 3: Charakteristika analyzovaných vzorků sýrů

Označení vzorku	Druh sýra	Obsah tuku (% w/w)	Obsah tuku v sušině (% w/w)
A1	s plísní na povrchu	26,4	48
A2	s plísní na povrchu	51	60
A3	s plísní na povrchu	60	50
A4	s plísní na povrchu	23	46
A5	s plísní na povrchu	49	43
A6	s plísní na povrchu	52	46
A7	s plísní na povrchu	31	50,5
A8	s plísní na povrchu	22,5	45
A9	s plísní na povrchu	28	49,5
B1	s plísní v těstě	52	50
B2	s plísní v těstě	50	52
B3	s plísní v těstě	31	53
B4	s plísní v těstě	48	48
B5	s plísní v těstě	50	52
B6	s plísní v těstě	50	53

7.2 Mikrobiologická analýza testovaných sýrů

7.2.1 Použité zařízení a pomůcky

- Autokláv Systec 2540 EL
- Automatické mikropipety Biohit (různého objemu)
- Bakteriologické kličky
- Biologický termostat Memert INE 600
- Chladnička Elektrolux
- Laboratorní předvážky KERN
- Laboratorní sklo (kádinky, Petriho misky, zkumavky)
- Eppendorfkové mikrozkušavky
- Vortex Heidolph Reax
- Termostat (teplota 30 °C, 37 °C a 38 °C)

7.2.2 Testované mikroorganismy

Pro mikrobiologické stanovení vybraných skupin mikroorganismů ve vzorcích sýrů byly použity kultivační půdy uvedené v tabulce 4 – Plate Count Agar (PCA), Endův agar (EA), Agar M17, MRS agar, Slanetz-Bartley agar (SB) a CHYGA (agar s chloramfenikolem, glukosou a kvasničným extraktem).

Tabulka 4: Kultivační půdy a typ stanovovaného mikroorganismu

Půda	Mikroorganismy
PCA	celkový počet MO (CPM)
EA	čeleď <i>Enterobacteriaceae</i>
SB	enterokoky
M17	mléčné koky
MRS	laktobacily
CHYGA	kvasinky a plísňe

Pro potlačení růstu plísní byl do všech půd s výjimkou CHYGA přidán cykloheximid (Actidione, Sigma-Aldrich) v koncentraci 50 mg/l. Příslušné navážky jednotlivých půd,

včetně antifungálního cykloheximidu, byly poté rozpuštěny v daném množství destilované vody a poté sterilizovány v autoklávu při teplotě 121 °C po dobu 30 minut. Následně byly půdy rozlity na Petriho misky (objem cca 20 ml).

7.2.3 Složení živných médií

Plate Count Agar (PCA, HiMedia)

Složení (množství jednotlivých složek uvedeno na jeden litr půdy):

- Enzymatický hydrolyzát kaseinu 5,0 g
- Kvasničný extrakt 2,5 g
- Glukosa 1,0g
- Agar 15,0g

Endův Agar (EA, HiMedia)

Složení (množství jednotlivých složek uvedeno na jeden litr půdy):

- Pepton 10,0 g
- Hydrogenfosforečnan draselný 3,5 g
- Laktosa 10,0 g
- Siřičitan sodný 2,5 g
- Fuchsin 0,5 g
- Agar 15,0 g

Slanetz-Bartley Agar (SB, HiMedia)

Složení (množství jednotlivých složek uvedeno na jeden litr půdy):

- Tryptosa 20,0g
- Kvasničný extrakt 5,0g
- Dextrosa 2,0g
- K_2HPO_4 4g
- Azid sodný 0,4g
- TTC (trifenyltetrazolium chlorid) 0,1g
- Agar 15,0 g

M17 Agar (Oxoid)

Složení (množství jednotlivých složek uvedeno na jeden litr půdy):

- Tryptosa 5,0 g
- Sojový pepton 5,0 g
- Masový pepton 5,0 g
- Síran hořečnatý 0,25 g
- Di-sodium-glycerofosfát 19 g
- Laktosa 5,0 g
- Agar 15,0 g

MRS (De Man Rogosa Sharpe Agar; HiMedia))

Složení (množství jednotlivých složek uvedeno na jeden litr půdy):

- Masový pepton 10,0g
- Hovězí extrakt 10,0g
- Kvasničný extrakt 4,0g
- Dextrosa 20,0g
- Hydrogenfosforečnan (di)draselný 2,0g
- Polysorbát 80 1,0g
- Citran amonný 2,0g
- Octan sodný 5,0g
- Heptahydrát síranu hořečnatého 0,1g
- Tetrahydrát síranu manganatého 0,05 g
- Agar 15,0g

Agar s glukosou, kvasničným extraktem a chloramfenikolem (CHYGA)

Složení (množství jednotlivých složek uvedeno na jeden litr půdy):

- Kvasničný extrakt 5,0 g
- Dextrosa 20,0 g
- Chloramfenikol 0,10 g
- Agar 13,0 g

Fyziologický roztok (0,9 % roztok NaCl)

Chlorid sodný (NaCl).....9,0g

Voda.....1000ml

Příprava:

Navážka chloridu sodného byla rozpuštěna v 1000 ml destilované vody a poté byl fyziologický roztok sterilizován v autoklávu při teplotě 121°C po dobu 30 minut.

7.2.4 Příprava vzorků sýrů a metodika jednotlivých stanovení

Při odběru jednotlivých plísňových sýrů byly používány sterilní pomůcky. Z každého vzorku bylo za aseptických podmínek naváženo do polyetylenového sáčku množství sýru v rozmezí 5 až 6 g. K navážce byl přidán 9 násobek sterilního fyziologického roztoku. Obsah sáčku byl důkladně homogenizován ve Stomacheru a označen jako ředění 10^{-1} . Ze suspenze byla ve fyziologickém roztoku vytvořena řada desítkového ředění až do ředění 10^{-5} . Podmínky úpravy vzorků a přípravy výchozí suspenze a desítkového ředění jsou dány normou ČSN EN ISO 6887 [47], která je českou verzí evropské normy EN ISO 6887-1:1999 [48]. Počet misek pro jednotlivé vzorky, půdy a ředění jsou znázorněny v následující tabulce.

Tabulka 5: Počet misek jednotlivých ředění pro konkrétní vzorky

Typ půdy	PCA		EA		SB		M17		MRS		CHYGA	
Použité			10^{-1}	2x	10^{-1}	2x						
ředění/počet	10^{-2}	2x	10^{-2}	2x	10^{-2}	2x						
misek	10^{-3}	2x					10^{-3}	2x	10^{-3}	2x	10^{-3}	2x
	10^{-4}	2x					10^{-4}	2x	10^{-4}	2x	10^{-4}	2x
	10^{-5}	2x					10^{-5}	2x	10^{-5}	2x	10^{-5}	2x

Na Petriho misky s příslušnou půdou bylo asepticky naočkováno mikropipetou 0,1 ml vzorku příslušného ředění. Inokulát byl rozetřen sterilní hokejkou po celém povrchu půdy. Naočkované plotny byly vloženy do termostatu dnem vzhůru, aby se zabránilo případnému

stékání zkondenzované vody na povrch živné půdy. Kultivace v termostatu trvala příslušnou dobu při teplotě vhodné podle typu mikroorganismu, který byl stanovován (viz. Tabulka 6).

