

Vliv přídavku vybraných dekarboxyláza-pozitivních zákysových bakterií mléčného kvašení na jakostní parametry modelových přírodních sýrů

Bc. Kristýna Glawatá

Diplomová práce
2014



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení:	Bc. Kristýna Glawatá
Osobní číslo:	T12825
Studijní program:	N2901 Chemie a technologie potravin
Studijní obor:	Technologie, hygiena a ekonomika výroby potravin
Forma studia:	prezenční
Téma práce:	Vliv přídavku vybraných dekarboxyláza pozitivních zákyskových BMK na jakostní parametry modelových přírodních sýrů

Zásady pro vypracování:

I. Teoretická část

1. Charakterizujte sýry holandského typu a jejich výrobu.
2. Popište vývoj biogenních aminů v procesu zrání.
3. Stručně charakterizujte zákyskové mikroorganismy při výrobě sýrů holandského typu.

II. Praktická část

1. Založte experiment na vyrobených vzorcích přírodních sýrů s přídavkem dekarboxyláza pozitivního kmene bakterií mléčného kvašení a také s kontrolním vzorkem bez přídavku tohoto kmene.
2. Během zrajeho procesu pozorujte změny v obsahu biogenních aminů a jejich vliv na vybrané parametry přírodních sýrů.
3. Vyhodnoťte výsledky, formulujte závěry.

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

Forma zpracování diplomové práce: tištěná/elektronická

Seznam odborné literatury:

- [1] FOX, P.F. Fundamentals of cheese science. Gaithersburg: Aspen Publishers, 2000. ISBN 0-8342-1260-9.
- [2] FOX, P.F.; McSWEENEY, P.; COGAN, T.M.; GUINEE, T.P. Cheese major cheese groups, volume 2. 3rd ed. Academic press, 2004. ISBN 978-0-1226-3653-0.
- [3] HALÁSZ, A.; BARÁTH, Á.; SIMON-SARKADI, L.; HOLZAPFEL, W. Biogenic amines and their production by microorganism in food. Trends in Food Science & Technology, 1994, 5 (2), 42-49.
- [4] PACHLOVÁ, V., BUŇKA, F., BUŇKOVÁ, L., WEISEROVÁ, E., BUDINSKÝ, P., ŽALUDEK, M., KRÁČMAR, S. The effect of three different ripening/storage conditions on the distribution of selected parameters in individual parts of Dutch-type cheese. International Journal of Food Science and Technology, 2011, 46, 101-108.
- [5] ROGINSKI, H.; FUQUAY, J.W.; FOX, P.F. Encyclopedia of dairy sciences. London: Academic press, 2002. ISBN 0-12-227235-3.
- [6] McSWEENEY, P. L. H., HAYALOGLU, A. A., O'MAHONY, J. A., BANSAL, M. Perspectives on cheese ripening. Australian Journal of Dairy Technology. 2006, č. 61, s. 69-77.

Vecoucí diplomové práce: doc. Ing. František Buňka, Ph.D.
Ústav technologie potravin

Datum zadání diplomové práce: 10. ledna 2014

Termín odevzdání diplomové práce: 25. dubna 2014

Ve Zlíně dne 3. února 2014


doc. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
ařka




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

Příjmení a jméno: Bc. Kristýna Glawatá

Obor: Technologie, hygiena a ekonomika výroby potravin

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 24.4.2014

.....


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 nevdálečně 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 vzdělávacímu zařízení (školní dílo).

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

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

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

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

ABSTRAKT

Cílem této diplomové práce bylo sledování vlivu *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* na jakost sýrů holandského typu. V rámci pokusu byly vyrobeny sýry s přídavkem dekarboxyláza-pozitivního kmene a v jednotlivých analýzách srovnávány se sýry vyrobenými za použití komerční smetanové kultury. Sýry pak byly po dobu 3. měsíců skladovány při teplotě $10 \pm 2^\circ\text{C}$. Vzorby byly 1. den, poté 1., 2 a 3. měsíc zrání podrobeny základní chemické, texturní, mikrobiologické, senzoričké analýza a analýze obsahu biogenních aminů metodou HPLC.

Analýzy prokázaly tvorbu biogenních aminů v podstatně vyšších koncentracích ve výrobě s přídavkem dekarboxyláza-pozitivního kmene. Nejvíce zastoupeným biogenním aminem byl tyramin v koncentraci přesahující 600 mg/kg. Významné změny vyvolané přítomností biogenních aminů v sýrech nebyly ve sledovaných jakostních parametrech prokázány.

Klíčová slova: biogenní aminy, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, zrání sýrů holandského typu

ABSTRACT

The aim of this thesis was to investigate the influence of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* on the quality of Dutch-type cheese. In the framework of our attempt, were produced cheeses with addition of decarboxylase-positive strain and were compared with the cheeses produced by using commercial cream culture, at the individual analyzes. After that, cheeses were stored over than 3 months at $10 \pm 2^\circ\text{C}$. Samples were subjected to basic chemical, textural, microbiological, sensorial analysis and analysis of the content of biogenic amines by HPLC at the first day and then 1st, 2nd and 3rd month during its own ripening.

Analysis showed the formation of biogenic amines in significantly higher concentrations in production with the addition of decarboxylase-positive strain. The most represented biogenic amine was tyramine at a concentration exceeding 600 mg / kg. Significant changes induced by the presence of biogenic amines in cheese were not detected at the quality parameters.

Keywords: biogenic amines, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, ripening of Dutch type cheese

Zde je místo k vyjádření díky všem, kteří se podíleli na vzniku této práce. Chtěla bych poděkovat vedoucímu práce doc. Ing. Františkovi Buňkovi, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady a připomínky, zejména pak trpělivost a čas, které mi věnoval při vytváření práce. Další poděkování patří Ing. Radce Flasarové za pomoc při zpracování praktické části této práce a její ochotu a čas věnované konzultacím. Chci poděkovat také Ing. Adrianě Válkové, Ing. Ludmile Zálešákové, Bc. Veronice Kučabové a Lence Machákové za odbornou spolupráci v laboratoři. Mé díky náleží také rodině, přátelům a blízkým, kteří mě po celou dobu studia morálně podporovali.

Motto:

„Zdraví, sílu najdeš v sýru.“

Autor neznámý

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

Ve Zlíně 24. 4. 2014

OBSAH

ÚVOD	10
I TEORETICKÁ ČÁST	11
1 SÝRY HOLANDESKÉHO TYPU	12
1.1 PRINCIP VÝROBY SÝRŮ HOLANDESKÉHO TYPU	14
1.2 ZRÁNÍ SÝRŮ.....	17
1.2.1 Rozklad laktózy bakteriemi mléčného kvašení za vzniku kyseliny mléčné	18
1.2.2 Proteolýza a reakce volných aminokyselin	20
1.2.3 Lipolýza a reakce mastných kyselin	21
2 BIOGENNÍ AMINY	23
2.1 DĚLENÍ BIOGENNÍCH AMINŮ	23
2.2 VZNIK BIOGENNÍCH AMINŮ.....	24
2.2.1 Podmínky vzniku biogenních aminů.....	28
2.3 VÝSKYT BIOGENNÍCH AMINŮ.....	29
2.3.1 Fermentované potraviny.....	30
2.3.2 Nefermentované potraviny	32
2.4 BIOGENNÍ AMINY V LIDSKÉM ORGANIZMU.....	33
2.4.1 Účinky histaminu	34
2.4.2 Účinky tyraminu.....	35
3 ZÁKYSOVÉ KULTURY SÝRŮ HOLANDESKÉHO TYPU	36
II PRAKTICKÁ ČÁST	38
4 CÍL PRÁCE	39
Cílem teoretické části této diplomové práce bylo:	39
5 MATERIÁL A METODIKA	40
5.1 CHARAKTERISTIKA VZORKŮ	40
5.2 VÝROBA SÝRŮ.....	41
5.3 ZÁKLADNÍ CHEMICKÁ ANALÝZA.....	42
5.4 TEXTURNÍ PROFILOVÁ ANALÝZA	42
5.5 EXTRAKCE A STANOVENÍ BIOGENNÍCH AMINŮ.....	42
5.6 MIKROBIOLOGICKÁ ANALÝZA	43
5.7 SENZORICKÁ ANALÝZA	44
6 VÝSLEDKY A DISKUZE	46

6.1	ZÁKLADNÍ CHEMICKÁ ANALÝZA.....	46
6.2	TEXTURNÍ PROFILOVÁ ANALÝZA	50
6.3	EXTRAKCE A STANOVENÍ BIOGENNÍCH AMINŮ	54
6.4	MIKROBIOLOGICKÁ ANALÝZA	58
6.4.1	Výsledky stanovení počtu mléčných koků	58
6.4.2	Výsledky stanovení počtu bakterií rostoucích na MRS agaru.....	61
6.4.3	Výsledky stanovení počtu enterokoků.....	63
6.4.4	Výsledky stanovení počtu koliformních MO	64
6.4.5	Výsledky stanovení celkového počtu mikroorganismů	66
6.5	SENZORICKÁ ANALÝZA	67
6.6	SOUHRNNÁ DISKUZE.....	68
	ZÁVĚR	72
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	73
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	81
	SEZNAM OBRÁZKŮ	82
	SEZNAM TABULEK.....	83
	SEZNAM GRAFŮ	84
	SEZNAM PŘÍLOH.....	86

ÚVOD

Sýr je spotřebiteli vyhledávanou potravinou už od středověku. Společně s kořením byl dlouho používán jako přísada do jídel. Dnes je sýr podáván samostatně nebo tvoří hlavní složku při přípravě sýrových specialit. K získání požadovaných vlastností sýra je důležité dodržet reologické, fyzikálně - chemické, organoleptické a mikrobiologické aspekty výroby. Spotřeba sýrů v ČR v roce 2012 byla 13,4 kg/osobu, z toho 11,2 kg/osobu tvořily sýry přírodní. Pomalu se tedy ČR v konzumaci sýrů přibližuje evropskému průměru. Spotřebiteli nejvyhledávanější skupinou přírodních sýrů jsou sýry holandského typu. Českým zástupcem je velmi oblíbený Eidam, ve světě pak Edam a Gouda [1, 2].

Sýr je zdrojem nutričně významných látek. Během zrání sýrů se z nich vytváří řada specifických sloučenin, které přispívají ke vzniku charakteristických vlastností výsledného produktu. Doba zrání závisí na druhu sýra, pohybuje se v řádu týdnů, v některých případech probíhá i několik let. Přeměna živin v aromatické látky je podpořena aktivitou enzymů, které mohou pocházet z mléka nebo z přítomné mikroflóry. Dominující skupinou mikroorganismů v sýrech na počátku zrání jsou bakterie mléčného kvašení (BMK). Tyto bakterie jsou komerčně používané v mléčném průmyslu, přičemž se záměrně přidávají do mléka, kde fermentují mléčný cukr – laktózu za vzniku kyseliny mléčné. Bývají proto často označovány jako starterové nebo zákysové BMK. Přítomná mikroflóra v mléce postupně odumírá v závislosti na podmínkách prostředí, čímž dochází k uvolnění enzymů (peptidáz), a ty pak spolu s enzymy syřidla hydrolyzují peptidy na volné aminokyseliny, které slouží jako prekurzory chuťových látek v sýru. Z volných aminokyselin mohou působením některých dekarboxyláza–pozitivních mikroorganismů vznikat biogenní aminy (BA). Tyto biologicky aktivní látky mají v určitém množství negativní účinek pro konzumenta, proto je vliv BA na lidský organizmus předmětem mnoha studií [2]. Stejně tak se i tato práce zabývá biogenními aminy avšak z hlediska vlivu na organoleptické, texturní a mikrobiologické vlastnosti sýra s přídavkem dekarboxyláza–pozitivního kmene. Teoretická část práce je zaměřena na obecný popis výroby sýrů holandského typu, dělení, reakce a vliv biogenních aminů na organizmus a stručně charakterizuje zákysové mikroorganismy. Praktická část pak porovnává vliv přídavku dekarboxyláza–pozitivního kmene na jakost vyrobených sýrů.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 SÝRY HOLANDSKÉHO TYPU

Nabídka mléčných výrobků na trhu je velice rozmanitá. Spotřebitel si proto může vybrat z širokého sortimentu sýrů různých druhů lišících se především charakterem chuti a vůně a také texturními vlastnostmi. Sýr je jednou z nejstarších potravin lidstva s vysokou výživovou hodnotou. První zmínka o sýru jako potravině pochází z 6 – 7 tis. let př. n. l. Podle posledních průzkumů je na světě známo přibližně 500 druhů. V ČR poptávka po sýrech rok od roku stoupá a přibližuje se tak průměrné spotřebě sýrů v Evropské unii, kde se v roce 2013 pohybovala okolo 17 kg/osoba/rok. Z dlouhodobějšího hlediska český konzument nakupuje zejména polotvrdé sýry holandského typu, kam patří gouda a eidam [2 - 7]. Spotřeba sýrů v ČR od roku 1992 do 2012 v kg na obyvatele je uvedena v Tabulce 1.

Tabulka 1 – Vývoj spotřeby sýrů v ČR za roky 1992 – 2012 [8].

Rok	Sýry celkem [kg/osobu]	Tavené sýry [kg/osobu]	Přírodní sýry [kg/osobu]			
			celkem	tvrdé	měkké	plísňové
1992	6,8	2,0	4,6	3,1	1,1	0,4
1993	6,1	1,9	3,8	2,6	0,9	0,3
1994	6,6	2,0	4,4	2,9	1,1	0,4
1995	6,5	1,8	4,5	2,9	1,1	0,5
1996	8,4	2,3	5,9	3,7	1,5	0,7
1997	8,6	2,4	6,0	3,8	1,4	0,8
1998	8,8	2,5	6,1	3,9	1,4	0,8
1999	9,3	2,5	6,6	4,2	1,4	1,0
2000	10,5	2,9	7,4	4,7	1,6	1,1
2001	10,2	2,9	7,2	4,5	1,5	1,2
2002	10,6	2,6	7,9	5,0	1,7	1,2
2003	11,3	2,6	8,7	5,4	2,0	1,3
2004	12,0	2,6	9,4	5,7	2,1	1,6
2005	12,5	2,4	10,0	6,0	2,4	1,6
2006	13,4	2,6	10,8	6,6	2,6	1,6
2007	13,7	2,6	11,1	6,8	2,7	1,6
2008	12,9	2,4	10,5	6,6	2,3	1,6
2009	13,3	2,4	10,9	6,8	2,4	1,7
2010	13,2	2,1	11,1	6,6	2,7	1,8
2011	13,0	2,1	10,9	-*	-*	-*
2012	13,4	2,2	11,2	-*	-*	-*

* hodnoty nejsou zveřejněny

Dle vyhlášky č. 77/2003 Sb. ze dne 6. března 2003 (v platném znění), je sýr mléčný výrobek vyrobený vysrážením mléčné bílkoviny z mléka působením syřidla nebo jiných vhodných koagulačních činidel, prokysáním a oddělením podílu syrovátky [4].

Sýry holandského typu patřící do skupiny přírodních sýrů řadíme dle vyhlášky č. 77/2003 Sb. ve vztahu k obsahu vody do kategorie polotvrdých a tvrdých sýrů. Tento vztah můžeme určit pomocí vzorce:

$$\text{voda v tukuprosté hmotě sýra} = \frac{g \text{ vody}}{100 - g \text{ tuku}} \cdot 100$$

Dle obsahu tuku je můžeme dále rozdělit na vysokotučné (více než 60 % tuku v sušíně), plnotučné (45 – 60 % t.v.s.), polotučné (25 – 45 % t.v.s.), nízkotučné (10 – 25 % t.v.s.) a odtučněné (méně než 10 % t.v.s.). Eidam se řadí mezi polotvrdé sýry ve vztahu k obsahu vody a dle obsahu tuku spadá do kategorie plnotučných sýrů obvykle s obsahem tuku v sušíně kolem 50 % [4].