Tabulka 6: Inkubační podmínky pro jednotlivé kultivační půdy

Půda	Kultivační teplota (°C)	Čas (h)
PCA	30	48
EA	37	24
SB	37	48
M17	37	48
MRS	37	48
CHYGA	20	120

7.2.5 Odečítání výsledků

Po příslušné době kultivace byly spočítány kolonie, které na miskách vyrostly a počet vyrostlých mikroorganismů byl přepočítána na KTJ/g. Při vlastním výpočtu počtu mikroorganismů N se postupovalo následovně:

Petriho misky stejného ředění

Použijí-li se pro výpočet dvě (případně více) Petriho misky stejného ředění, výsledný počet mikroorganismů se vypočítá podle vzorce:

$$N = \frac{c/n}{d \cdot V}$$

kde:

N- počet mikroorganismů [KTJ.ml⁻¹ nebo KTJ.g⁻¹]

Σc- součet všech kolonií na všech plotnách použitých pro výpočet

n- počet ploten použitých pro výpočet

d- příslušné použité ředění

V- objem očkovaného inokula (pipetovaného vzorku) [ml]

Dvě Petriho misky po sobě jdoucího ředění

Použijí-li se pro výpočet dvě misky po sobě jdoucího ředění, výsledný počet mikroorganismů se vypočítá podle vzorce:

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

kde:

N- počet mikroorganismů [KTJ.ml⁻¹ nebo KTJ.g⁻¹]

Σc- součet všech kolonií na všech plotnách použitých pro výpočet

n₁- počet ploten prvního ředění použitých pro výpočet

n₂- počet ploten druhého ředění použitých pro výpočet

d- ředící faktor odpovídající prvnímu pro výpočet použitému ředění

V- objem očkovaného inokula (pipetovaného vzorku) očkovaného na každou plotnu [ml]

7.3 Stanovení biogenních aminů

7.3.1 Přístroje a pomůcky

- Lyofilizátor ALPHA 1-4 LSC (CHRIST)
- Hlubokomrazicí box MDF-U3286S (Sanyo)
- Automatické mikropipety Biohit
- Analytické váhy A&D GH-200 EC
- Odstředivka EBA 21 (Hettich)
- Třepačka Biosan
- Vortex Heidolph Real
- Laboratorní sklo (odměrné baňky 25 ml, derivatizační nádobky, filtrační nálevky) a plasty
- Zařízení pro deionizaci vody

7.3.2 Chemikálie

- 0,6 M HClO₄ (Sigma-Aldrich)
- 1,7-heptandiamin v koncentraci 500 mg/l (Sigma-Aldrich)

- dansylchlorid o koncentraci 5 g/l v acetonu (Merck)
- roztoku prolinu (Sigma-Aldrich)
- heptan (Sigma-Aldrich)
- acetonitril (Sigma-Aldrich)
- 0,5 M NaHCO₃ (Merck)
- Na₂CO₃ (Merck)
- K₂CO₃ (Merck)

7.3.3 Příprava vzorků sýrů pro stanovení biogenních aminů

Nejprve byl každý vzorek rozkrájen na drobné části a poté zhomogenizován promícháním. Následně byly zváženy prázdné hliníkové misky. Poté bylo do misek naváženo 25– 40 g vzorku. Misky se vzorky byly umístěny na 24 hodiny do mrazicího boxu s teplotou -80 °C. Následně byly vzorky umístěny do lyofilizátoru a lyofilizovány. Lyofilizované vzorky byly zváženy a rozmělněny na prášek. Rozmělněné vzorky byly až do další fáze analýzy uskladněny v uzavřených igelitových sáčkách v mrazicím zařízení.

Takto připravené vzorky byly podrobeny derivatizaci pomocí dansylchloridu. Do 15 ml zkumavky byl navážen 1 g rozmělněného vzorku, ke kterému bylo přidáno 10 ml 0,6 M HClO₄ (Sigma-Aldrich). Obsah zkumavky byl promíchán pomocí vortexu a umístěn na laboratorní třepačku, kde byl 30 minut třepán. Následně byly zkumavky odstředěny při 6000 otáčkách po dobu 20 minut.

Supernatant byl přelit do odměrné baňky o obsahu 25 ml. K sedimentu bylo napipetováno 7 ml 0,6 M HClO₄, vzorek byl opět promíchán na vortexu a třepán 20 minut na třepačce. Zkumavky byly 20 minut odstředovány při 6000 otáčkách a supernatant byl přidán do odměrných zkumavek. K sedimentu bylo přidáno dalších 7 ml 0,6 M HClO₄. Postup třepání a odstředování byl zopakován. Supernatant byl přelit do 25 ml odměrných baněk a množství roztoku v nich bylo doplněno 0,6 M HClO₄ po rysku

Suspenze byla a přefiltrována přes papírový filtr a 1 ml vzorku byl odpipetován do derivatizační nádoby. Z každé odměrné baňky byly stejným způsobem připraveny 3 derivatizační nádoby (3 paralelní stanovení). Podle Dadákové a kol [25, 27] bylo ke vzorku do každé derivatizační nádoby přidáno 100 µl vnitřního standardu (1,7-heptandiamin v koncentraci 500 mg/l), 1,5 ml karbonátového pufru o pH 11,1-11,2 a 2 ml čerstvě připraveného rozto-

ku dansylchloridu o koncentraci 5 g/l v acetonu (Merck). Pufr o pH 9,2 byl přichystán smícháním 50 ml roztoku A (0,5 M NaHCO₃; Merck, SRN) a 12 ml roztoku B (0,5 M Na₂CO₃; Merck). Poté bylo v pufru rozpuštěno 16,65 g K₂CO₃ (Merck) a výsledné pH bylo upraveno na výsledných 11,1-11,2. Derivatizační nádoby byly uzavřeny a třepány v temnu po dobu 20 hodin.

Po 20 hodinách bylo ke vzorkům přidáno 200 µl roztoku prolinu (Sigma-Aldrich), vzorky byly dobře uzavřeny a třepány další 1 hodinu. Poté byly ke vzorkům přidány 3 ml heptanu (Sigma-Aldrich) a byly 3 minuty dobře ručně protřepávány. Po ustálení heptanové vrstvy z ní byl odpipetován 1 ml do vialky. Heptan byl pod proudem dusíky při teplotě 60 °C odpařen. Suchý odparek byl zředěn 1,5 ml acetonitrilu (Sigma-Aldrich). Poté byl uchováván do doby analýzy v mrazicím zařízení při teplotách pod -18 °C. Bezprostředně před analýzou byl přefiltrován přes stříkačkový filtr s porozitou 0,22 µm. Takto připravené vzorky byly dávkovány do chromatografického systému [49, 50, 51].

7.3.4 Chromatografické stanovení biogenních aminů

Předchozím postupem bylo získáno 45 vzorků (15 vzorků, každý derivatizován paralelně 3x) připravených k analýze pomocí HPLC. Vzorky byly umístěny do přístroje, kde byly automaticky dávkovány do kolony a separovány gradientovou elucí podle Smělá a kol. [52] (kolona Cogent HPS C18 s rozměry 150x 4,6 mm a velikostí částic 5 µm, Cogent USA; termostat kolon Agilent 1260 Infinity, UV/VIS DAD detektor Agilent 1200, Agilent Technologies; binární pumpa a autosampler LabAlliance).

Dansylderiváty biogenních aminů byly detekovány spektrofotometricky UV zářením o vlnové délce 254 nm.

Výsledné chromatogramy byly vyhodnoceny pomocí programu Clarity a kalibračních křivek získaných analýzou směsi standardů.

8 VÝSLEDKY A DISKUZE

8.1 Stanovení počtu mikroorganismů

V následující části budou vyhodnoceny počty mikroorganismů přítomných v jednotlivých vzorcích. Vzorky byly rozděleny do skupin A a B. První skupina zahrnuje 9 vzorků (A1-A9) a druhá skupina 6 vzorků (B1-B6). Výsledky počtu mikroorganismů jsou vypočítány podle vzorců uvedených v kapitole 7.2.5 a zpracovány do tabulek. V tabulkách jsou uvedeny hodnoty počtu mikroorganismů přepočtené na KTJ/g. Ve vzorcích byly stanovovány na příslušných živných mediích celkové počty mikroorganismů (CPM), počty bakterií čeledi *Enterobacteriaceae*, počty enterokoků, laktokoků, laktobacilů, kvasinek a plísní. Rod *Enterococcus* je schopen tvořit biogenní aminy. Tvorba biogenních aminů je především ovlivněna růstovou fází buněk, tedy množstvím a aktivitou těchto bakterií v médiu [53].

Podle celkového počtu mikroorganismů můžeme posuzovat úroveň hygieny, jelikož CPM je obecně považován za indikátor hygienické jakosti.

8.1.1 Počty mikroorganismů ve vzorcích sýrů s plísní na povrchu

Tabulka uvádí výsledné počty mikroorganismů ve vzorcích skupiny A.

Tabulka 7: Výsledky počtu mikroorganismů ve vzorcích sýrů skupiny A

Vzorky skupiny A	Počty mikroorganismů KTJ/g					
	CPM	enterobakterie	enterokoky	laktokoky	laktobacily	kvasinky a plísně
A1	$2,8 \cdot 10^5$	<10	<10	$5,1 \cdot 10^6$	$1,0 \cdot 10^6$	<10
A2	0	<10	<10	$3,5 \cdot 10^7$	$1,4 \cdot 10^6$	$1,7 \cdot 10^6$
A3	$2,8 \cdot 10^7$	<10	<10	$2,9 \cdot 10^7$	$4,2 \cdot 10^7$	$1,3 \cdot 10^7$
A4	$2,2 \cdot 10^7$	<10	$2,0 \cdot 10^4$	$1,9 \cdot 10^7$	$2,3 \cdot 10^7$	$2,0 \cdot 10^7$
A5	0	<10	<10	<10	<10	$3,8 \cdot 10^5$
A6	$3,7 \cdot 10^7$	<10	$2,6 \cdot 10^5$	$2,2 \cdot 10^8$	$1,4 \cdot 10^8$	$1,1 \cdot 10^6$
A7	$4,5 \cdot 10^7$	<10	<10	$1,1 \cdot 10^6$	$1,5 \cdot 10^6$	$5,7 \cdot 10^7$
A8	0	<10	<10	<10	$2,8 \cdot 10^8$	$1,0 \cdot 10^8$
A9	0	$5,7 \cdot 10^3$	<10	$2,1 \cdot 10^8$	$2,6 \cdot 10^8$	$1,2 \cdot 10^6$

Skupina A zahrnovala 9 vzorků sýrů s plísní na povrchu. Celkové počty mikroorganismů se u vzorků pohybovaly v řádech 10^5 - 10^7 KTJ/g. Enterobakterie byly spočítány pouze u vzorku A9, a to v počtu $5,7 \cdot 10^3$ KTJ/g. Počet enterokoků byl zjištěn pouze u vzorku A4 a A6. Počty bakterií mléčného kvašení byly zjištěny v řádech 10^5 - 10^8 KTJ/g (mléčné koky) a 10^6 - 10^8 KTJ/g (laktobacily). Množství kvasinek a plísní se pohybovalo v řádech 10^5 - 10^8 KTJ/g.

8.1.2 Počty mikroorganismů ve vzorcích sýrů s plísní uvnitř hmoty

Tabulka uvádí výsledné počty mikroorganismů ve vzorcích skupiny B. Skupina B zahrnovala 6 vzorků sýrů s plísní uvnitř hmoty. Celkové počty mikroorganismů u vzorků skupiny B byly vyšší než u skupiny A a pohybovaly se v řádech 10^6 - 10^8 KTJ/g. Přítomnost enterobakterií byla zjištěna pouze u dvou vzorků a to B1 a B3. U vzorku B1 byl stanoven počet $2,9 \cdot 10^3$ KTJ/g a u vzorku B4 $2,2 \cdot 10^5$ KTJ/g. Enterokoky nebyly stanoveny u vzorků B1 a B2, ale u ostatních se jejich počty pohybovaly v řádech 10^5 - 10^7 KTJ/g. Počty bakterií mléčného kvašení (mléčných koků i laktobacilů) byly zjištěny v řádech 10^5 - 10^8 KTJ/g. Počet kvasinek a plísní se pohyboval v rozmezí 10^6 - 10^8 KTJ/g s výjimkou jednoho sýru (B6), u kterého byl zjištěn malý nárůst kvasinek a plísní.