Mezi nejznámější zástupce sýrů holandského typu patří gouda a eidam. Goudou rozumíme polotvrdý sýr, který je typický svou pevnou konzistencí, plnou a pikantní chutí. Zráním dochází k nárůstu jeho tvrdosti a zintenzivnění chuti. Název je odvozen od města nedaleko Rotterdamu, kde se již dlouhou dobu vyrábí. Asi 50% produkce sýrů v Nizozemsku tvoří právě gouda. Dalším významným zástupcem polotvrdých sýrů je eidam. Tento sýr pochází taktéž z Nizozemska, kde je známý pod názvem Edam podle stejnojmenného města ležícího u Amsterdamu. V ČR se stejným způsobem vyrábí sýr nazývaný Eidam, který lze na trhu nalézt ve více variantách dle obsahu tuku v sušíně (20 %, 30 %, 40 % či 45 %). Chuť Eidamu je velmi jemná a mírně slaná. Výrobní postup holandského Edamu a českého Eidamu je principiálně stejný, avšak Nizozemci s úmyslem chránit dobré jméno Edamu zažádali o ochranu zeměpisného označení. Po sedmiletém sporu o název získalo Nizozemsko v roce 2010 ochrannou známku s názvem Holland Edam, která zajišťuje jak přesný technologický postup, tak jakost a původ surovin [9, 10].

Hlavní surovinou pro výrobu sýru je mléko. Výtěžnost mléka souvisí s jeho neporušenou kysací schopností a syřitelností. Velký vliv na výtěžnost má chemické složení, zejména obsah kaseinu a nutná je také rovnováha vápenatých iontů. Mléko se vyznačuje vysokou výživovou hodnotou a slabě kyselým pH. Díky těmto parametrům je mléko vhodným substrátem pro růst nežádoucích mikroorganismů. Přestože je sýr, jakožto mléčný výrobek, stejně výživnou potravinou, bývá považován za relativně bezpečný z hlediska mikrobiologického. Během výrobního procesu jsou suroviny pro výrobu sýrů podrobeny

takovým operacím, které zajistí jak získání požadovaných vlastností, tak i zdravotní nezávadnost za předpokladu použití metod správné výrobní praxe (SVP) a správné hygienické praxe (SHP). Mortimore and Wallace [11] tvrdí, že došlo-li by k alimentární infekci způsobené konzumací sýra, jednalo by se z 72% o sýr vyrobený ze syrového mléka. Sýr vyrobený z tepelně neošetřeného mléka může mít za následek jak již zmíněný negativní dopad na zdraví konzumenta, tak i přítomnost nežádoucí mikroflóry způsobující sensorické vady výrobku. Možnými příčinami výskytu patogenů jsou převážně špatná hygiena v provozu, nízká aktivita kyslíkových kultur či nedostatečná pasterace mléka [11,12].

1.1 Princip výroby sýrů holandského typu

Výroba sýrů se u jednotlivých typů liší, společným znakem však zůstává stěžejní surovina, mléko. Jednotlivé kroky výroby jsou pro každý typ upraveny tak, aby co nejlépe odpovídaly výsledným požadovaným vlastnostem konečného produktu. Výsledný produkt je do značné míry ovlivněn složením mléka z hlediska obsahu bílkovin, tuku a vápníku. Tyto faktory závisí na druhu a plemeni zvířete, jeho stáří, výživovém stavu a v neposlední řadě také stádiu laktace. Z důvodu eliminace vzniku cizích příchutí v sýru nesmí mléko obsahovat chemické látky včetně antibiotik, která v konečném důsledku inhibují růst bakteriálních kultur potřebných pro zdárný výrobní proces [13].

Vápenaté ionty hrají důležitou roli při srážení mléka, proto se při výrobě přidávají ve formě CaCl_2 pro správný proces sýření a následnému vzniku koagulátu. S vyšší koncentrací přidaných vápenatých iontů se srážecí proces urychluje. Je nezbytně nutné mléku vápenaté ionty dodávat zejména také z důvodu ztrát, ke kterým dochází během tepelného ošetření. Záhřevem totiž reaguje převážná část vápenatých iontů za vzniku koloidního fosforečnanu vápenatého a jejich koncentrace pak nepostačí na tvorbu sýřeniny. Dalším důležitým parametrem při sýření je hodnota pH. Před samotným procesem je nutné snížit hodnotu pH přidáním kyselé kultury. Nižší hodnota pH je potřebná k urychlení procesu sýření. Snížení hodnoty pH k izoelektrickému bodu kaseinu totiž podporuje srážení micel a napomáhá k vytvoření gelu [3, 13].

Barva je důležitým atributem potravin a slouží jako indikátor kvality. Barva mléka je ovlivněna převážně množstvím karotenoidů ve stravě zvířete. Tyto látky však zvířata nedokážou syntetizovat, ale získávají je přímo z rostlinných materiálů obsažených v krmivu. Skotu se karotenoidy ukládají v tukové tkáni a následně i v mléce, a mění tak jeho barvu na

žlutavou, kdežto u např. koz, ovcí či buvolů k tomuto jevu nedochází. Sýry vyrobené z kozího, ovčího či buvolího mléka jsou proto v porovnání s výrobky z mléka skotu mnohem bělejší. Nažloutlá barva výrobků z kravského mléka z nich může dělat méně přijatelnou variantu, než produkty z ovčího, kozího nebo buvolího mléka, zvláště v zemích kolem Středozemního moře [14].

Při přejímce mléka je jeho hodnota pH vyšší než tomu bylo před lety. Je to dáno zlepšením hygieny při dojení a propracovanějším způsobem uchování mléka za stabilních podmínek. Hodnota pH mléka je zpravidla 6,6, přičemž ke zvyšování hodnoty dochází během skladování mléka vlivem uvolnění CO_2 do atmosféry nebo také při mastitidě. Toto zvýšení však není nijak markantní [3,13].

Úprava mléka před použitím spočívá nejprve v odstranění nečistot vzniklých během přepravy za pomoci filtrace. K separaci hrubých nečistot se používají filtry zabudované přímo v potrubí pro přívod mléka. Pro dokonalejší vyčištění se využívají samoodkalovací odsmetaňovací odstředivky, které v důsledku působení odstředivé síly odstraňují nečistoty na základě jejich vyšší hustoty. Za použití bubnových odstředivek pak získáme odstředěné mléko a smetanu. Pro získání mléčného výrobku o určité tučnosti je potřeba provést standardizaci mléka, která spočívá ve smísení odstředěného mléka a smetany v určitém poměru. Poté se provádí tepelné ošetření mléka – pasterace, která však nemusí být vždy součástí. Existují sýry, vyráběné ze syrového mléka, u kterých je pak nutná zvýšená pozornost z hlediska mikrobiologického. Cílem pasterace je tedy zajistit zdravotní nezávadnost výrobku, deaktivovat enzymy a prodloužit trvanlivost mléka. V případě, kdy je ve výrobním postupu sýrů holandského typu pasterace uvedena, používá se pasterace šetrná. Provádí se po dobu 15 – 30s při teplotě 72 – 75°C. Použití jiné než šetrné pasterace je nežádoucí z hlediska technologického, kdy dochází ke zvýšení podílu sérových bílkovin a rozsáhlejšími změnám sensorických (vařivá příchut') a funkčních vlastností (sýřitelnost mléka, termostabilita a kysací schopnost). Po pasteraci mléko zchladíme na sýřicí teplotu 28 – 33°C. Proces sýření podpoříme přidávkem CaCl_2 . Optimální množství je 10 – 40 ml nasyceného roztoku/100 l mléka. Přidáním vyššího množství roztoku se zvýší hořkost výsledného produktu. K zabránění nežádoucímu účinku mikroorganismů, které zapříčiňují tzv. duření sýrů, lze předejít použitím KNO_3 v množství 3 – 30 g / 100 l mléka. Alternativou pro použití KNO_3 může být enzym např. lysozym. Nevýhodou použití lysozymu je inhibiční účinek na některé bakterie mléčného kvašení (BMK), proto je v tomto případě nutné použít rezistentní kmeny. Před samotným sýřením je nutné sýry nechat mírně prokysat přidávkem

čistých mlékařských kultur. Mléko se tedy očkuje mezofilní smetanovou kulturou zastoupenou především *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* a *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* v množství 0,01 – 0,05 % a ponechá se do dalšího dne ve zracím tanku. K tomuto prokysání tedy slouží výše zmíněné primární kultury, které zahajují svou biochemickou aktivitu ještě před koagulací mléka a jejich úkolem je prokysání jak mléka, tak i sýřeniny. Mezi sekundární (tzv. doplňkové) kultury u sýrů holandského typu můžeme zařadit rod *Lactobacillus*, konkrétně tedy *Lactobacillus casei*. Použití těchto kultur je potřebné z důvodu jejich proteolytické činnosti, vytváří charakteristické aroma sýra a odpovídají za tvorbu ok, jsou-li žádoucí. Inokulace mléka napomáhá k obnovení fyzikálně chemických a mikrobiologických vlastností, které ztratilo během tepelného ošetření. Takto upravená surovina je tedy připravena k sýření [7,13,15-19].

Průběh sýření je závislý na množství syřidla, teplotě a času. Nastává po přidavku určitého množství syřidla, které se volí v závislosti na požadované době sýření, u polotvrdých a tvrdých sýrů je to 20 – 35 minut při teplotě mléka 31 – 32°C. Při výrobě sýrů holandského typu využíváme sýření enzymatické, kdy použitím chymozinu či jiného koagulačního enzymu dochází k rychlému srážení mléka a tvorbě sýřeniny. Reakce spočívá v enzymatickém štěpení κ -kaseinu stabilizujícího kaseinové micely a následném srážení micel destabilizovaných při štěpení. Doba sýření však nesmí překročit časový interval 50 minut, kdy pak nastává terciální fáze enzymatického srážení, ve které dochází k rozsáhlé hydrolyze α - a β -kaseinů chymozinem vedoucí k nežádoucím změnám jako jsou snížení výtěžnosti nebo vzniku chuťových vad. Po uplynutí dané doby sýření je nutné vzniklou sýřeninu pokrátet a pomalu promíchat pro podporu synereze. Vzniklá sýrařská zrna by v konečném důsledku měly mít velikost hrášku. Po odstranění 20 až 30 % syrovátky a připuštění 50 až 70 % technologické vody lze vzniklá zrna dohřívát pomocí tzv. prací vody o teplotě 70 – 90°C v případě nízkodohříváných sýrů. Principem je nahrazení podílu syrovátky horkou vodou, kdy dojde ke zvýšení teploty sýřeniny a tím ke snížení obsahu rozpustných látek, zejména laktózy. Po dosažení teploty sýřeniny 36 – 42°C, nastává dosoušení, což je vytužování sýřeniny v syrovátce po dobu 20 – 30 minut. Účelem je dosažení požadovaného obsahu sušiny. Po dosoušení se sýrařská zrna vypouští do forem, kde za současného odkapu syrovátky a lisování získávají finální tvar a velikost [17,18,20].

Další technologickou operací je solení sýrů, které produktu dodává chuť, zlepšuje konzistenci, napomáhá odvodu dalšího podílu syrovátky, reguluje mikrobiologické procesy

a potlačuje činnost nežádoucích mikroorganismů. Obsah NaCl v polotvrdých a tvrdých sýrech by se měl pohybovat mezi 2,0 – 2,5 %. Solení se provádí v solné lázni, kde hrají důležitou roli parametry, jako jsou koncentrace NaCl, pH a teplota. Solí se dnes obvykle jednotepelným způsobem za účasti solné lázně s teplotou 12 – 22°C a koncentrací 18 – 22% NaCl [20].

Po vysolení se sýry nechají pár hodin oschnout a poté se voskují nebo balí do zracích obalů. Zabalené sýry jsou vloženy do polic či zracích beden a připraveny na zrání [20].

1.2 Zrání sýrů

Během zrání nastávají mikrobiologické a biochemické změny katalyzované přítomností enzymů. Mléko obsahuje enzymy jak endogenní, tak exogenní vznikající činností mikroorganismů či účinkem působení syřidla. Mezi nejvýznamnější bakteriální enzymy vyskytující se v mléce patří bohužel také termostabilní lipázy a proteázy, které jsou produkovány psychrotrofními bakteriemi. Těch je však velmi malé množství za předpokladu použití kvalitní suroviny. Z technologického hlediska je zrání nutné k vytvoření typického vzhledu, chuti, aroma i konzistence pro daný typ sýrů. Typickou chuť udávají sýru sloučeniny látek přítomné v mléce, avšak k největším změnám chuti dochází právě během zrání. Tvorba příchutí sýrů je souborem enzymatickým a neenzymatických reakcí, kdy nejdůležitější roli zastávají bakterie mléčného kvašení. Zráním jsou dále ovlivněny zejména bílkoviny a sacharid laktóza, dochází však také ke změnám tuku, který je hlavním prekurzorem pro tvorbu chuti [21-24].

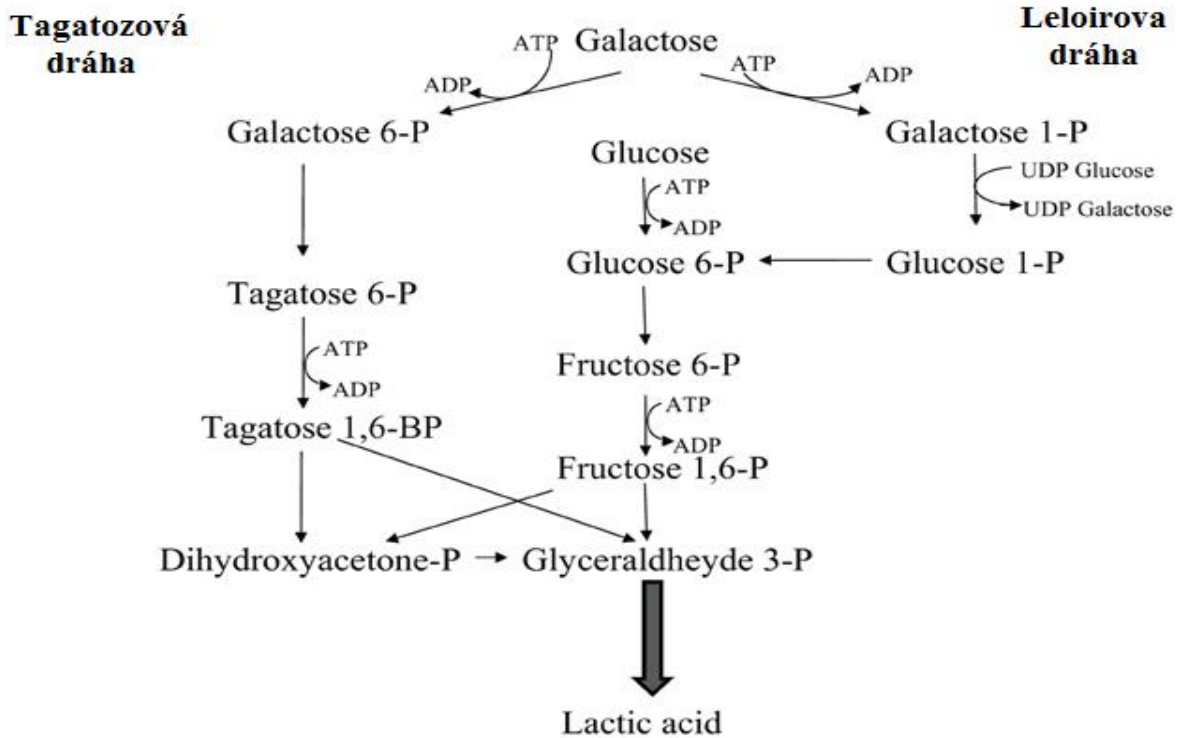
Jednotlivé biochemické procesy probíhající během zrání jsou propojeny a postupně na sebe navazují. Zrání se odehrává ve zracích sklepech s pravidelně kontrolovanou teplotou a relativní vlhkostí, především u sýrů zrajících bez obalu. Teplota je zásadním parametrem v procesu zrání. U sýrů s nízkodohřívanou sýřeninou by se měla pohybovat v rozmezí 8 – 14 °C. V případě polotvrdých a tvrdých sýrů odpovídá 80 – 90% v případě zrání v ochranném obalu. Doporučená doba zrání sýrů holandského typu pro eidam je 2 - 3 měsíce, doba zrání goudy může být 1 měsíc až 2 roky v závislosti na požadovaných vlastnostech sýru [25].

Vzhledem k vysokým nákladům na skladování a uchovávání dlouhozrajících sýrů ve zracích sklepech s řízenou atmosférou, vznikly nové technologie pro urychlení tohoto procesu. Metody akcelerace zrání sýrů zahrnují změnu teploty zrání, přidavek enzymů, přida-

vek geneticky modifikovaných mikroorganismů (GMM), aj. Teplota patří k nejdůležitějším faktorům ovlivňující mikrobiologické, resp. biochemické procesy při zrání sýrů. Proteolytické a lipolytické reakce jsou výrazně urychleny použitím zvýšené teploty během zrání. Je to dáno přiblížením se k optimální teplotě aktivity proteolytických enzymů, které pak katalyzují přeměnu volných aminokyselin na sensoricky aktivní látky. Tento způsob akcelerace zrání sýrů však může být aplikován je u sýrů vyrobených za vysoce hygienických podmínek, vzhledem k tomu, že zvýšení teploty by pak mohlo pozitivně působit na růst a množení nežádoucí mikroflóry (původce alimentárních onemocnění). Přídavek enzymů též výrazně ovlivňuje rychlost zrání sýrů. Nejčastěji využívané enzymy jsou proteinázy, peptidázy, lipázy a β -galaktozidázy. Enzymy jsou zodpovědné za výsledné sensorické vlastnosti typické pro daný výrobek. Z důvodu tvorby hořké chuti, žluklosti, netypických pachutí či texturních vad je při aplikaci této metody velmi důležité množství použitého enzymového přípravku. Využití GMM je dalším ze způsobů metod akcelerace zrání, kdy účelem je vytvořit takový mikroorganismus, který produkuje daleko více enzymů (proteináz atd.) než běžně používané starterové kultury [26].

1.2.1 Rozklad laktózy bakteriemi mléčného kvašení za vzniku kyseliny mléčné

Metabolismus laktózy je důležitý při výrobě všech druhů sýrů. Laktóza vstupuje do buňky dvěma způsoby. Jedním ze způsobů je za pomoci nosiče laktóza-permeázy, kde enzym β -galaktozidáza rozkládá laktózu na glukózu a galaktózu. Druhým způsobem je vstup laktózy do buňky pomocí fosfoenolpyruvát-dependentní fosfotransferázy. Laktóza se pak štěpí na glukózu a galaktózu-6-fosfát. Glukóza se rozkládá glykolýzou a galaktóza je metabolizována dvěma drahami, Leloirovou a tagatozovou. Leloirovou dráhou je galaktóza fosforylována a přeměněna na glukózu-6-fosfát, která rovněž vstupuje do glykolýzy. Tagatozovou dráhou je galaktóza-6-fosfát dvakrát fosforylována na tagatózu 1,6-difosfát. Následně dochází k rozkladu na dihydroxyacetonfosfát a glyceraldehyd-3-fosfát účastníci se glykolýzy. Pyruvát je působením laktátdehydrogenázy štěpen až na kyselinu mléčnou [27,28]. Schematické znázornění metabolismu galaktózy bakteriemi mléčného kvašení je na Obrázku 1.



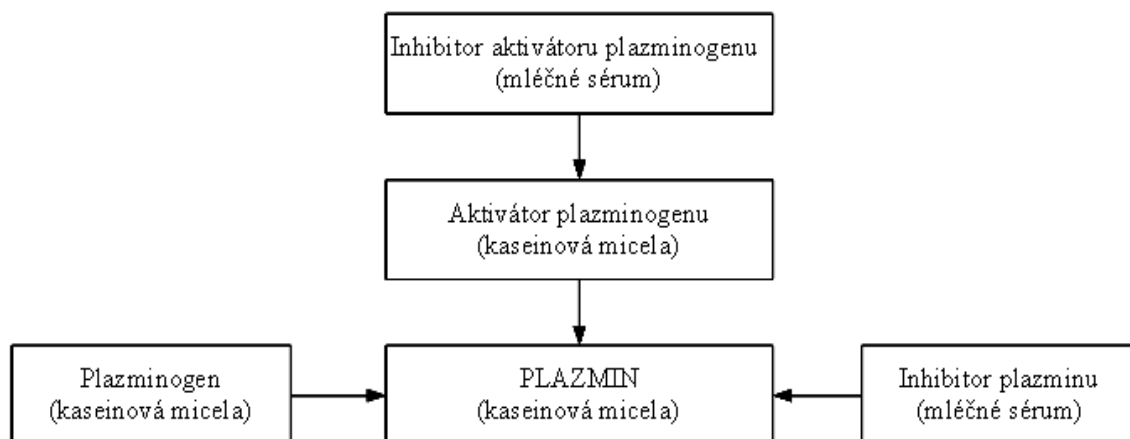
Obrázek 1 - Metabolismus galaktózy BMK [29].

Rozklad laktózy začíná již po inokulaci, pokračuje během srážení, zpracování a formování sýřeniny. V závislosti na použitém mikroorganismu dochází k rozkladu laktózy dvěma způsoby, a to buď homofermentativní, kde je hlavním produktem reakce kyselina mléčná nebo heterofermentativní. Během heterofermentativního kvašení dochází vedle kyseliny mléčné také k produkci dalších významných látek jako je etanol, těkavé kyseliny, oxid uhličitý aj. Při výrobě polotvrdých sýrů využíváme homofermentativního kvašení za účasti zejména bakterií rodu *Lactococcus*, které pomocí enzymu β -galaktozidázy štěpí laktózu na glukózu a galaktózu. Glykolýzou pak vzniká L- laktát, který může být pomocí nezákysových bakterií např. *Leuconostoc* spp. racemizován na D- laktát, jež je méně rozpustný než původní forma, má nevýznamný vliv na chuť, avšak v konečném důsledku způsobuje krystalky na řezu sýra projevující se bílými skvrnami. Kyselina mléčná reaguje s vápníkem za vzniku mléčnanu vápenatého, díky tomu pak sýrařská zrna vytvoří homogenní hmotu za vzniku monokalciumpkaseinátu, který ve vodě a roztoku NaCl bobtná. Kyselina mléčná ovlivňuje zastoupení solí v sýrech a snižuje kyselost sýru. Pro sýry holandského typu je

v menší míře žádoucí tvorba ok, které způsobuje oxid uhličitý vznikající z laktátu za účasti BMK. Ok by nemělo být víc než 5 o velikosti hrášku [7,13,14,21].

1.2.2 Proteolýza a reakce volných aminokyselin

Ze tří základních reakcí, ke kterým dochází během zrání, je proteolýza komplexní, a podle názorů většiny vědců, nejdůležitější. Je primárně zodpovědná za změny texturních vlastností, jako je tvrdost, pružnost, soudržnost, tavitelnost, přilnavost a významným způsobem se podílí na tvorbě chuti výsledného produktu (více popsáno v kapitole 2. Biogenní aminy). Proteolýzou dochází k rozkladu bílkovin anaerobně v celé hmotě sýra nebo aerobně od povrchu dovnitř. Studiemi bylo prokázáno, že za prvotní fázi proteolýzy jsou zodpovědné zejména enzymy syřidla. Proteolýzou vznikají štěpy s vysokou molekulovou hmotností, poté nastává hydrolýza za vzniku peptidů s nižší molekulovou hmotností. Tuto reakci katalyzují enzymy pocházející zejména ze startovacích kultur. Některé peptidy mohou mít hořkou chuť, na co však může mít vliv řada faktorů (druh BMK, syřidlo, obsah soli, aj.) Tyto sloučeniny mohou v konečném důsledku způsobovat nežádoucí chuť a senzorické vady v sýrech. Důležitým enzymem s proteolytickou aktivitou je nativní plazmin. Tento glykoprotein přechází do mléka z krve dojnic, kde primárně slouží k rozkladu sraženin fibrinu. Plazmin je součástí komplexního systému sestávajícího ho z aktivního enzymu, jeho neaktivní formy plazminogenu, aktivátoru plazminogenu, inhibitoru plazminu a inhibitoru aktivátoru plazminogenu. Plazmin a plazminogen včetně jeho aktivátorů jsou v čerstvém mléce vázány na kaseinové micely, kdy plazminogenu je zde 4x více než samotného plazminu. Aktivita plazminu bývá zvýšená na konci laktace a během mastitid. Optimální podmínky pro aktivitu enzymu je teplota přibližně 35°C a pH 7,5. Naopak k inaktivaci dochází při teplotě 80°C s výdrží 10 minut při pH 6,8. Vyznačuje se vysokou specificitou pro peptidové vazby obsahující lysin na N-terminálním konci. Podílí se na štěpení kaseinových frakcí α_{s1} za vzniku proteolytických štěpů a dále β – kaseinu za vzniku γ - kaseinu, které při kyselém i enzymatickém srážení zůstávají v sýřenině díky své hydrofobní povaze. Vzhledem k faktu, že inhibitory plazminu jsou méně tepelně stabilní a tudíž jsou inaktivovány dříve než samotný enzym, je plazmin zodpovědný za primární proteolýzu u vysokodohříváných sýrů jako je Parmezán či Ementál [7,13,14,21,25].



Obrázek 2 - Schematické znázornění systému plazminu v mléce [14].

Delší doba zrání podpoří tvorbu tripeptidů, dipeptidů a volných aminokyselin, které jsou rozkládány na amoniak a další sloučeniny. Volné aminokyseliny jsou substrátem pro vznik sensoricky aktivních látek, dodávající chuť a vůni, tudíž mění organoleptické vlastnosti výrobku. Jedná se především o aldehydy, ketony, estery, amoniak, aj. Potenciálním rizikem je reakce volných aminokyselin za vzniku biogenních aminů, které ve vyšších koncentracích mohou negativně ovlivnit zdraví konzumenta (více popsáno v kapitole 3). Změny ve struktuře bílkovin určuje rozsah zrání, což je podíl ve vodě rozpustných dusíkatých látek. Dalším určujícím znakem je hloubka zrání, která uvádí množství aminokyselin a produktů jejich rozkladu k celkovému dusíku. Hloubka zrání je značná u polotvrdých a tvrdých sýrů. Vzhledem ke složitosti proteolýzy, používají se dnes nejrůznější metody stanovení rozsahu zrání v závislosti na hloubce požadovaných informací. Tyto metody mohou být buď specifické, mezi které řadíme chromatografii či elektroforézu a nespecifické, založené na stanovení obsahu rozpustného dusíku pomocí rozpouštědla (voda, etanol, kyselina trichloroctová, aj.) [7,13,14,21].

1.2.3 Lipolýza a reakce mastných kyselin

Lipidy mají významný vliv na chuť a texturu sýrů. K tvorbě sýrové příchutě lipidy přispívají svým zdrojem mastných kyselin s krátkým řetězcem, které jsou typické pro silné charakteristické aroma, dále také obsahem polynenasycených mastných kyselin, jež jsou

náchylné k oxidačním reakcím za vzniku aldehydů způsobujících vady chuti a žluknutí tuků. Lipolýzou se rozumí rozklad tuků, kdy účinkem lipáz dochází k uvolnění mastných kyselin z triacylglycerolů. Následnou reakcí volných mastných kyselin vznikají sensoricky aktivní látky, které jsou v menším množství žádoucí. Vyšší koncentrace těchto látek však způsobuje nepříjemné sensorické vady. Lipázy vykazují specifitu pro mastné kyseliny s určitou délkou řetězce, některé pro nasycené nebo naopak pro nenasycené mastné kyseliny. Přestože existují i lipázy, které mají vyšší aktivitu v neutrálním nebo kyselém pH, převážná většina těchto enzymů má optimum v oblasti alkalické [7,14,21].

2 BIOGENNÍ AMINY

Aminy jsou organické sloučeniny typického zápachu odvozené od amoniaku s jedním nebo více atomem vodíku nahrazeným alkylovou skupinou. Biogenní aminy jsou důležité látky, které v organismu slouží jako zdroj dusíku pro buňky, prekuzory v syntéze hormonů, proteinů a nukleových kyselin, dále regulují tělesnou teplotu a působí také jako neurotransmitery centrální nervové soustavy. Ve vyšších koncentracích jsou tyto látky, vyskytující se v potravinách v důsledku nevhodného zpracování či skladování, škodlivé. Tyto aminy jsou označeny jako biogenní, protože jsou vytvořeny působením živých organismů. Mezi nejdůležitější biogenní aminy vyskytující se v potravinách patří histamin, putrescin, kadaverin, tyramin, tryptamin, fenylethylamin, spermin a spermidin. Vznik BA v potravinách je připisován působení bakterií, jejichž enzymy - dekarboxylázy odštěpují karboxyl z volných aminokyselin. Tvorbu biogenních aminů v potravinách ovlivňují tři základní faktory: dostupnost volných aminokyselin, přítomnost bakterií s funkčními dekarboxylázami a prostředí vhodné pro růst takovýchto bakterií. Mezi potraviny, ve kterých je výskyt BA nejčastější, patří ryby, rybí výrobky, masné výrobky, vejce, sýry, fermentované zeleniny, sójové produkty, pivo a víno [30-33].

2.1 Dělení biogenních aminů

Biogenní aminy lze rozdělit dle chemické struktury na alifatické (putrescin, kadaverin, spermin, spermidin, agmatin), aromatické (tyramin, fenylethylamin) a heterocyklické (histamin, tryptamin). Dle počtu reaktivních aminoskupin se rozdělují na monoaminy a polyaminy. Jednoduché alifatické monoaminy jsou velmi rozšířené. Většina alifatických aminů spadá do skupiny polyaminů, tj. že ve své molekule obsahují dvě a více aminoskupin. Polyaminy jako je putrescin, kadaverin, spermin a spermidin se běžně vyskytují v živých organismech, kde plní řadu fyziologických funkcí a lze je také nalézt ve většině bakterií. Na primární, sekundární a terciární dělíme biogenní aminy dle počtu alkylových a arylových skupin navázaných na atom dusíku. Je – li alkylem nebo arylem substituován jen jeden vodík, jedná se o primární amin, jsou – li nahrazeny oba vodíky, pak vznikají aminy sekundární [25,30,33-35].

Obecný přehled některých biogenních aminů je uveden v Tabulce 2. K systematickému názvu je přiřazen název triviální a jednotlivé biogenní aminy jsou rozděleny do skupiny podle chemické struktury [25].

Tabulka 2 - Obecný přehled některých zástupců BA [25].

NÁZEV		SKUPINA		
SYSTEMATICKÝ	TRIVIÁLNÍ			
2-(1H-IMIDAZOL-5-YL) ETHYLAMIN	histamin	heterocyklické	primární	monoaminy
BUTAN-1,4-DIAMIN	putrescin	alifatické	primární	polyaminy
PENTAN-1,5-DIAMIN	kadaverin	alifatické	primární	polyaminy
5-HYDROXYTRYPTAMIN	serotonin	heterocyklické	primární	polyaminy
N-(4-AMINOBYTYL) GUANIDIN	agmatin	alifatické	sekundární	polyaminy
4-(2-AMINOETHYL) FENOL	tyramin	aromatické	primární	monoaminy
2-FENYLETHYLAMIN	fenylethylamin	aromatické	primární	monoaminy
N, N´-BIS (AMINOPROPYL) BUTAN-1,4-DIAMIN	spermin	alifatické	sekundární	polyaminy
N-(3-AMINOPROPYL) BUTAN-1,4-DIAMIN	spermidin	alifatické	sekundární	polyaminy

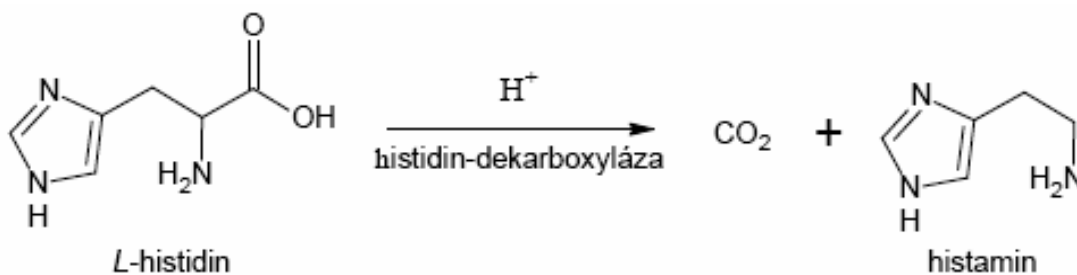
2.2 Vznik biogenních aminů

Biogenní aminy jsou produkty dekarboxyláza-pozitivních mikroorganismů přítomných v potravinách. Mohou vznikat působením enzymů kontaminující mikroflóry nebo je jejich vznik podmíněn zvolenou technologií výroby, zejména u fermentovaných potravin. Dekarboxylace aminokyselin je běžná hlavně v živočišných materiálech, kdežto vznik aminů z aldehydů je typický pro materiály rostlinné. Jedním ze způsobů tvorby aminů je i transaminace aldehydů a ketonů. Častou reakcí biogenních aminů je reakce neenzymového hnědnutí, kde jsou výslednými meziprodukty iminy. Iminy mohou vznikat také oxidací, především díky peroxidu vodíku a hydroperoxidů lipidů. Při dlouhodobém skladování nebo

při vyšší teplotě dochází k reakci aminokyselin s triacylglyceroly za vzniků amidů mastných kyselin. Yen and Kao [73] dokázali, že polyaminy spermidin, spermin a putrescin inhibují oxidaci polynenasycených mastných kyselin. Tento antioxidační účinek závisí na počtu amino skupin v příslušném polyaminu [25,30,36,37].