Tabulka 8: Výsledky počtu mikroorganismů ve vzorcích skupiny B

Vzorky skupiny B	Počty mikroorganismů KTJ/g					
	CPM	enterobakterie	enterokoky	laktokoky	laktobacily	kvasinky a plísně
B1	$2,13 \cdot 10^6$	$2,9 \cdot 10^3$	<10	$1,1 \cdot 10^6$	$5,2 \cdot 10^5$	$1,2 \cdot 10^6$
B2	<10	<10	<10	<10	<10	$4,2 \cdot 10^5$
B3	$1,7 \cdot 10^7$	<10	$3,8 \cdot 10^7$	$1,6 \cdot 10^7$	$1,5 \cdot 10^7$	$7,2 \cdot 10^7$
B4	$2,2 \cdot 10^8$	$2,2 \cdot 10^5$	$2,8 \cdot 10^5$	$1,3 \cdot 10^8$	<10	$3,1 \cdot 10^8$
B5	$3,5 \cdot 10^8$	<10	$1,8 \cdot 10^5$	<10	<10	$1,7 \cdot 10^8$
B6	$6,5 \cdot 10^6$	<10	$2,8 \cdot 10^5$	$4,7 \cdot 10^6$	$2,0 \cdot 10^6$	<10

Obecně lze říci, že celkové počty mikroorganismů u vzorků skupiny A se pohybovaly v nižších řádech než u vzorků skupiny B. Přítomnost enterobakterií nebyla u většiny vzorků sýrů obou skupin zjištěna. Počet enterokoků byl u sýrů s plísní na povrchu zjištěn v rozmezí

10^4 - 10^5 KTJ/g a sýrů s plísní uvnitř hmoty v rozmezí 10^5 - 10^7 KTJ/g. Hodnoty počtu mléčných koků byly u obou analyzovaných skupin plísňových sýrů zjištěny v řádech 10^6 - 10^8 KTJ/g. V případě mléčných tyčinek byly u sýrů skupiny A zjištěny hodnoty o jeden až tři řády vyšší než u sýrů skupiny B. Kvasinky a plísně byly zjištěny u obou skupin v řádech 10^5 - 10^8 KTJ/g.

8.2 Výsledky analýzy biogenních aminů

V bakalářské práci byl sledován výskyt a zároveň jednotlivé obsahy osmi biogenních aminů u 15 vzorků plísňových sýrů. Vzorky byly hodnoceny ve 2 skupinách (A-B). Obsah jednotlivých biogenních aminů byl zjišťován pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie. Celkové množství BA kolísalo od 46,37 mg/l až po 548,13 mg/kg.

8.2.1 Obsah biogenních aminů ve vzorcích sýrů s plísní na povrchu

Skupina A obsahovala 9 vzorků sýrů s plísní na povrchu. Tyto sýry patří do skupiny sladkých sýrů. K výrobě těchto sýrů bylo použito pasterované mléko, smetana, jedlá sůl, mlékařská kultura a plísňová kultura *Penicillium candidum*.

Tabulka 9: Obsah putrescinu, kadaverinu, tyraminu, spermidinu a sperminu v sýrech s plísní na povrchu (skupina A, vzorky 1-9)

Vzorky skupiny A	Množství jednotlivých biogenních aminů [mg/kg]				
	Putrescin	Kadaverin	Tyramin	Spermidin	Spermin
A1	15,81±1,22	ND	20,01±0,78	ND	38,26±1,09
A2	20,12±1,66	ND	8,81±0,67	ND	25,92±2,18
A3	16,89±1,09	ND	10,20±0,84	ND	33,71±1,40
A4	11,13±0,90	ND	9,13±0,47	5,51±0,25	23,75±0,71
A5	19,16±1,15	ND	11,86±0,48	ND	23,41±0,75
A6	16,11±1,06	ND	16,26±1,45	ND	38,88±3,08
A7	ND	ND	18,09±1,53	5,13±0,35	48,15±0,92
A8	117,52±7,46	311,13±9,75	35,73±3,06	5,97±0,44	77,77±2,35
A9	10,26±0,36	ND	11,07±0,68	ND	25,05±1,27

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

** ND – biogenní amin nedetekován

Obsah biogenních aminů u vzorků skupiny A je uveden v tabulce 9. Biogenní aminy tyramin a spermin byly stanoveny ve všech sýrech tohoto typu. Koncentrace těchto dvou biogenních aminů se patrně lišily. Obsah tyraminu v jednotlivých vzorcích se pohyboval v rozmezí $8,81 \pm 0,67$ až $35,73 \pm 3,06$ mg/kg. Obsah sperminu v jednotlivých vzorcích se pohyboval v rozmezí $23,41 \pm 0,75$ až $77,77 \pm 2,35$ mg/kg. Naproti tomu tryptamin, fenyletylamin a histamin nebyly detekovány v žádném vzorku této skupiny. Putrescin byl stanoven ve všech vzorcích kromě vzorku A7. U vzorku A8 se hodnota výrazně odchylovala od ostatních a činila $117,52 \pm 7,46$ mg/kg. Naopak kadaverin byl stanoven pouze ve vzorku A8, jehož obsah činil $311,13 \pm 9,75$ mg/kg. Spermidin byl detekován pouze ve třech vzorcích A4, A7 a A8.

8.2.2 Obsah biogenních aminů ve vzorcích skupiny B

Skupina B obsahovala 6 vzorků sýrů s plísní uvnitř hmoty. Tyto sýry taktéž patří do skupiny sladkých sýrů. K výrobě těchto sýrů bylo použito pasterované mléko, smetana, jedlá sůl, mlékařská kultura a plísnivá kultura *Penicillium roqueforti*. Obsah biogenních aminů u vzorků skupiny B je uveden v tabulce 10.

Tabulka 10: Obsah putrescinu, kadaverinu, tyraminu, spermidinu a sperminu v sýrech s plísní v těstě (skupina B, vzorky 1 – 6)

Vzorky skupiny B	Množství jednotlivých biogenních aminů [mg/kg]				
	Putrescin	Kadaverin	Tyramin	Spermidin	Spermin
B1	$6,36 \pm 0,12$	$10,17 \pm 0,46$	$72,21 \pm 4,23$	$15,40 \pm 1,15$	$132,47 \pm 8,57$
B2	$11,92 \pm 0,94$	ND	$127,79 \pm 4,92$	$8,29 \pm 0,59$	$124,37 \pm 2,15$
B3	$23,01 \pm 1,74$	ND	$87,96 \pm 2,33$	$8,42 \pm 0,20$	$171,91 \pm 4,52$
B4	$11,04 \pm 0,55$	ND	$40,59 \pm 2,33$	$21,13 \pm 1,92$	$116,95 \pm 7,18$
B5	$5,48 \pm 0,24$	ND	$220,51 \pm 11,73$	$10,54 \pm 0,78$	$199,80 \pm 13,16$
B6	$17,89 \pm 0,95$	ND	$66,13 \pm 5,06$	$13,76 \pm 0,53$	$168,12 \pm 11,16$

* Množství biogenních aminů vyjádřeno jako průměr \pm směrodatná odchylka (n = 6).

** ND – biogenní amin nedetekován

V této skupině sýrů byly ve všech vzorcích detekovány biogenní aminy putrescin, tyramin, spermidin a spermin. Obsah putrescinu a spermidinu se pohyboval přibližně ve stejných

hodnotách. Jejich koncentrace byla značně nižší než u tyraminu a sperminu. U vzorku B5 bylo dosaženo nejvyšší hodnoty u biogenního aminu tyraminu, který byl detekován v koncentraci $220,51 \pm 11,73$ mg/kg. Biogenní aminy tryptamin, fenyletylenamin a histamin nebyly stanoveny v žádném z těchto vzorků.