Působením dekarboxyláz dochází k uvolnění CO_2 z karboxylové skupiny aminokyselin, které slouží jako prekurzory pro vznik BA. Dekarboxylázová aktivita se vyskytuje u mnoha druhů jak grampozitivních (G^+) bakterií rodu *Bacillus*, *Clostridium*, *BMK* (*Lactobacillus*, *Pediococcus* a *Streptococcus*), tak u gramnegativních (G^-), kam patří rody *Citrobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Salmonella* a *Shigella*. Dekarboxylázová aktivita na aminokyseliny tyrosin a histidin byla detekovaná u gramnegativních rodů *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas ripitilivora*, a grampozitivních rodů *Bacillus cereus*, *Enterococcus durans*, *Lactobacillus brevis*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Streptococcus thermophilus*. Grampozitivní bakterie *Enterococcus faecalis* je spojován se vznikem tyraminu v sýru čedar [38-42].

Proteus morgani, *Klebsiella pneumoniae* jsou významnými producenty histaminu v rybách a výrobcích z nich. Histamin vzniká z aminokyseliny histidinu za účasti histidin – dekarboxylázy za současného uvolnění CO_2 . Enzym histidin-dekarboxyláza byl izolován z některých druhů rodu *Lactobacillus* či gramnegativní bakterie rodu *Enterobacter aerogenes*. Schéma vzniku histaminu je viditelné na Obrázku 3 [38-41].



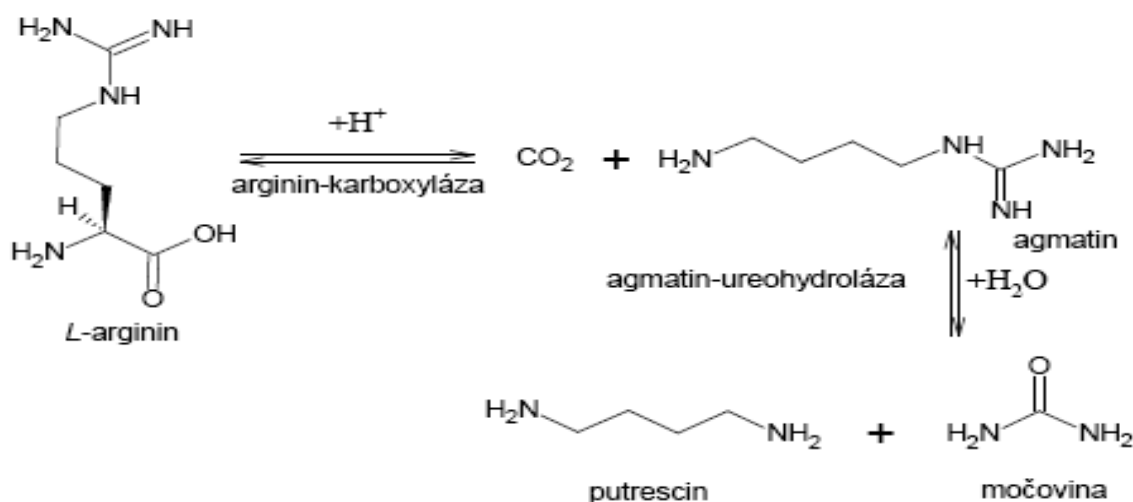
Obrázek 3 - Schéma vzniku histaminu z *L* – histidinu [43].

Biogenní aminy, zejména sekundární, se vyznačují schopností reagovat s dusitany za vzniku karcinogenních nitrosaminů. V roce 1978 stanovila Mezinárodní agentura pro výzkum rakoviny (IARC) skupiny nitrosaminů dle jejich negativního vlivu na lidský organismus, kde *N*-nitrosodiethylamin (NDEA) a *N*-nitrosodimethylamin (NDMA) patří do

skupiny pravděpodobných karcinogenů. N-nitrosodibutylamin (NDBA), N-nitrosopiperidin (NPIP) a N-nitrosopyrrolidin (NPYR) se řadí do skupiny možných karcinogenů [30-33,43].

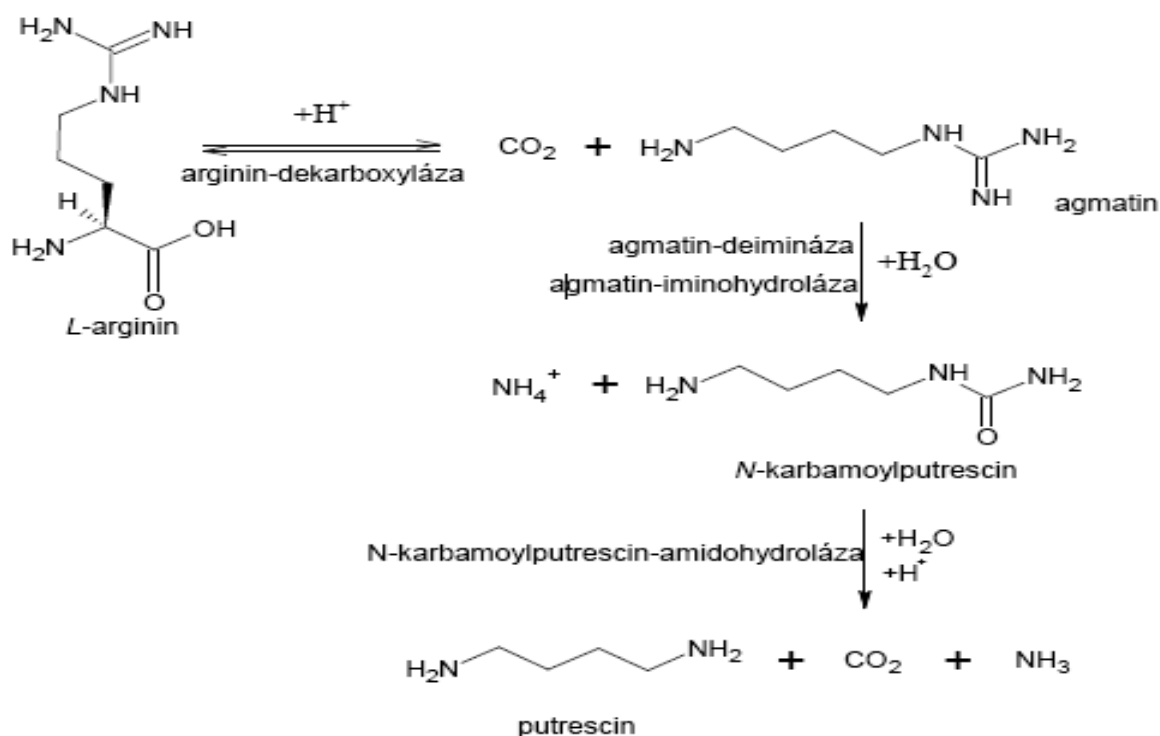
V přítomnosti kontaminující mikroflóry (*Pseudomonas* či enterobakterie) dochází k vyšší produkci putrescinu v potravinách. V porovnání s ostatními BA, které vznikají převážně jednou metabolickou drahou, vzniká putrescin dvěma drahami v případě grampozitivních MO (Obrázek 5 a 6) a dokonce třemi drahami v přítomnosti gramnegativních bakterií (znázorněno na Obrázku 4 - 6). Grampozitivní bakterie se metabolismu putrescinu účastní pomocí agmatin deiminázové (Obrázek 5) a ornitin dekarboxylázové dráhy (Obrázek 6). Agmatin deiminázová dráha využívá dvou enzymů. Agmatin deamináza, která přeměňuje agmatin na N-karbamoylputrescin a amoniak. Druhým enzymem je pak N-karbamoylputrescin-amidohydroláza, která zapříčiní vznik putrescinu a karbamoylfosfátu, který je kinázou rozložen na oxid uhličitý, amoniak a ATP sloužící jako zdroj energie pro BMK [35, 43,44].

Na Obrázku 4 je znázorněn vznik putrescinu arginin-dekarboxylázovou dráhou, kde je L-arginin enzymem arginin-dekarboxylázou dekarboxylován za vzniku agmatinu. Enterobakterie pak agmatin přeměňují na putrescin a močovinu pomocí agmatin-ureohydrolázy. Oproti tomu pak například rod *Pseudomonas* stejně jako BMK agmatin hydrolyzují agmatin-deiminázou za vzniku N-karbamoyl putrescinu a amoniaku (viz Obrázek 5). Metabolická dráha vedoucí ke vzniku putrescinu znázorněná na Obrázku 4 je možná jen u gramnegativních bakterií. [43,44].



Obrázek 4 - Vznik putrescinu (dráha I.) [43].

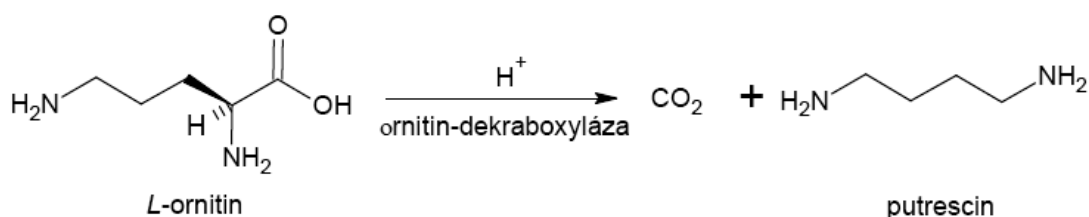
Obrázek 5 představuje další způsob vzniku putrescinu. Tato dráha je shodná s předchozí (Obrázek 4) až po vznik agmatinu. Agmatin se díky agmatin-deimináze nebo agmatin-iminohydroláze mění na meziprodukt N-karbamoylputrescin, který pak reaguje s molekulou vody a kationtem vodíku v přítomnosti enzymu N-karbamoylputrescin-amidohydrolázy za vzniku putrescinu a dalších sloučenin. Putrescin vzniká touto drahou za přítomnosti enzymů produkovaných jak grampozitivními tak gramnegativními bakteriemi s dekarboxylázovou aktivitou (*Arabidopsis thaliana*, *Pseudomonas aeruginosa*, aj). [43,44].



Obrázek 5 - Vznik putrescinu (dráha II.) [43].

Putrescin může vznikat také z L-ornitinu pomocí enzymu ornitin-dekarboxylázy, produkované gramnegativními kmeny *Escherichia coli* a *Pseudomonas aeruginosa* za současného uvolnění oxidu uhličitého (Obrázek 6). Tuto metabolickou dráhu jsou schopny využívat také grampozitivní MO. Ze vzniklého putrescinu pak metylací S-adenosyl-L-

methioninaminenu vzniká spermidin, z kterého může vzniknout další biogenní amin spermin. Putrescin, spermidin a spermin pak slouží jako prekurzory pro vznik N-nitrosopyrrolidinu. Z ornitinu tedy dekarboxylací vznikne putrescin. Deaminací ornitinu a následnou cyklizací vzniká pyrrolidin. Z pyrrolidnu pak v přítomnosti nitrosačního činidla vzniká karcinogenní N-nitrosopyrrolidin [44-46].



Obrázek 6 - Vznik putrescinu (dráha III.) [43].

2.2.1 Podmínky vzniku biogenních aminů

Ke vzniku biogenních aminů je potřeba splnit následující podmínky:

- a) přítomnost volných aminokyselin v potravíně
- b) přítomnost mikroorganismů s dekarboxylázovou aktivitou
- c) vhodné podmínky pro růst a pomnožení daných mikroorganismů.

K vytvoření vhodných podmínek pro růst a množení mikroorganismů jsou důležité faktory, kterými je teplota, doba skladování potraviny, aktivita vody, přítomnost kyslíku, pH, redoxní potenciál a obsah soli. Dle Komprdy [36] je vznik aminů ovlivňován také obsahem glukózy jako substrátu, přičemž optimální hodnota pro aktivitu enzymu je do 2%. Hodnota nad 3% funkci enzymu inhibuje. Nutno podotknout, že všechny výše zmíněné faktory jsou závislé na použitém druhu bakterie. Teplota se u mezofilních dekarboxyláza pozitivních bakterií mléčného kvašení pohybuje v rozmezí 10 – 45°C, však optimální teplota růstu a reprodukci mezofilů je okolo 37°C, přičemž teplota nižší než zmíněné rozmezí zpomaluje a zastavuje růst mikroorganismů. Termofilní BMK naopak preferují teplotu okolo 40 – 50°C. Co se pH týče, je pro BMK a jejich dekarboxylázovou aktivitu vhodnější

slabě kyselé prostředí. Hnilobné bakterii vyžadují neutrální, až slabě zásadité prostředí. Přítomnost kyslíku není zcela jednoznačným ukazatelem. Závisejí na daném dekarboxyláza pozitivním mikroorganizmu, zda je aerobní, fakultativně anaerobní nebo anaerobní. Teplota vhodná pro dekarboxylázu je v rozmezí 20 – 30°C, přičemž hodnoty nižší než zmíněné rozmezí zpomaluje nebo zastavují růst mikroorganizmů [36,47,48].

2.3 Výskyt biogenních aminů

Prakticky všechny potraviny, které obsahují proteiny nebo volné aminokyseliny vytváří vhodné prostředí pro růst mikroorganizmů a za těchto podmínek lze proto s jistotou předpokládat tvorbu biogenních aminů. Celkové množství vzniklých BA pak ve velké míře závisí na přítomné mikroflóře, druhu potraviny, teplotě a době skladování. Vedle výše zmíněných potravin najdeme BA také v mléčných výrobcích, čokoládě i ovoci. Obvykle se obsah jednotlivých aminů v potravinách pohybuje v řádu jednotek až desítek mg/kg. Hodnoty ve stovkách mg/kg se považují dokonce za velmi vysoké. Výjimkou jsou tisíce mg/kg. Při dodržování metod správné výrobní praxe (SVP) je hodnota 5 – 100 mg/kg histaminu, 100 – 800 mg/kg a 30 mg/kg fenylethylaminu považována za přijatelnou. Přítomnost volných aminokyselin, kyselé prostředí, vysoká koncentrace soli ve výrobku a dostatečná dekarboxylázová aktivita mikroorganizmů koreluje s vyšším obsahem biogenní aminů v potravinách [30,35,49-51].

Biogenní aminy vyskytující se v potravinách se částečně podílí na otravách způsobených konzumací kontaminovaných potravin. V případě, že spotřebitel zkonsumuje v krátkém časovém intervalu takové množství potraviny, ve kterém je obsažena minimální infekční dávka, dochází k nežádoucím projevům specifických pro daný amin. Podmínkou je také přecitlivělost konzumenta na daný patogen. Zejména děti, senioři, těhotné ženy a imunosupresivní jedinci jsou oproti průměrnému spotřebiteli obzvlášť náchylní k těmto infekcím [52].

Z hlediska výskytu se potraviny dělí na fermentované, kde je rozhodujícím faktorem působení bakterií mléčného kvašení a potraviny nefermentované, v nichž biogenní aminy vznikají především činností bakterií hnilobných. Lepší znalost faktorů pro kontrolu vzniku BA je nezbytně nutná pro zlepšení kvality a bezpečnosti potravin. Pro omezení tvorby aminů v potravinách se používají některé konzervační látky např. kyselina sorbová [49,53].

2.3.1 Fermentované potraviny

Fermentované potraviny jsou charakteristické vysokým počtem mikroorganismů, záměrně přidaných pro správný průběh fermentace, proto představují pravděpodobnost vyššího výskytu biogenních aminů než nefermentované potraviny. Fermentované potraviny zrají různě dlouhou dobu, během níž se biogenní aminy tvoří [30,54].

Sýry jsou obávanou skupinou fermentovaných potravin. První případ alimentární otravy histaminem spojený s konzumací goudy byl hlášen roku 1967 v Nizozemsku. Nebezpečí pro konzumenta představují sýry vyráběné z tepelně neošetřeného mléka (brynza). Tavené sýry podléhají při zpracování vysokým teplotám, které eliminují množství BA na zanedbatelné. Polotvrdé sýry holandského typu obsahují podstatně nižší hodnoty biogenních aminů. Pasterace mléka na výrobu sýrů, vysoký stupeň provozní hygieny a výběr vstupních surovin s nízkou dekarboxylázovou aktivitou jsou faktory eliminující vznik těchto nežádoucích látek [30,35,50].

Sýry představují ideální prostředí pro tvorbu biogenních aminů v závislosti na druhu sýra, respektive na mikroorganismu v něm obsaženém. Biogenní aminy se v sýrech vytváří v závislosti na mnoha faktorech. První podmínkou je přítomnost volných aminokyselin, která určuje stupeň proteolýzy, a tedy přítomnost mikroorganismů. Pro růst těchto mikroorganismů je důležité zabezpečit jim vhodné prostředí (pH, teplota, dostatek substrátu...) Mezi další faktory patří druh a stáří sýra, také teplota zrání a skladování a doba skladování. Důležitým faktorem je hygiena suroviny a hygiena při zpracování sýra, výběr startovacích kultur, distribuce biogenních aminů v sýru (např. u sýra s bílou plísní na povrchu se více biogenních aminů nachází na povrchu sýra než ve vnitřní části), tvar sýra (v kulatých sýrech je vyšší obsah biogenních aminů v porovnání s pravoúhlými sýry), obal (při zrání pod fólií je vyšší obsah biogenních aminů než při zrání pouze pod kůrou) [30,54].

K urychlení zrání sýrů se používají mikroorganismy s proteolytickou aktivitou nebo přídavek proteolytických enzymů, někdy v kombinaci s peptidázami, které zajistí vznik hořkých peptidů. Rozklad bílkovin proteolýzou dochází ke zvýšení koncentrace peptidů a aminokyselin, které slouží jako prekurzory vzniku biogenních aminů za přítomnosti dekarboxyláza pozitivních mikroorganismů. Joosten and Northolt [55] tvrdí, že výše zmíněný postup je nejčastěji uplatňován při výrobě sýrů. Tito dva autoři prokázali významný nárůst histaminu v hmotě sýra za použití směsi tepelně ošetřeného starterového mikroorganismu

v kombinaci s histidin–dekarboxyláza pozitivní bakterií *Lactobacillus buchneri*. Rozšířeným výzkumem proteolýzy při zrání sýrů se prokázalo, že BMK se podílí na vzniku tyraminu, putrescinu a histaminu [38,56,57].

Během zrání sýrů dochází za pomoci proteolytických enzymů k degradaci kaseinu, což má za následek vznik volných aminokyselin. Ty pak podléhají působení bakteriálních dekarboxyláz za vzniku oxidu uhličitého a aminu. Z toho vyplývá, že se zvyšující dobou zrání roste obsah biogenních aminů v sýrech [58-60].

U fermentovaných masných výrobků závisí obsah biogenních aminů především na mikrobiální čistotě zpracovávané suroviny. U některých kmenů mikroorganismů běžně používaných v masném průmyslu byla prokázána jejich schopnost odbourávat část vytvořeného tyraminu. Při fermentaci masných výrobků se během prvních 3 dnů zrání obsah aminů zvyšuje až 10 krát oproti původní koncentraci. Množství aminů závisí na délce zrání a dekarboxylázové aktivitě přítomné kvasící mikroflóry [30,33,61,62].

Dalším druhem obávaných potravin z hlediska obsahu biogenních aminů je fermentovaná zelenina. Příkladem je kysané zelí, u kterého dochází k významné tvorbě tyraminu v závislosti na době skladování. V počáteční fázi fermentace zelí se ve značné koncentraci vytváří hlavně putrescin, zatímco koncentrace argininu klesá. Konečná fáze je naopak typická tvorbou histaminu a tyraminu. Snížení tyraminu v zelí se docílí vhodným přidavkem bakterií mléčného kvašení při nakládání zelí a přiměřeně se zkrátí doba kvašení [30,63].

Pivo a víno sice obsahují BA, avšak v podstatně nižší koncentraci než je tomu u předchozích potravin. Konzumace těchto alkoholických nápojů však mnohdy probíhá v krátkém časovém intervalu a v takovém množství, že riziko otravy úměrně stoupá. Litř piva obsahuje přibližně 1 mg histaminu a až 10 mg tyraminu. Požití piva obsahující histamin je spojeno s bolestí hlavy a návaly horka. Hodnota histaminu je vysoká zejména u švédských, dánských a francouzských piv. Vzhledem k tomu, že pivovarské kvasnice nemají dekarboxylázovou aktivitu, je tvorba aminů ovlivněna mikrobiální čistotou vstupních surovin a úrovní hygieny při vaření piva. U vína aminy vznikají při prokvašování kyseliny jablečné na kyselinu mléčnou působením mléčných bakterií [30,33,63,64].

2.3.2 Nefermentované potraviny

Nejzávažnějšími potravinami této skupiny jsou ryby - makrely, sledi a tuňáci. Legislativně ošetřený je pouze jediný biogenní amin histamin, který se vyskytuje nejčastěji právě v rybách. Maximální limit pro koncentraci histaminu je stanovena na 100 mg/kg svaloviny. Čeleď makrelovití a sled'ovití obsahují ve svalovině velké množství volného, v bílkovinách nevázaného histidinu. Nejsou – li ryby po ulovení urychleně zchlazeny a vhodně skladovány, pomnožená mikroflóra svými dekarboxylázami přemění volný histidin na histamin. Histaminu se vytvoří stovky i tisíce mg/kg svaloviny a takto vysoký příjem vyvolá histaminózu nebo též skombrotoxikázu. Studium vzniku biogenních aminů prokázalo úzkou spojitost s hodnotou skladovacích teplot u ryb. Yoshida a Nakamura [65] zjistili, že v čerstvých rybách se histamin nevyskytuje. Avšak pokusem, kdy ponechali čerstvou makrelu při pokojové teplotě po dobu 24 hodin, došlo k nárůstu hodnoty z 0 na 28,4 mg/kg histaminu, po 48 hodinách dosahovala hodnota až 1540 mg/kg svaloviny. Souvislost vzniku biogenních aminů s nízkými skladovacími teplotami prokázal i Murray et al. [66], který zjistil, že u makrely skladované při mrazírenských teplotách dochází ke vzniku aminů, avšak hodnota ve svalovině nepřesáhne 50 mg/kg, přestože se stane nepoživatelnou. U sladkovodních ryb je riziko malé, neboť se obsah histaminu zvyšuje až v době, kdy je maso sensoricky změněno do takové míry, že se považuje za nepoživatelné [30].

V potravinách rostlinného původu je více spermidinu než sperminu, kdežto u potravin původu živočišného je více sperminu a méně spermidinu. Obecně se hodnoty histaminu, putrescinu a kadaverinu zvyšují při kažení masa a svaloviny ryb, přičemž hodnoty sperminu a spermidinu se snižují. Úroveň putrescinu, kadaverinu a histaminu u vepřového masa významně koreluje s obsahem dusíkatých látek. Byl prokázán fakt, že vakuově balené hovězí maso uchovávané při chladírenské teplotě 1°C po dobu 20 dní je sensoricky nezměněno a považováno za požitelné, avšak může představovat určité riziko pro osoby citlivé na biogenní aminy. Vyšší obsah putrescinu obsahují citrusové plody a sója včetně výrobků z nich. Fenylethylamin je přirozenou součástí kakaových bobů, potažmo i čokolády [30,35,53].

U nefermentovaných potravin poukazuje zvýšená hodnota obsahu biogenních aminů na zhoršenou mikrobiální jakost. Toto je také důvod, proč BA slouží jako indikátory čerstvosti potravin [49].

2.4 Biogenní aminy v lidském organismu

Histamin, tryptamin, fenylethylamin a tyramin jsou biologicky aktivní látky, které mají vliv na velkou řadu fyziologických funkcí u člověka. Aminy mohou být psychoaktivní nebo vazoaktivní. Psychoaktivní ovlivňují nervový systém a působí na neurotransmitery, zatímco vazoaktivní působí v cévní soustavě. Farmakologické účinky biogenních aminů na organismus jsou přímo spojeny s konzumací kontaminovaných potravin. Nežádoucí účinky biogenních aminů v potravinách se projeví jen v případě, dostanou – li se do krevního oběhu. Aminooxidázy vyskytující se v střevním traktu hrají stěžejní roli při odbourávání BA z lidského těla. Detoxikační kapacita je značně individuální, v dětství je velmi omezená a s rostoucím věkem se snižuje. Zvláštní pozornost by měla být věnována při konzumaci kontaminovaných potravin u dětí a osob citlivých na tyto látky. Nejúčinnějším detoxikačním enzymem je monoaminooxidáza, jejíž aktivita je snižována alkoholem a psychofarmaky [30,67,68,].

Biogenní aminy nepředstavují v malých koncentracích žádné riziko pro spotřebitele. K vypuknutí alimentární infekce je nutno požití takové množství potravin, ve kterém je obsažena infekční dávka. Mezi nejčastější příčiny otrav z potravy patří histamin spojený s konzumací ryb a tyramin vyskytující se hlavně v sýrech, vlivem dekarboxyláza pozitivních mikroorganismů. Přesně stanovenou hranici toxicity lze stanovit jen zcela obtížně, vzhledem k faktu, že u jednotlivých osob je účinek vyvolaný různou koncentrací látky v organismu. Obecné symptomy způsobené požitím kontaminantů jsou nevolnost, bolesti hlavy, závratě, průjem a návaly horka, však mezi závažnější projevy patří migrény, krvácení do mozku nebo selhání srdce[33,67-69]. Farmakologické účinky prekurzorů pro vznik biogenních aminů jsou shrnuty v Tabulce 3.

Tabulka 3 - Biogenní aminy a jejich farmakologický vliv na organizmus[33].

AMIN	PREKURZOR	ÚČINEK
HISTAMIN	HISTIDIN	Uvolňuje adrenalin a noradrenalin Vzruchy hladkého svalstva – dělohy, střev a dýchací soustavy Stimuluje smyslové a pohybové neurony Řídí sekreci žaludečních šťáv Periferní vasokonstrikce Zvyšuje srdeční činnost Způsobuje slzení a slinění
TYRAMIN	TYROSIN	Zvyšuje aspiraci Zvyšuje hladinu krevního cukru Uvolňuje noradrenalin z parasimpatiku Způsobuje migrénu Hypotenze Brachykardie
PUTRESCIN A KADAVERIN	ORNITHIN A LYSIN	Křeče žvýkacího svalstva Paralyzuje končetiny Umocňuje toxicitu ostatních aminů Uvolňuje noradrenalin z parasimpatiku
B- FENYLETHYLAMIN	FENYLALANIN	Zvyšuje krevní tlak Způsobuje migrénu
TRYPTAMIN	TRYPTOFAN	Zvyšuje krevní tlak

2.4.1 Účinky histaminu

Histamin je biologicky velmi aktivní látkou a v organizmu se podílí na řadě chemických reakcí. Patří do skupiny heterocyklických monoaminů s psychoaktivními účinky. Histamin způsobuje kožní onemocnění a nervové poruchy, návaly horka, hypotenzi, dýchací

potíže, bolesti hlavy, pálení v ústech, zarudnutí pokožky či břišní křeče. Projevy jsou snadno zaměnitelné s alergiemi na potraviny [33,68].

V Nařízení komise (ES) č. 2073/2005 je stanoven limit pro množství histaminu v rybách a rybích výrobcích 100 mg/kg. Toto množství může být překročeno ve dvou z devíti odebraných vzorků z jedné šarže o 100 %, což znamená, že ve dvou vzorcích může být koncentrace histaminu až 200 mg/kg. Produkty rybolovu, ve kterých proběhlo enzymatické zrání v láku vyrobeného z ryb s vysokým obsahem histidinu je limit stanoven na 200 – 400 mg/kg [70].

Kaláč a Křížek [30] uvádí, že dávka histaminu v množství 8 – 40 mg/kg vyvolává lehké otravy, 40 – 100 mg/kg střední otravy a dávka nad 100 mg/kg vyvolává silné intoxikace. K otravám dochází nejčastěji po požití vysokých koncentrací histaminu obsažených v rybách zejména čeledi makrelovití (makrela, tuňák) nebo sled'ovití (sled', ančovička, sardinka). Vysoké koncentrace byly nalezeny též u fermentovaných salámů a sýrů typu Gouda [63,68].

2.4.2 Účinky tyraminu

Tyramin patří do skupiny aromatických monoaminů a spolu s histaminem je jedním z nejzávažnějších biogenních aminů. Stejně jako tryptamin a fenylethylamin se i tyramin projevuje vazodilatorně. Význam tyraminu spočívá nejen v jeho toxicitě jako takové, ale navíc dokáže reagovat s inhibitory monoaminoxidáz, a v konečném důsledku tak způsobuje prudké zvýšení krevního tlaku. Mezi další projevy otravy tyraminem patří silné bolesti hlavy, krvácení do mozku či selhání srdce [30,71].

Starší vyhláška Ministerstva zdravotnictví č. 298/1997 Sb. udávala povolené množství tyraminu ve víně na hodnotu 50 mg/kg a v sýrech tvrdých, měkkých a zrajících v množství 200 mg/kg. Tato vyhláška dnes již neplatí [72].

Kaláč a Křížek [30] uvádí, že příjem tyraminu v potravinách v množství 10 – 80 mg/kg vyvolává silné otoky a dávka nad 100 mg/kg způsobuje migrény.

3 ZÁKYSOVÉ KULTURY SÝRŮ HOLANDSKÉHO TYPU

Bakterie mléčného kvašení se hojně používají pro technologické účely při výrobě potravin jako starterové neboli zákysové kultury. Tyto nesporulující, kataláza negativní, mikroaerofilní až fakultativně anaerobní grampozitivní mikroorganismy fermentují sacharidy na kyselinu mléčnou. Dle hlavních a vedlejších fermentačních produktů se dělí na obligátně homofermentativní, fakultativně heterofermentativní a obligátně homofermentativní. Obligátně homofermentativní fermentují hexózy na jediný produkt a to kyselinu mléčnou. Při výrobě sýrů se do této skupiny řadí primární kultury *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*. Sekundární kultury *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis*, *Lactobacillus paracasei* nebo *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* patří do skupiny fakultativně heterofermentativních BMK, které zkvašují hexózy na hlavní produkt kyselinu mléčnou. Za určitých podmínek však u těchto kmenů nastane heterofermentativní metabolismus, kdy vznikají kromě kyseliny mléčné také vedlejší produkty jako CO₂, etanol nebo kyselina octová. Tyto produkty metabolismu bakterií způsobují typické senzorycké vlastnosti pro dané sýry. BMK rostou v rozmezí teplot 5 – 50°C, optimum se nachází v oblasti okolo 30°C. Vyskytují se v přítomnosti sacharidových zdrojů tedy nejen v mléce a fermentovaných mléčných výrobcích, ale také v ovoci, zelenině, kde se účastní na rozkladu. Nevýhodou BMK je jejich možná produkce biogenních aminů. Před použitím je proto vhodné otestovat dané kmeny na dekarboxylázovou aktivitu. Mikroorganismy prokazující dekarboxylázovou aktivitu se do potravin mohou dostat spontánně nebo jsou obsažené ve startovacích kultur přidávaných do potravin záměrně (startery) [73-77]. Během zrání sýrů dochází ke vzniku typického aroma a konzistence konečného výrobku působením činnosti mikroorganismů záměrně přidaných během výrobního procesu. Enzymy produkované těmito startery rozkládají sacharidy, bílkoviny či tuky ve výrobku a tím vytváří organoleptické vlastnosti sýru. Na tvorbě chuti, vzhledu a textuře sýrů se krom bakterií podílí také některé druhy kvasinek a plísní, které zahajují fermentaci u výroby sýrů a fermentovaných mléčných výrobků [21].