Tabulka 11: Celkový obsah biogenních aminů v mg/kg v sýrech s plísní na povrchu (skupina A) a sýrech s plísní uvnitř hmoty (skupina B)

Vzorky skupiny A	Celkový obsah biogenních aminů ve vzorku [mg/kg]	Vzorky skupiny B	Celkový obsah biogenních aminů ve vzorku [mg/kg]
A1	74,08	B1	236,61
A2	54,86	B2	272,38
A3	60,80	B3	291,30
A4	49,52	B4	189,71
A5	54,43	B5	436,33
A6	272,38	B6	265,90
A7	71,37		
A8	548,13		
A9	46,37		

V tabulce 11 je uveden celkový obsah biogenních aminů u jednotlivých vzorků sýrů skupiny A. Přičemž nejvyšší množství biogenních aminů 548,13 mg/kg bylo detekováno u vzorku A8. Tento obsah lze považovat za velmi vysoký. Naopak nejnižší hodnoty 46,37 mg/kg bylo dosaženo u vzorku A9.

Celkový obsah biogenních aminů ve vzorcích skupiny B je taktéž uveden v tabulce 11. U vzorku B2, B3, B6 byly zjištěny velmi blízké hodnoty pohybující se v rozmezí 265 – 291 mg/kg. Vzorek B5 dosáhl nejvyšší hodnoty biogenních aminů, která činila 436,33 mg/kg.

8.3 Souhrnná diskuze

V této bakalářské práci byla provedena detekce 8 biogenních aminů (tryptaminu, fenyletylaminu, putrescinu, kadaverinu, histaminu, tyraminu, sperminu, spermidinu) v plísnových

sýrech pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie. K analýze bylo předloženo 15 vzorků sýrů. Stanovení bylo doplněno o mikrobiologické vyšetření vzorků na přítomnost nejběžnějších skupin mikroorganismů. Některé tyto mikroorganismy se mohou podílet na produkci biogenních aminů.

Sýry představují ideální prostředí pro tvorbu biogenních aminů, které vznikají převážně dekarboxylací volných aminokyselin za působení bakteriálních dekarboxyláz [39]. Schopnost tvořit biogenní aminy byla popsána pro některé mikroorganismy zejména čeledi *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* spp. [54] a pro bakterie mléčného kvašení [55, 56].

Mnohem častěji se biogenní aminy vyskytují v sýrech vlivem sekundární kontaminace mikroorganismů [57].

V rámci studie Standarové et al. [2] byl monitorován výskyt biogenních aminů v plísňových sýrech. Tyramin se vyskytoval u plísňového sýru Hermelín (187 mg/kg). Hladina kadaverinu u sýra Camembert přesáhla hodnotu 1000 mg/kg. Vysoké hladiny kadaverinu byly rovněž detekovány u sýru Niva (699 mg/kg). Koncentrace tryptaminu a fenyletyaminu byla u těchto sýrů nízká nebo nebyla vůbec detekována. Spermin a spermidin byly v plísňových sýrech obsaženy ve vysokých koncentracích [2]. Sýry s bílou plísní na povrchu nebo plísní uvnitř hmoty mají velmi odlišný obsah biogenních aminů. Toto množství je značně variabilní i v rámci jednoho druhu sýra nebo se může lišit i v různých vrstvách sýrů [2, 30, 57].

Běžná množství biogenních aminů v potravinách a nápojích (cca < 100 mg/kg) nepředstavují pro zdravého člověka významnější riziko, protože jsou v lidském střevním traktu metabolizovány činností detoxikačních mikroorganismů [39, 46].

Shalaby navrhl [46], že suma histamin + tyramin + putrescin + kadaverin by pro sýr neměla překročit hodnotu 900 mg/kg. Jestliže, se součet koncentrací testovaných biogenních aminů pohybuje nad 200 mg/kg, je již možné ho považovat za toxikologicky významné množství [39, 46].

U všech 15 vzorků byla stanovena přítomnost biogenních aminů. Biogenní aminy tyramin a spermin byly zjištěny u všech vzorků skupiny A (A1-A9). Koncentrace těchto biogenních aminů byla do < 100mg/kg, což je běžná koncentrace. Čtyři biogenní aminy tyramin, spermin, spermidin a putrescin byly detekovány u všech vzorků ze skupiny B (B1-B6). Putrescin a spermidin dosahovaly hodnot < 100mg/kg. Naproti tomu biogenní aminy tyramin a spermin tuto hodnotu přesahovaly. Koncentrace tyraminu u vzorku B2 byla stanovena

127,79±4,92 mg/kg a vzorku u B5 220,51±11,73 mg/kg. Hodnoty sperminu vyšší jak 100 mg/kg byly stanoveny u všech vzorků skupiny B (B1-B6). Tři biogenní aminy tryptamin, fenyletylamin a histamin nebyly detekovány v žádném z 15 zkoumaných vzorků. Putrescin byl u sýrů skupiny A stanoven ve všech vzorcích kromě A7. Všechny vzorky skupiny A (A1-A9) dosahovaly hodnot < 100 mg/kg, avšak u vzorku A8 byla zjištěna hodnota 117,52±7,46 mg/kg. Biogenní amin kadaverin byl detekován pouze u dvou vzorků. U vzorku B1 byla jeho koncentrace 10,17±0,46 mg/kg. Hodnota kadaverinu u vzorku A8 byla 311,13±9,75 mg/kg, což byla nejvyšší dosažená hodnota biogenního aminu. Takové množství může být považované za toxické, avšak kadaverin sám o sobě nepůsobí příliš toxicky, může zvyšovat nežádoucí toxické účinky dalších biogenních aminů především (histaminu a tyraminu), resp. může inhibovat detoxikační systém [46].

V této práci byly rovněž zhodnoceny hodnoty celkového obsahu biogenních aminů ve vzorcích sýrů s plísní na povrchu a s plísní uvnitř hmoty. Nižší koncentrace biogenních aminů byly zjištěny u skupiny sýrů s plísní na povrchu (s výjimkou testovaných vzorků sýrů A6 a A8). Celkový obsah biogenních aminů ve vzorku A9 dosáhl hodnoty 46,37 mg/kg. Nejvyšší koncentrace biogenních aminů bylo dosaženo právě u vzorku A8 (sýr s plísní na povrchu), kdy výsledný součet množství přítomných biogenních aminů dosáhl hodnoty 548,13 mg/kg. U skupiny sýrů s plísní v těstě bylo nejvyšší hodnoty dosaženo u vzorku B5 jehož hodnota činila 436,33 mg/kg.