Základním předpokladem pro správný proces fermentace je vytvoření vhodných podmínek (teplota, pH, dostupnost živin aj.) pro růst specifických mikroorganismů nazývaných kultury. Základním principem při výrobě sýrů je přeměna mléka na sýřeninu fermentací mléčného cukru laktózy za současného vzniku kyseliny mléčné často za použití

Lactococcus lactis. Vytvořená sýřenina pak nabývá finálních organoleptických vlastností v průběhu zrání za použití zákysových kultur mikroorganismů [78].

Intracelulární muramidáza je autolytický enzym, který způsobuje rozpad bakteriálních buněk. Po rozpadu se uvolňují enzymy, zejména peptidázy, které spolu s chymozinem hydrolyzují kaseiny až na aminokyseliny, jakožto prekurzory pro vznik sensoricky aktivních látek. Bylo zjištěno, že druh *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* podléhá rozpadu rychleji (například oproti *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*), to je důvodem vzniku většího množství sensoricky aktivních látek. Sýry, ve kterých byla použita rychle lyzující zákysová kultura pak zrají rychleji [7].

V provozních zákysech se počet zákysových bakterií pohybuje v rozmezí $10^6 - 10^8$ KTJ/ml a počet zákysových bakterií u většiny sýrů je první den ode dne výroby přibližně 10^9 KTJ/g. Při výrobě jsou z počátku převládající mikroflórou zákysové bakterie, avšak vlivem snižujícího pH a rostoucí koncentraci NaCl v sýrech je jejich počet na konci výroby velmi nízký [7,19].

II. PRAKTICKÁ ČÁST

4 CÍL PRÁCE

Cílem teoretické části této diplomové práce bylo:

- charakterizovat sýry holandského typu a jejich výrobu
- popsat vývoj biogenních aminů během zrání
- stručně charakterizovat kyselé mikroorganismy při výrobě sýrů holandského typu.

Cílem praktické části této diplomové práce bylo:

- založit experimenty na vyrobených vzorcích přírodních sýrů s přidáním dekarboxylázy pozitivního kmene bakterií mléčného kvašení a také s kontrolním vzorkem bez přidání tohoto kmene
- pozorovat změny během zrání procesu v obsahu biogenních aminů a jejich vliv na vybrané parametry přírodních sýrů
- vyhodnotit výsledky a formulovat závěry.

5 MATERIÁL A METODIKA

5.1 Charakteristika vzorků

Účelem pokusu bylo v laboratorních podmínkách vyrobit sýry holandského typu za použití komerční smetanové kultury obsahující kmeny *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* a *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* var. *diacetylactis* a zkoumat jejich vliv na přítomnost a množství biogenních aminů v porovnání se sýry vyrobenými s přidavkem dekarboxyláza – pozitivního kmene *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* v poměru 1:1 s komerční smetanovou kulturou, která svým složením není významným producentem biogenních aminů.

Celkem bylo vyrobeno 24 bloků sýra holandského typu s obsahem sušiny 50 ± 2 % [w/w]. Hmotnost jednoho bloku byla 90 ± 3 g. Při výrobě byla použita komerční smetanová kultura společnosti Milcom, a.s. Sýry byly vyrobeny ve dvou sériích, kdy jedna série označuje výrobu A a druhá výrobu B. Výroba A sloužila jako tzv. kontrola a zahrnovala použití 2 x 50 ml provozního zákysu ze smetanové kultury zakoupené od společnosti Milcom, a.s. Sýry pro výrobu B byly taktéž vyrobeny z provozního zákysu komerční smetanové kultury, avšak v množství 1 x 50 ml a s cílem zjistit případný vliv na přítomnost a množství biogenních aminů v sýrech byl přidán ještě jeden provozní zákys s přidavkem dekarboxyláza pozitivního kmene *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* v množství 1 x 50 ml. Analýza provozních zákysů pro detekci biogenních aminů a počty mikroorganismů byla prováděna před prokysáním, tzn. ihned po jejich přípravě (označení u výroby A – Az1, označení u výroby B, tedy analýza bujónu *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* - BzB1), dále po prokysání těsně před výrobou sýrů (u výroby A – vzorek Az2, u výroby B ze zákysu připraveného pouze ze smetanové kultury – vzorek BzA2 a u zákysu s přidavkem bujónu - vzorek BzB2). Výroba sýrů probíhala za laboratorních podmínek. Během celého pokusu byly sýry skladovány při teplotě do 10°C.

Analýza sýrů byla prováděna 1. den (před solením) a 1., 2. a 3. měsíc ode dne výroby. Jednotlivé vzorky pak byly podrobeny základní chemické a texturní profilové analýze, detekci biogenních aminů, mikrobiologické a senzorické analýze.

5.2 Výroba sýrů

Prvním krokem byla příprava provozních zákysů, která probíhala den před výrobou. Pro každou výrobní sérii sýrů bylo 2 x 50 ml mléka po dobu 30 minut ponecháno ve vařicí lázni. Po vychladnutí následovalo zaočkování 2 x 50 ml mléka 0,15 g smetanové kultury v případě výroby A. U výroby B bylo 50 ml mléka zaočkováno 0,15 g smetanové kultury a 50 ml mléka se zaočkovalo bujónem v množství 5 ml. Provozní zákysy pak byly z důvodu prokysání ponechány po dobu 16 – 20 hodin v inkubátoru při teplotě 25 ± 2 °C.

Celkový objem použitého mléka pro výrobu sýrů byl 20 l. V poměru 1 : 1 se smíchalo Selské mléko o tučnosti 3,5 % a mléko polotučné s obsahem tuku 1,5 % (v obou případech mléko společnosti Olma, a.s., Olomouc, ČR). Poté se mléko vytemperovalo na teplotu 32 °C, po dosažení teploty bylo inokulováno předem připraveným provozním zákysem a přídatkem 10 ml 36% (w/v) roztoku CaCl_2 (Milcom a.s., ČR). Inokulace trvala 30 minut za občasného promíchávání. Následoval přídatkem syřidla Fromase 750TL (DSM Food Specialties, Francie), který byl pro lepší rozptýlení v celém objemu mléka aplikován v množství 1,5 ml v desetinásobku vody. Takto připravené mléko se důkladně zamíchalo a po zastavení hladiny z důvodu zamezení možného vytvoření sýrařského prachu, začalo 40 - ti minutové sýření. Po uplynutí této doby byla vzniklá sýřenina pokrájena pomocí sýrařských harf, znova ponechána v klidu tentokrát 10 minut a následně míchána ručně 20 minut. Část (asi 1/4) syrovátky byla odebrána a nahrazena prací vodou o teplotě 80 ± 2 °C tak, aby výsledná teplota směsi byla 41 °C. Vzniklé sýrařské zrno pak bylo strojně mícháno po dobu 60 minut. Po ukončení procesu dohřívání se sýrařská zrna nalila do předlisovacích forem vyložených plachetkou. V těchto formách docházelo k lisování zrn vlastní vahou za současného odkapu syrovátky po dobu 30 minut. Aby lisování probíhalo rovnoměrně, zrna se 3 x každých 10 minut obracela. Předlisovaná sýřenina se poté nakrájela na 12 stejných dílů, které se vložily do malých sýrařských forem taktéž vyložených plachetkou a působením tlaku 8,5 – 25,5 kPa byly lisovány 90 minut. Tlak se lineárně zvyšoval po každé půl hodině lisování. Takto vylisována sýřenina byla vyjmuta z forem a vložena do inkubátoru a při teplotě 21 ± 2 °C ponechána k prokysání do druhého dne. Následující den byly sýry ponořeny do předem připravené solné lázně o koncentraci NaCl 20 % (w/v). Solení trvalo 30 minut za současného obrácení jednotlivých dílů pro rovnoměrné rozptýlení NaCl. Takto připravené sýry byly zabaleny do cryovakového obalu a uloženy do zracích komor při teplotě 10 ± 2 °C. Naprosto shodným způsobem byla provedena výroba B, avšak 1 x 50 ml

smetanového zákysu bylo nahrazeno zákysem s přidavkem dekarboxyláza pozitivního kmene. Veškeré nástroje, které přišly do styku se sýry, byly namočený v dezinfekci (Aktivit D, BANCHEM, Slovenská republika) a důkladně opláchnuty studenou vodou.

5.3 Základní chemická analýza

Chemická analýza zahrnovala stanovení pH, obsahu NaCl a sušiny ve vyrobených vzorcích. Tyto parametry byly stanovovány celkem třikrát u každého bloku sýra. Hodnota pH byla měřena pomocí vpichového pH metru (Spear – Eutech, Nizozemsko) s přesností $\pm 0,01$. Obsah soli byl stanoven argentometrickou titrací za použití titračního činidla dusičnanu stříbrného na indikátor 5% (w/w) chroman draselný. Titrace probíhala až do vzniku hnědočerveně zbarvené sraženiny v bodě ekvivalence. Stanovení obsahu sušiny probíhalo do konstantního úbytku hmotnosti v sušárně vyhřáté na $102 \pm 2^\circ\text{C}$.

5.4 Texturní profilová analýza

Pro texturní profilovou analýzu byl použit texturní analyzátor TA.XT Plus (Stable Micro Systems, Velká Británie) s rozsahem měřící cely 30 kg. Sledovanými parametry byla tvrdost, relativní lepivost a kohezivnost. Hodnota tvrdosti [N] byla získána jako maximální síla naměřená během testu. Válcový vzorek o průměru 40 mm a výšce 20 mm byl vykrojen ze středu analyzovaného vzorku a vložen mezi desky analyzátoru, které jej stlačily o 20 % původní výšky s konstantní rychlostí 1 mm/s. Při měření byla použita sonda o průměru 50 mm. Vzniklé křivky byly následně vyhodnoceny programem Exponent Lite. Každý blok sýra byl analyzován jednou a pro jednotlivé typy vzorku byly použity 3 bloky.

5.5 Extrakce a stanovení biogenních aminů

Pro extrakci biogenních aminů sloužily předem připravené lyofilizáty vytvořené pomocí lyofilizátoru ALPHA1 – 4 LSC (Christ, Německo) za teploty -40°C a tlaku ~ 12 Pa během dvou dnů [17]. Ve zkumavce se 1 g naváženého lyofilizátu smíchal s 10 ml 0,1 M HCl a směs se 30 minut homogenizovala. Následovalo odstředování na odstředivce EBA 21 (HettichZENTRIFUGEN, Německo) po dobu 20 minut rychlostí 6000 ot./min. Vzniklý supernatant byl převeden do 25 ml odměrné baňky a sediment 2x reextrahován výše zmíněným způsobem s přidavkem 7 ml 0,1 M HCl. Odměrná baňka se supernatantem byla 0,1 M HCl doplněna po rysku, přefiltrována a připravená k derivatizaci.

Při derivatizaci bylo nutné převést 1 ml extraktu do derivatizační nádoby s přídavkem 1,5 ml uhličitánového pufru o pH 11,0 – 11,1. Derivatizace probíhala za použití dansylchloridu jako reakčního činidla, který byl v množství 2 ml o koncentraci 5 g/l v acetonu přidán k extraktu. Takto připravená směs byla třepána ve tmě po dobu 20 hodin. Po uplynutí požadované doby bylo ke směsi přidáno 200 µl roztoku prolinu a třepáno další hodinu na třepače. Následoval přídavek heptanu v množství 3 ml a směs bylo nutné 3 minuty ručně třepat. Ze vzniklé heptanové vrstvy byl 1 ml odpipetován do vialky, která byla odpařena do sucha proudem dusíku při teplotě 60°C a do vysušené vialky bylo přidáno 1,5 ml acetonitrilu pro zředění. Poté byla směs přefiltrována přes stříkačkový filtr s porozitou 0,22 µm a připravena k chromatografickému stanovení.

Analýza byla zaměřena na stanovení 8 biogenních aminů (histamin, tyramin, tryptamin, kadaverin, fenylethylamin, putrescin, spermin a spermidin) [79]. Separace probíhala s využitím HPLC s UV/VIS detektorem a kolonou o rozměrech 3 x 50 mm pro velikost částic 1,8 µm AgilentEclipse Plus C18RRHD (Agilent Technologies, USA). Vlnová délka byla nastavena na 254 nm a teplota kolony odpovídala 30°C. Standardy biogenních aminů byly od společnosti Sigma Aldrich (St. Louis, USA).

5.6 Mikrobiologická analýza

Předmětem diplomové práce bylo posouzení vyrobených sýrů z hlediska mikrobiologického. Analýza vzorků probíhala na Ústavu inženýrství ochrany životního prostředí. Sledovanými mikroorganismy byly laktokoky, laktobacily, enterokoky, čeleď *Enterobacteriaceae* a celkové počty mikroorganismů (CPM). Pro každý typ MO byla použita různá kulturační média:

M17 agar – určen k detekci mléčných koků (laktokoky, leukonostoky, streptokoky) a jejich bakteriofágů,

MRS agar – diagnostické kulturační médium určené pro stanovení počtu laktobacilů,

SB (Slanetz – Bartley agar) – médium určené pro stanovení počtu enterokoků,

VČŽL agar – selektivní živná půda k průkazu a stanovení počtu koliformních MO obsahující krystalovou violet, žluč a laktózu,

PCA (Plate count agar) – neselektivní půda určená pro stanovování celkových počtů mikroorganismů (mezofilní aerobní a fakultativně anaerobní MO).

Podmínky kultivace pro jednotlivé živné půdy jsou uvedeny v tabulce 4.

Tabulka 4 – Podmínky kultivace.

Typ půdy	Teplota kultivace	Doba kultivace
M17	37°C	72 hodin
MRS	37°C	72 hodin
SB	37°C	72 hodin
VČŽL	37°C	24 hodin
PCA	30°C	72 hodin

Příprava jednotlivých kultivačních půd spočívala v navážení určitého množství suroviny dle návodu na obalu přepočtené na 400 ml destilované vody. Kultivační média byla vložena do autoklávu 135S Compact (VARIOKLAV®, Německo) a sterilována při teplotě 121,1°C po dobu 20 minut. Poté se média rozlila do Petriho misek a nechala ztuhnout.

Ze sýru byl ze tří různých míst odebrán vzorek v množství 10 g a s 90 ml fyziologického roztoku byl homogenizován v homogenizátoru Masticator Silver (Biotech, Česká republika) po dobu asi 3 minut. Ze vzniklé suspenze bylo odebráno 0,5 ml a zředěno s 4,5 ml sterilního fyziologického roztoku, čímž se docílilo ředění 10^{-2} . Poté se odebralo opět 0,5 ml suspenze a přidalo k 4,5 ml fyziologického roztoku (ředění 10^{-3}). Tímto postupem se pokračovalo až k dosažení ředění 10^{-8} . Z takto připravených zkumavek se pak 0,5 ml suspenze očkovalo na příslušná kultivační média.

5.7 Senzorická analýza

K senzorické analýze sloužil vzorek sýra po 3. měsících zrání obou výrob. Hodnocení se účastnilo celkem 11 posuzovatelů vybraných ze studentů a zaměstnanců, kteří absolvovali seminář senzorické analýzy a byli tak seznámeni s podmínkami a způsoby hodnocení potravin. Bochník sýra byl nakrájen na 11 přibližně stejně velkých kousků a předložen panelu hodnotitelů spolu s bílým pečivem jako neutralizátorem.

Senzorické hodnocení bylo provedeno s využitím stupnicové metody a párového preferenčního testu. U stupnicové metody byla využita sedmibodová ordinální stupnice s charakteristikou každého stupně. Hodnotícími parametry byly vzhled a barva, konzistence, chuť a vůně, tuhost a cizí pachuti. U párového preferenčního testu bylo úkolem posuzovatelů určit, který ze dvou vzorků upřednostňují. Dotazník použitý k sensorickému hodnocení je uveden v příloze I.

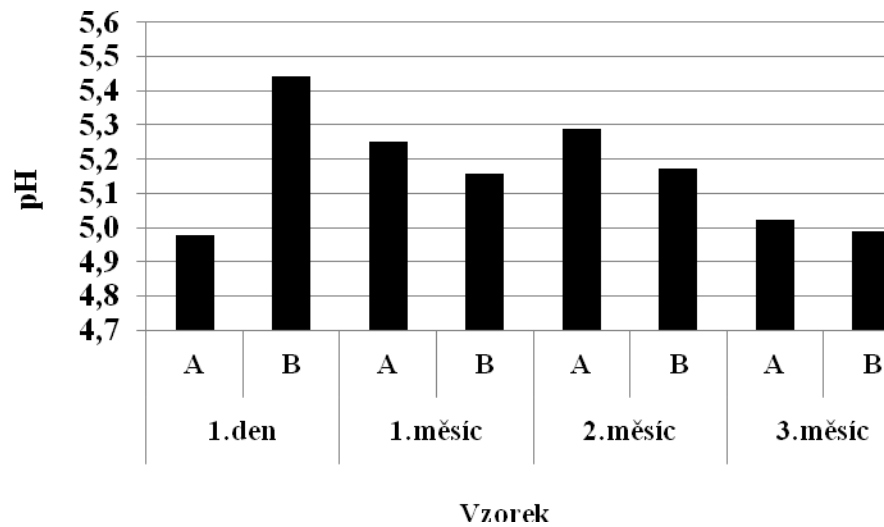
6 VÝSLEDKY A DISKUZE

6.1 Základní chemická analýza

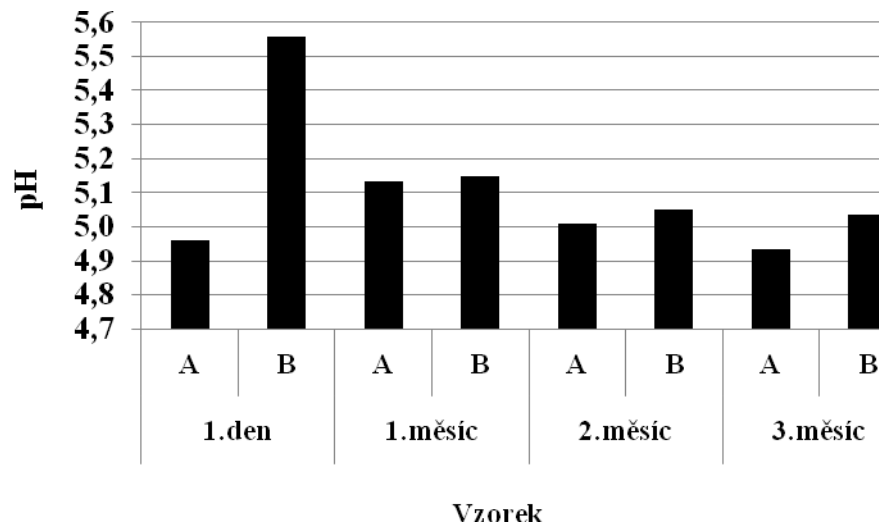
Hodnota pH u 1. i 2. série měla klesající charakter po celou dobu zrání zejména u výroby B - s přidávkem dekarboxyláza pozitivního kmene. V první sérii výroby sýrů byla nejnižší hodnota pH $4,98 \pm 0,02$ naměřena 1. den před solením u kontrolní (A) výroby. Maximální hodnoty pH v kontrolní výrobě $5,29 \pm 0,01$ bylo dosaženo ve 2. měsíci zrání, poté hodnoty pH klesaly. U výroby B byla v první den hodnota pH $5,44 \pm 0,38$ a během zrání po dobu 3. měsíců klesla až na $4,99 \pm 0,12$. Druhá série výroby sýrů měla obdobný charakter jako první, přičemž u kontrolní výroby se hodnoty pH pohybovaly v rozmezí 4,96 (1. den zrání) - 4,93 (3. měsíc). U výroby B byla nejvyšší hodnota pH $5,56 \pm 0,38$ první den před solením a postupně klesala až na hodnotu $5,03 \pm 0,16$ ve 3. měsíci zrání. Hodnoty pH obou sérií výrob jsou znázorněny v grafu 1 – 2.

Obsah sušiny během celého měření kolísal a to jak u první tak i druhé série sýrů. V první den solení se obsah sušiny první série pohyboval v rozmezí 49,86 (A) – 50,11 (B) %. Nejnižší sušina první série pak byla naměřena ve výrobě A $49,39 \pm 0,36$ % (w/w) i v B výrobě $49,29 \pm 0,19$ % ve 3. měsíci zrání. Nejvyšší obsah sušiny byl naměřen u výroby B první den před solením, kdy dosáhl $50,11 \pm 0,55$ % (w/w). V druhé sérii sýrů obsah sušiny klesl z hodnoty $51,96 \pm 1,28$ % získané první den před solením (B) až k hodnotě $49,03 \pm 2,25$ % (w/w) ve 2. měsíci (B). Poté došlo k prudkému nárůstu až na obsah sušiny $51,21 \pm 0,78$ % (w/w). U výroby A byl největší obsah sušiny $50,81 \pm 0,69$ % (w/w) zaznamenán v první den a naopak nejmenší $49,43 \pm 6,83$ % (w/w) hned v prvním měsíci zrání. Obsah sušiny pro jednotlivé vzorky je graficky zobrazen v grafu 3 – 4.

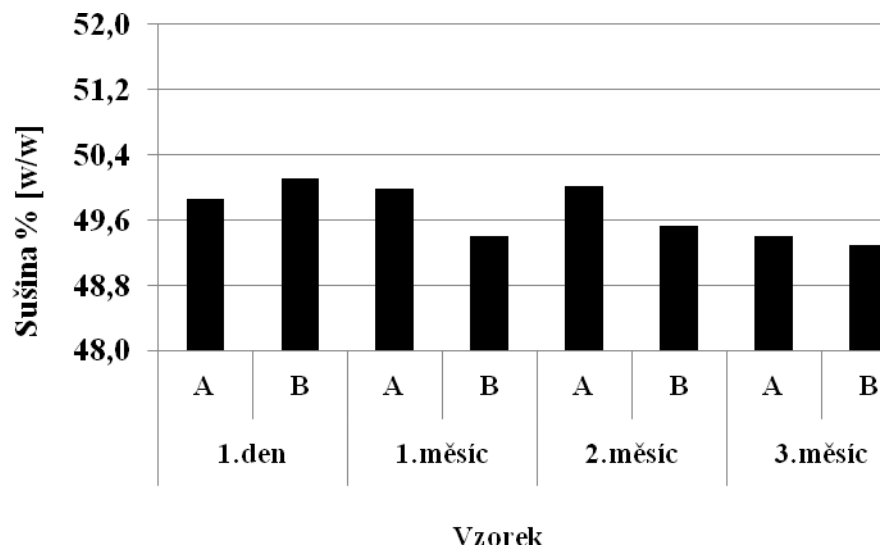
Koncentrace soli v prvních dnech zrání byla zanedbatelná a pohybovala se v rozmezí od 0,22 - 0,31 %. Po nasolení sýrů došlo k masivnímu nárůstu obsahu soli, přičemž konečná hodnota koncentrace NaCl byla po 3. měsících zrání $1,89 \pm 0,02$ % NaCl (výroba A) a $2,06 \pm 0,02$ % (výroba B). Vývoj obsahu soli v sýrech se výrazně neměnil a byl poměrně stálý, jak lze pozorovat v Grafu 6. V první sérii (Graf 5) byly z grafu vyloučeny výsledky měření ve 2. měsíci zrání z důvodu výskytu odlehlých hodnot, které z logiky a znalosti procesů nemohly odpovídat skutečnosti.



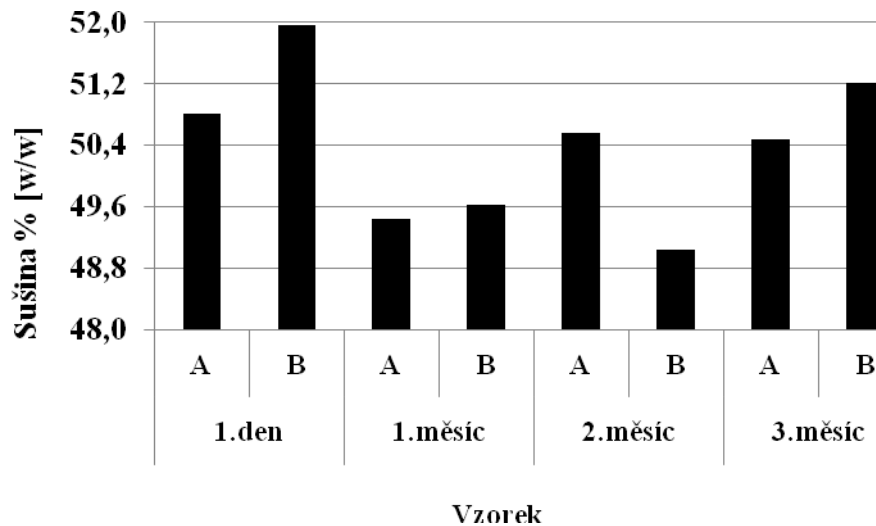
Graf 1 - Vývoj pH v průběhu zrání u vzorků sýrů první série; kde: A – kontrolní výroba, B – s přidavkem dekarboxyláza pozitivního kmene.



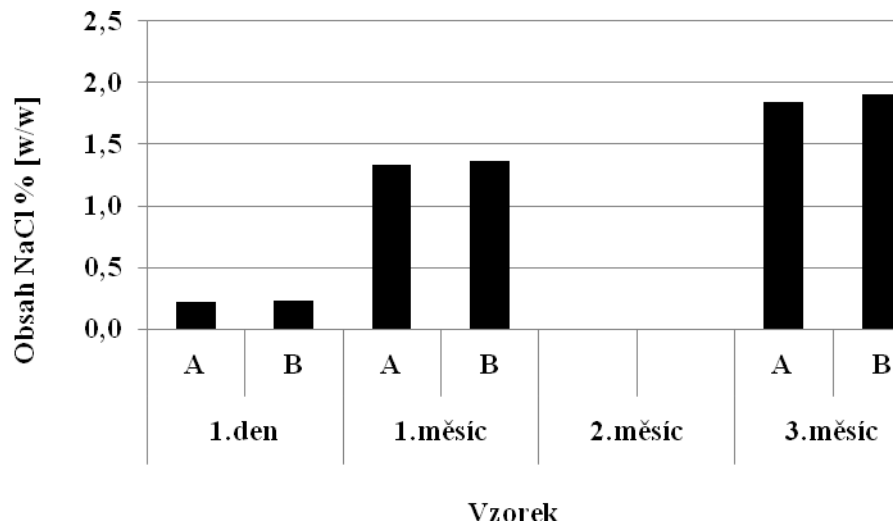
Graf 2 - Vývoj pH v průběhu zrání u vzorků sýrů druhé série; kde: A – kontrolní výroba, B – s přidavkem dekarboxyláza pozitivního kmene.



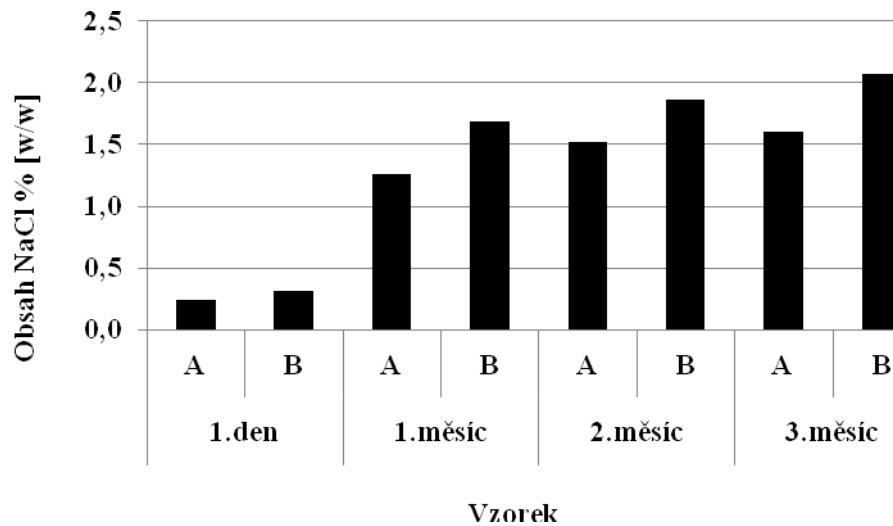
Graf 3 - Vývoj obsahu sušiny v průběhu zrání u vzorků sýrů první série; kde: A – kontrolní výroba, B – s přidavkem dekarboxyláza pozitivního kmene.



Graf 4 - Vývoj obsahu sušiny v průběhu zrání u vzorků sýrů druhé série; kde: A – kontrolní výroba, B – s přidavkem dekarboxyláza pozitivního kmene.



Graf 5 - Koncentrace NaCl v průběhu zrání u vzorků sýrů první série; kde: A – kontrolní výroba, B – s přidavkem dekarboxyláza pozitivního kmene.



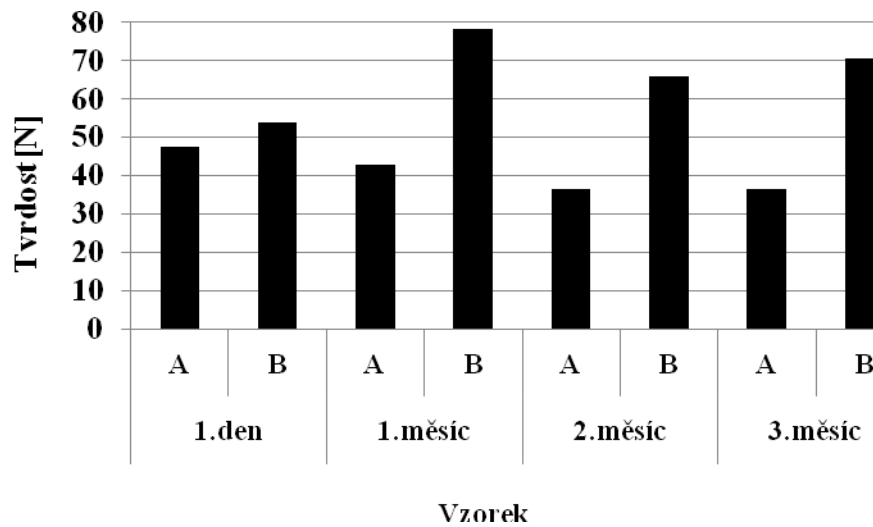
Graf 6 - Koncentrace NaCl v průběhu zrání u vzorků sýrů druhé série; kde: A – kontrolní výroba, B – s přidavkem dekarboxyláza pozitivního kmene.