U žádného z analyzovaných vzorků nebylo překročeno celkové množství biogenních aminů 900 mg/kg, které je považováno za toxikologicky významné i pro zdravé jedince [46]. Z toho můžeme usuzovat, že všech 15 vzorků nepředstavuje pro lidský organismus významnější zdravotní riziko.

ZÁVĚR

Bakalářská práce byla zaměřena na stanovení osmi biogenních aminů ve vybraných plísňových sýrech zakoupených v běžné obchodní síti v ČR.

Byly zjištěny výsledky, které můžeme následovně shrnout:

- Přítomnost biogenních aminů (BA) byla zjištěna u všech 15 testovaných sýrů.
- U jednotlivých vzorků byly zjištěny biogenní aminy putrescin, kadaverin, tyramin, spermidin a spermin.
- Biogenní aminy tryptamin, fenyletylamin a histamin nebyly detekovány v žádném z předložených vzorků sýrů.
- Tyramin a spermin byly stanoveny ve všech vzorcích.
- Maximální hodnota celkového počtu biogenních aminů byla detekována u skupiny sýrů s plísní na povrchu, kde koncentrace dosahovala hodnoty 548,13 mg/kg.
- Enterobakterie byly stanoveny pouze u tří vzorků z patnácti.
- Celkový počet mikroorganismů (CPM) byl nejvyšší u vzorku B5, jehož hodnota činila $3,5 \cdot 10^8$ KTJ/g.

Testované plísňové sýry nepředstavují významnější riziko pro konzumenty, neboť jejich výsledné koncentrace biogenních aminů nedosahovaly (s výjimkou jednoho vzorku) hodnot, které jsou považovány za toxikologicky významné.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] *Biogenní aminy a polyaminy v potravinách* [online]. [cit. 2013-05-12]. Dostupné z: <http://www.bezpecnostpotravin.cz/biogenni-aminy-a-polyaminy-v-potravinach.aspx>
- [2] *Obsah biogenních aminů v sýrech z české obchodní sítě* [online]. [cit. 2013-05-12]. Dostupné z: http://www.vetweb.cz/informace-z-oboru/hygiena-technologie/Obsah-biogennich-aminu-v-syrech-z-ceske-obchodni-site__s1496x53853.html
- [3] *Historie sýrů.* [online]. [cit. 2013-05-12]. Dostupné z: <http://www.povltavskemlekarny.cz/historie.html>.
- [4] *Malý průvodce francouzskými sýry* [online]. [cit. 2013-05-12]. Dostupné z: <http://www.ulozto.cz/x35thcT/maly-pruvodce-francouzskymi-syry-7z>
- [5] IBURG, Anne . *Lexikon sýrů: výroba, původ, druhy, chuť. 1. vyd. Čestlice: Rebo, 2004. ISBN 80-723-4379-3.*
- [6] JAN HRABĚ, Pavel Březina. *Technologie výroby potravin živočišného původu: bakalářský směr.* Vyd. 1. Zlín: Univerzita Tomáše Bati, 2006. ISBN 80-731-8405-2.
- [7]. *Vyhláška MZe č. 77/2003 Sb., kterou se stanoví požadavky pro mléko a mléčné výrobky, mražené krémy a jedlé tuky a oleje.* Sbírka zákonů: 2003, Částka 032,
- Vyhláška MZe č. 77/2003 Sb., kterou se stanoví požadavky pro mléko a mléčné výrobky, mražené krémy a jedlé tuky a oleje. *Sbírka zákonů.* 2003, Částka 032, s. 2488 – 2516.
- [8] FERNANDES, Edited by Rhea. *Flavouring in food - a legal perspective: international and global markets outside the European Union.* 3. ed. Leatherhead, UK: Leatherhead Food International, 2008. ISBN 978-190-5224-623.
- [9] TAMIME, Edited by Barry A. Law and A.Y. *Technology of cheesemaking: international and global markets outside the European Union.* 2nd ed. Malden, MA: Blackwell, 2010. ISBN 978-140-5182-980.
- [10] TAMIME, Edited by Barry A. Law and A.Y. *Cheese: chemistry, physics and microbiology.* 3rd ed. Editor Patrick F Fox. Amsterdam: Elsevier, 2004, xi, 617 s. ISBN 0-1226-3652-X1.

- [11] RIDGWAYOVÁ, Judy. *Sýry: průvodce světem sýrů*. 1. vyd. Praha: Fortuna Print, 2001. ISBN 80-861-4465-8.
- [12] *Základní informace o sýru hermelín*. [online]. [cit. 2013-05-12]. Dostupné z: <http://www.nakladany-hermelin.cz/o-hermelinu>.
- [13] GAJDŮŠEK, Stanislav. *Mlékařství II.: chemistry, physics and microbiology*. Vyd. 1. Editor Patrick F Fox. V Brně: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, 1998, 135 s. ISBN 80-715-7342-6.
- [14] *Základní specifikace sýru niva*. [online]. [cit. 2013-05-12]. Dostupné z: <http://www.syr-niva.cz/niva>.
- [15] *Cambozola*. [online]. [cit. 2013-05-12]. Dostupné z: <http://www.cambozola.de/produkte/cambozola-extra-cremig.php>
- [16] *Vltavín*. [online]. [cit. 2013-05-12]. Dostupné z: <http://www.sedlcansky.cz/kolik-pepu-znas/deli-sekce/>.
- [17] LAW, Barry A a A TAMIME. *Technology of cheesemaking*. 2nd ed. Malden, MA: Blackwell, 2010, xxv, 482 p. ISBN 978-140-5182-980.
- [18] AL], Patrick F. Fox ... [et]. *Fundamentals of cheese science*. Gaithersburg, MD: Aspen Pub, 2000. ISBN 08-342-1260-9.
- [19] KADLEC, MELZOCH, VOLDŘICH, Pavel, Karel, Michal. *Co by jste měli vědět o výrobě potravin? Technologie potravin*. 1. vyd. Ostrava-Přívoz: KEY PUBLISHING s.r.o., 2009. s. 534. ISBN 978-80-7418-060-6.
- [20] PROKŠ, Josef. *Mlékařství. Díl II*. 1.vyd. Praha: Státní nakladatelství technické literatury, 1965. 365 s.
- [21] EDITOR, Noble P a Robert Jenness ASSOCIATE EDITORS. *Fundamentals of dairy chemistry*. 3rd ed. Gaithersburg, MD: Aspen Pub, 1999. ISBN 08-342-1360-5.
- [22] TEPLÝ, Miloš. *Výroba sýrů, kaseinů a kaseinátů novinky v technice a technologii*. 1.vyd. Praha: Státní nakladatelství technické literatury, 1985. 185 s. Technika a technologie potravinářského průmyslu.

- [23] PROKŠ, Josef. *Mlékařství*. 1.vyd. Praha: Státní nakladatelství technické literatury, 1964. 222 s.
- [24] EDITOR, Y a Robert Jenness ASSOCIATE EDITORS. *Dairy science and technology handbook*. 3rd ed. New York, N.Y.: VCH, 1993. ISBN 15-608-1078-5.
- [25] BRITZ, T a R ROBINSON. *Advanced dairy science and technology*. Ames, Iowa: Blackwell Pub. Professional, 2008, xi, 300 p. ISBN 14-051-3618-9.
- [26] SMIT, Edited by Gerrit. *Dairy processing: improving quality*. 1st published. Boca Raton, Fla. : Cambridge: CRC Press ; Woodhead, 2003. ISBN 978-185-5736-764.
- [27] McSWEENEY, P. 2004. Biochemistry of cheese ripening. In *International Journal of Dairy Technology*, 57, 2004, roč. 2/3. s. 127-144.
- [28] SOUSA, M.J, Y ARDÖ a P.L.H MCSWEENEY. *Advances in the study of proteolysis during cheese ripening*. *International Dairy Journal*. 2001, vol. 11, 4-7, s. 327-345. DOI: 10.1016/S0958-6946(01)00062-0. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0958694601000620>.
- [29] MCSWEENEY, HAYALOGLU, O'MAHONY, BANSAL., P.L.H., A.A., J.A., N. *Perspectives on cheese ripening*. *Australian Journal of Dairy Technology*. 2006, s. 69-78.
- [30] FERNANDES, Edited by Rhea. *Flavouring in food - a legal perspective: international and global markets outside the European Union*. 3. ed. Leatherhead, UK: Leatherhead Food International, 2008. ISBN 978-190-5224-623.
- [31] KADLEC, Pavel. *Technologie potravin II*. 1. vyd. Praha: VŠCHT, 2002, 236 s. ISBN 80-708-0510-2.
- [32] TEPLÝ, Miloš. *Čisté mlékařské kultury: výroba, kontrola, použití*. 1.vyd. Praha: Státní nakladatelství technické literatury, 1984. 295 s.
- [33] JAY, James M. *Modern food microbiology*. 7th ed. New York: Springer, 2005, 790 s. ISBN 03-872-3180-3.
- [34] GÖRNER, Fridrich a Ľubomír VALÍK. *Aplikovaná mikrobiológia potravín: princípy mikrobiológie potravín, potravinársky významné mikroorganizmy a ich skupiny, mikrobi-*

lógia potravinárskych výrob, ochorenia mikrobiálneho povodu, ktorých zárodky sú prenášané požívateľmi. 1. vyd. Bratislava: Malé centrum, 2004, 528 s. ISBN 80-967-0649-7.

[35] BOUTROU, R. a M. GUÉGUEN. Interests in *Geotrichum candidum* for cheese technology. *International Journal of Food Microbiology*. 2005, vol. 102, issue 1, s. 1-20. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2004.12.028. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168160505000413>

[36] VELÍŠEK, Jan. *Chemie potravin*. Rozš. a přeprac. 3. vyd. Tábor: OSSIS, 2009, xxii, 580 s. ISBN 978-80-86659-17-6.

[37] ANLI, R. Ertan a Mustafa BAYRAM. Biogenic Amines in Wines. *Food Reviews International*. 2008-12-22, vol. 25, issue 1, s. 86-102. DOI: 10.1080/87559120802458552. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/87559120802458552>.

[38] *Biogenní aminy* [online]. [cit. 2013-05-12]. Dostupné z: <http://www.chempoint.cz/biogenni-aminy>.

[39] HALÁSZ, Anna, Ágnes BARÁTH, Livia SIMON-SARKADI a Wilhelm HOLZAPFEL. Biogenic amines and their production by microorganisms in food. *Trends in Food Science*. 1994, vol. 5, issue 2, s. 42-49. DOI: 10.1016/0924-2244(94)90070-1. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0924224494900701>.

[40] SANTOS, M.H.Silla. Biogenic amines: their importance in foods. *International Journal of Food Microbiology*. 1996, vol. 29, 2-3, s. 213-231. DOI: 10.1016/0168-1605(95)00032-1. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0168160595000321>.

[41] TEN BRINK, B., C. DAMINK, H.M.L.J. JOOSTEN a J.H.J. HUIS IN 'T VELD. Occurrence and formation of biologically active amines in foods: their importance in foods. *International Journal of Food Microbiology*. 1990, vol. 11, issue 1, s. 73-84. DOI: 10.1016/0168-1605(90)90040-C. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/016816059090040C>.

[42] ROMANO, Andrea, Hervé KLEBANOWSKI, Stéphane LA GUERCHE, Luciano BENEDEUCE, Giuseppe SPANO, Marie-Laure MURAT a Patrick LUCAS. Determination of biogenic amines in wine by thin-layer chromatography/densitometry. *Food Chemistry*.

2012, vol. 135, issue 3, s. 1392-1396. DOI: 10.1016/j.foodchem.2012.06.022. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814612009946>.

[43] LINARES, Daniel M., MaCruz MARTÍN, Victor LADERO, Miguel A. ALVAREZ a María FERNÁNDEZ. Biogenic Amines in Dairy Products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2011, vol. 51, issue 7, s. 691-703. DOI: 10.1080/10408398.2011.582813. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10408398.2011.582813>.

[44] NOVELLA-RODRIGUEZ, S., M.T. VECIANA-NOGUES, M. IZQUIERDO-PULIDO a M.C. VIDAL-CAROU. Distribution of Biogenic Amines and Polyamines in Cheese. *Journal of Food Science*. 2003, vol. 68, issue 3, s. 750-756. DOI: 10.1111/j.1365-2621.2003.tb08236.x. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2621.2003.tb08236.x>.

[45] ABANELLI, Giulia, Chiara MONTANARI, Luigi GRAZIA, Rosalba LANCIOTTI a Fausto GARDINI. Effects of aw at packaging time and atmosphere composition on aroma profile, biogenic amine content and microbiological features of dry fermented sausages. *Meat Science*. 2013, vol. 94, issue 2, s. 177-186. DOI: 10.1016/j.meatsci.2013.01.018. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0309174013000429>.

[46] SHALABY, Ali R. Significance of biogenic amines to food safety and human health. *Food Research International*. 1996, vol. 29, issue 7, s. 675-690. DOI: 10.1016/S0963-9969(96)00066-X. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S096399699600066X>.

[47] ČSN EN ISO 6887. *Mikrobiologie potravin a krmiv - Úprava analytických vzorků, příprava výchozí suspenze a desetinasobných ředění - Část 1: Všeobecné pokyny pro přípravu výchozí suspenze a desetinasobných ředění*. 1999. [online]. [cit. 2013-05-12]. Dostupné z: <http://shop.normy.biz/detail/56926>

[48] EN ISO 6887-1:1999. *Microbiology of food and animal feeding stuffs -- Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination -- Part 1: General rules for the preparation of the initial suspension and decimal dilutions*. 1999. [online]. [cit. 2013-05-12]. Dostupné z: http://www.iso.org/iso/home/store/catalogue_tc/catalogue_detail.htm?csnumber=26850

[49] BUŇKOVÁ, Leona, Gabriela ADAMCOVÁ, Kateřina HUDCOVÁ, Helena VELICHOVÁ, Vendula PACHLOVÁ, Eva LORENCOVÁ a František BUŇKA. Monitoring of biogenic amines in cheeses manufactured at small-scale farms and in fermented dairy products in the Czech Republic. *Food Chemistry*. vol.141, s. 548-551. 2013 Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814613003397>.

[50] LORENCOVÁ, Eva, Leona BUŇKOVÁ, Dagmar MATOULKOVÁ, Vladimír DRÁB, Pavel PLEVA, Vlastimil KUBÁŇ a František BUŇKA. Production of biogenic amines by lactic acid bacteria and bifidobacteria isolated from dairy products and beer. *International Journal of Food Science*. 2012, vol. 47, issue 10, s. 2086-2091. DOI: 10.1111/j.1365-2621.2012.03074.x. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2621.2012.03074.x>.

[51] PLEVA, Pavel, Leona BUŇKOVÁ, Andrea LAUKOVÁ, Eva LORENCOVÁ, Vlastimil KUBÁŇ a František BUŇKA. Decarboxylation activity of enterococci isolated from rabbit meat and staphylococci isolated from trout intestines. *Veterinary Microbiology*. 2012, vol. 159, 3-4, s. 438-442. DOI: 10.1016/j.vetmic.2012.04.028. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378113512002775>.

[52] SMĚLÁ, D., PECHOVÁ, P., KOMPRDA, T., KLEJDUS, B., KUBÁŇ, V. Chromatografické stanovení biogenních aminů v trvanlivých salámech během fermentace a skladování. *Chemické listy*. 2004, Vol. 98, No. 7, 432-437 s. ISSN 0009-2770.

[53] PLEVA, Pavel, Leona BUŇKOVÁ, Andrea LAUKOVÁ, Eva LORENCOVÁ, Vlastimil KUBÁŇ a František BUŇKA. FACTORS AFFECTED DECARBOXYLATION ACTIVITY OF ENTEROCOCCUS FAECIUM ISOLATED FROM RABBIT. *Potravinářstvo*. 2012-04-01, vol. 6, issue 2, s. -. DOI: 10.5219/182. Dostupné z: <http://www.potravinarstvo.com/journal1/index.php/potravinarstvo/article/view/182>.

[54] BUŇKOVÁ, Leona, František BUŇKA, Pavlína KLČOVSKÁ, Vladimír MRKVIČKA, Magda DOLEŽALOVÁ a Stanislav KRÁČMAR. Formation of biogenic amines by Gram-negative bacteria isolated from poultry skin. *Food Chemistry*. 2010, vol. 121, issue 1, s. 203-206. DOI: 10.1016/j.foodchem.2009.12.012. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814609014113>.

[55] BUŇKOVÁ, Leona, František BUŇKA, Michaela HLOBILOVÁ, Zuzana VAŇÁTKOVÁ, Dana NOVÁKOVÁ a Vladimír DRÁB. Tyramine production of technolo-

gical important strains of Lactobacillus, Lactococcus and Streptococcus. *European Food Research and Technology*. 2009, vol. 229, issue 3, s. 533-538. DOI: 10.1007/s00217-009-1075-3. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00217-009-1075-3>.

[56] LORENCOVÁ, Eva, Leona BUŇKOVÁ, Dagmar MATOULKOVÁ, Vladimír DRÁB, Pavel PLEVA, Vlastimil KUBÁŇ a František BUŇKA. Production of biogenic amines by lactic acid bacteria and bifidobacteria isolated from dairy products and beer. *International Journal of Food Science*. 2012, vol. 47, issue 10, s. 2086-2091. DOI: 10.1111/j.1365-2621.2012.03074.x. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2621.2012.03074.x>

[57] BUŇKOVÁ, Leona, František BUŇKA, Gabriela MANTLOVÁ, Andrea ČABLOVÁ, Ivo SEDLÁČEK, Pavel ŠVEC, Vendula PACHLOVÁ a Stanislav KRÁČMAR. The effect of ripening and storage conditions on the distribution of tyramine, putrescine and cadaverine in Edam-cheese. *Food Microbiology*. 2010, vol. 27, issue 7, s. 880-888. DOI: 10.1016/j.fm.2010.04.014. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0740002010000882>

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

HPL	Vysokoučinná kapalinová chromatografie
CPM	Celkový počet mikroorganismů
ČMK	Čisté mlékařské kultury
PCA	Plate Count Agar
EA	Endův Agar
SB	Slanetz–Bartley Agar
M17	M17 Agar
MRS	De Man Rogosa Sharpe Agar
CHYGA	Agar s glukózou, kvasničným extraktem a chloramfenikolem
MO	Mikroorganismus
BA	Biogenní amin
t.v.s.	Tuk v sušině

SEZNAM OBRÁZKŮ

<i>Obrázek 1: Tryptamin</i>	20
<i>Obrázek 2: Kadaverin</i>	21
<i>Obrázek 3: Putrescin</i>	21
<i>Obrázek 4: Tyramin</i>	21
<i>Obrázek 5: Histamin</i>	21

SEZNAM TABULEK

<i>Tabulka 1: Časový harmonogram při zpracování syřeniny na výrobu sýrů [6].....</i>	13
<i>Tabulka 2: Významné mikroorganismy v sýrech produkující biogenní aminy</i>	21
<i>Tabulka 3: Charakteristika analyzovaných vzorků sýrů.....</i>	25
<i>Tabulka 4: Kultivační půdy a typ stanovovaného mikroorganismu.....</i>	26
<i>Tabulka 5: Počet misek jednotlivých ředění pro konkrétní vzorky</i>	29
<i>Tabulka 6: Inkubační podmínky pro jednotlivé kultivační půdy.....</i>	30
<i>Tabulka 7: Výsledky počtu mikroorganismů ve vzorcích sýrů skupiny A.....</i>	34
<i>Tabulka 8: Výsledky počtu mikroorganismů ve vzorcích skupiny B</i>	35
<i>Tabulka 9: Obsah putrescinu, kadaverinu, tyraminu, spermidinu a sperminu v sýrech s plísní na povrchu (skupina A, vzorky 1-9)</i>	36
<i>Tabulka 10: Obsah putrescinu, kadaverinu, tyraminu, spermidinu a sperminu v sýrech s plísní v těstě (skupina B, vzorky 1 – 6)</i>	37
<i>Tabulka 11: Celkový obsah biogenních aminů v mg/kg v sýrech s plísní na povrchu (skupina A) a sýrech s plísní uvnitř hmoty (skupina B).....</i>	38

SEZNAM PŘÍLOH