6.2 Texturní profilová analýza

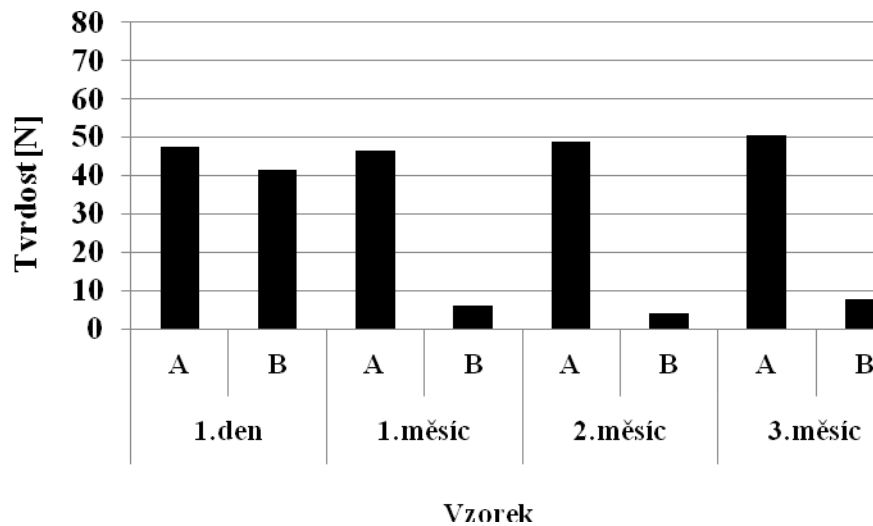
V první sérii byla tvrdost sýrů zaznamenána v rozmezí hodnot 36,46 – 78,21 N. Největší tvrdosti ($78,21 \pm 0,50$ N) dosáhl vzorek sýra B po 1. měsíci zrání. Ve výrobě A tvrdost postupně klesala, až k hodnotě $36,46 \pm 0,17$ N. U sýrů B byla konečná hodnota tvrdosti po 3. měsících zrání $70,69 \pm 0,86$ N. Druhá série výroby sýrů vykazovala v případě kontrolních vzorků A poměrně stálé hodnoty pohybující se od $47,38 \pm 0,56$ v prvním dni zrání, $46,50 \pm 0,51$ po 1. měsíci zrání, $48,99 \pm 0,20$ po 2. měsících zrání a $50,59 \pm 0,14$ N na konci po 3. měsících. První den zrání u výroby B odpovídala tvrdost hodnotě $41,48 \pm 0,79$ N a následně došlo k extrémnímu poklesu až k hodnotě $5,89 \pm 0,20$ a na konci měření pak $7,65 \pm 0,35$ N. Delší doba sýření, neadekvátní dávka CaCl_2 či vyšší množství MO v zákysu mohlo způsobit výrazně měkčí konzistenci sýrů druhé série u výroby B. Vývoj tvrdosti v průběhu zrání sýrů první i druhé série je viditelné v Grafu 7 – 8.

Relativní lepivost při měření první série se s dobou skladování zvyšovala. V první den se pohybovala v rozmezí 0,02 – 0,04. Po třech měsících zrání se lepivost dostala na hodnotu $0,057 \pm 0,040$ u kontrolní výroby a $0,035 \pm 0,010$ ve výrobě B. Celkově nižší hodnoty relativní lepivosti tedy vykazovala výroba B. Analýzou druhé série vyrobených sýrů, se u výroby A prokázaly téměř shodné hodnoty relativní lepivosti během celého zracího procesu ve srovnání se sérií 1. Ve výrobě s přidavkem dekarboxyláza pozitivního kmene došlo k prudkému nárůstu lepivosti již v prvním měsíci zrání z hodnoty $0,008 \pm 0,001$ na $0,24 \pm 0,04$. Vrcholu $0,36 \pm 0,16$ dosáhla lepivost v 2. měsíci. Relativní lepivost souvisí s měkkou konzistencí sýrů výroby B druhé série, proto i důvody vzniku těchto odchylek od normálu jsou shodné. Výsledky měření relativní lepivosti první a druhé série jsou v Grafu 9 a 10.

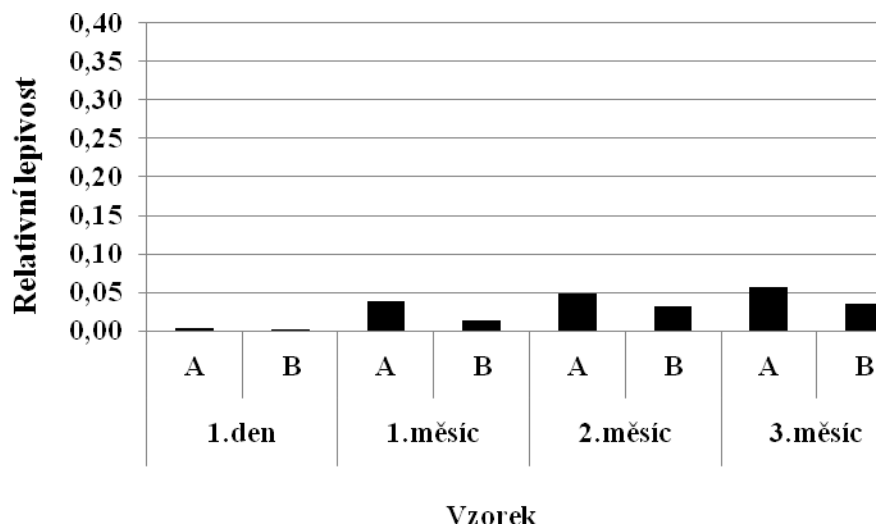
Graf 11 – 12 zobrazuje kolísavý vývoj kohezivnosti sýrů v průběhu zrání. Hodnoty kohezivnosti první série byly nejvyšší v první den zrání u obou výrob a pohybovaly se mezi 0,81 a 0,82. Při srovnání jednotlivých sérií vzorků vykazují oba grafy klesající charakter do 2. měsíce zrání, kde je kohezivnost v rozmezí hodnot 0,75 - 0,76 (A) a 0,74 – 0,78 (B). Během posledního měsíce zrání se měřením prokázal vzestup na konečné hodnoty první série 0,77 – 0,80. Kohezivnost v druhé sérii dosáhla maximálních hodnot v rozmezí 0,76 (A) – 0,78 (B) Kohezivnost vykazovala kolísavý charakter u obou výrob, přidavek dekarboxyláza pozitivního kmene tedy zásadně neovlivňuje tento zkoumaný texturní parametr.



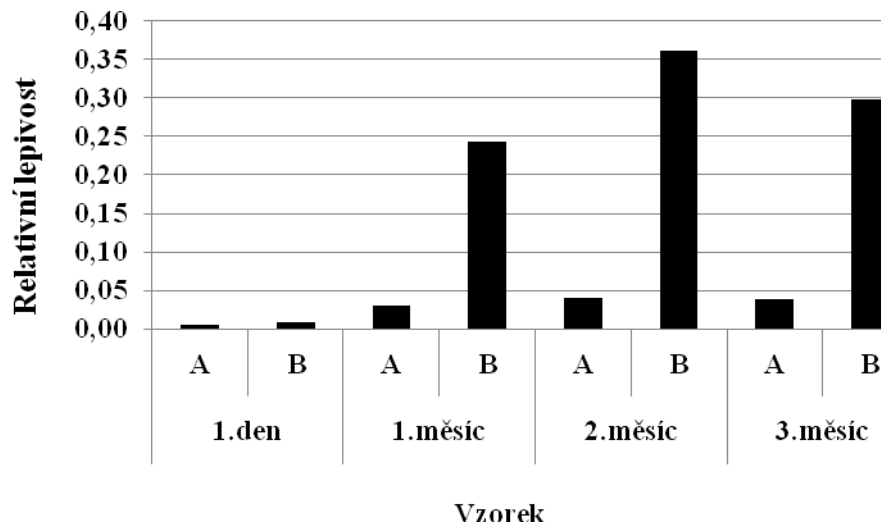
Graf 7 - Vývoj tvrdosti v průběhu zrání u vzorků sýrů první série; kde: A – kontrolní výroba, B – s přidavkem dekarboxyláza pozitivního kmene.



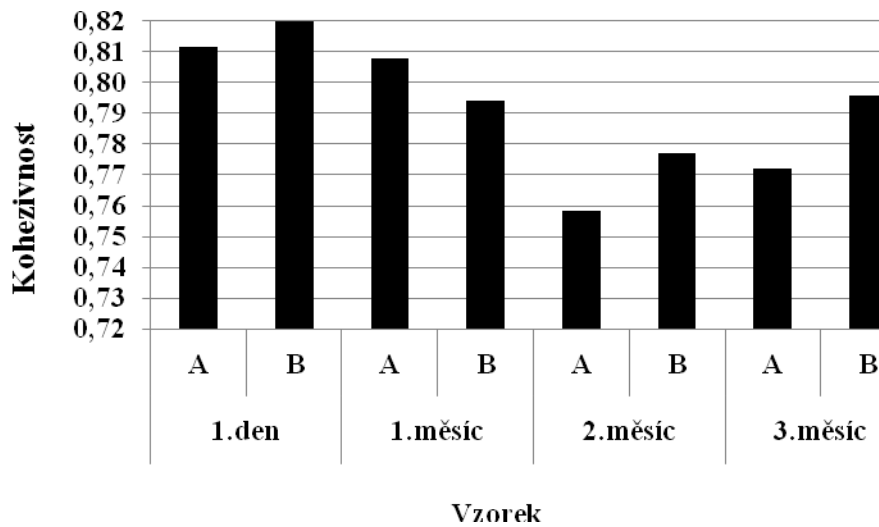
Graf 8 - Vývoj tvrdosti v průběhu zrání u vzorků sýrů druhé série; kde: A – kontrolní výroba, B – s přidavkem dekarboxyláza pozitivního kmene.



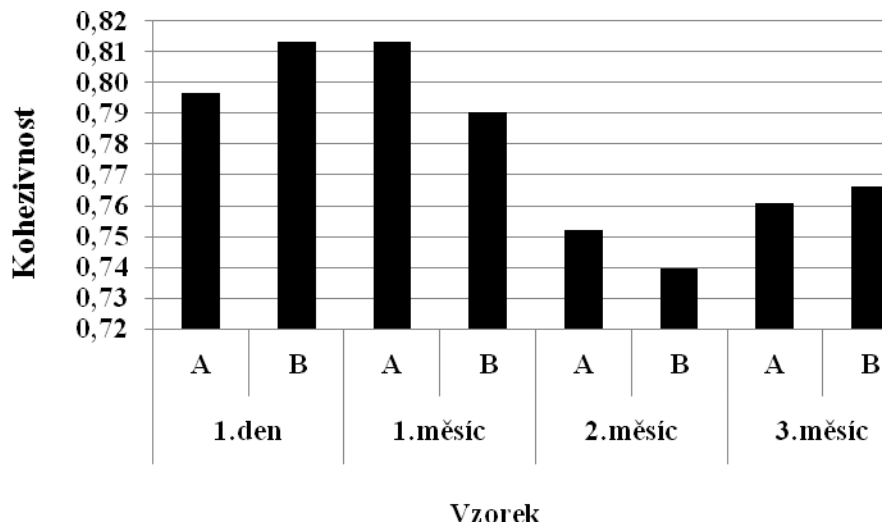
Graf 9 - Vývoj relativní lepivosti v průběhu zrání u vzorků sýrů první série; kde: A – kontrolní výroba, B – s přidavkem dekarboxyláza pozitivního kmene.



Graf 10 - Vývoj relativní lepivosti v průběhu zrání u vzorků sýrů druhé série; kde: A – kontrolní výroba, B – s přidavkem dekarboxyláza pozitivního kmene.



Graf 11 - Vývoj kohezivnosti v průběhu zrání u vzorků sýrů první série; kde: A – kontrolní výroba, B – s přidavkem dekarboxyláza pozitivního kmene.



Graf 12 - Vývoj kohezivnosti v průběhu zrání u vzorků sýrů druhé série; kde: A – kontrolní výroba, B – s přidavkem dekarboxyláza pozitivního kmene.

6.3 Extrakce a stanovení biogenních aminů

Celková koncentrace biogenních aminů v jednotlivých zákysech byla značně odlišná v důsledku použití dekarboxyláza pozitivního kmene v případě výroby B. Při výrobě sýrů první série (viz. Tabulka 5) bylo ve smetanovém zákyse před prokysáním (Az1) zjištěno množství biogenních aminů $7,9 \pm 0,1$ mg/l. Po prokysání (Az2) tato hodnota vzrostla na $31,8 \pm 0,4$ mg/l. Počáteční koncentrace BA v bujónovém zákyse pro výrobu B (BzB1) byla $5,6 \pm 0,2$ mg/l, prokysáním (BzB2) došlo k nárůstu na $684,1 \pm 20,4$ mg/l. Před prokysáním bylo ve smetanovém zákyse pro výrobu B (BzA1) zaznamenáno množství biogenních aminů $6,1 \pm 0,2$ mg/l. Koncentrace prokysáním vzrostla na $19,2 \pm 0,8$ mg/l smetanového zákyse pro výrobu B. Smetanový zákyas (Az1) pro druhou sérii sýrů (viz. Tabulka 6) obsahoval před prokysáním $8,9 \pm 1,0$ mg/l biogenních aminů. K nárůstu došlo po prokysání (Az2) na hodnotu $25,1 \pm 0,5$ mg/l. V bujónu pro výrobu B (BzB1) bylo zaznamenáno $4,3 \pm 0,3$ mg/l BA, poté (BzB2) koncentrace vzrostla na $721,5 \pm 31,2$ mg/l zákyse. Detekci BA byl podroben i smetanový zákyas pro výrobu B (BzA1), který před prokysáním vykazoval množství biogenních aminů $6,8 \pm 0,2$ mg/l. Prokysáním (BzA2) se hodnota BA zvýšila na $16,7 \pm 0,6$ mg/l zákyse.

U sýrů obou sérií bylo prokazatelně vyšší množství biogenních aminů zaznamenáno u výroby B, tedy s přidavkem dekarboxyláza pozitivního kmene. Koncentrace se zvyšovala lineárně s dobou zrání. U výroby A (série 1. i 2.) bylo v 1. den zrání naměřeno množství biogenních aminů v rozmezí 31,4 – 33,7 mg/kg a maximální hodnota získaná na konci zrání pak odpovídala průměrně $130,8 \pm 2,2$ mg/kg. V první sérii vzorků výroby B byla počáteční koncentrace BA v sýrech $41,1 \pm 0,6$ mg/kg. Po měsíci zrání obsah stoupl na $270,6 \pm 4,5$ mg/kg BA v čerstvé hmotě sýra, ve dvou měsících přesáhla hodnota 400 mg/kg a na konci zrání se zastavila na $727,3 \pm 11,2$ mg/kg. Druhá série téměř kopírovala vývoj biogenních aminů v sérii 1. Počáteční koncentrace odpovídala $48,5 \pm 0,6$ mg/kg, v prvním měsíci přeskočila hodnotu 260 mg/kg a ve třetím měsíci byl konečný obsah biogenních aminů $696,1 \pm 12,7$ mg/kg. Výše uvedené koncentrace biogenních aminů v sýrech představuje Graf 13 – 14.

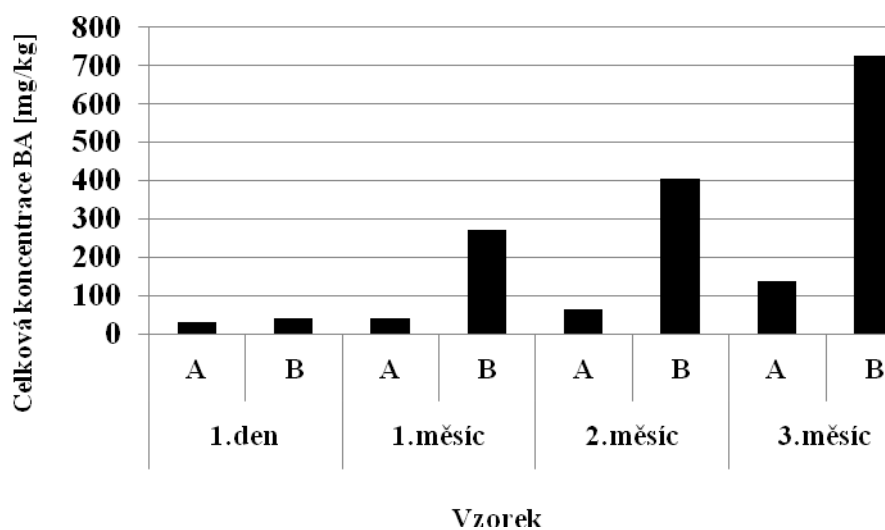
V průběhu zrání sýrů byl pozorován vývoj a množství biogenních aminů. Z osmi sledovaných aminů byly prokázány pouze 4 z nich. Koncentrace histaminu, fenylethylaminu, kadaverinu a tryptaminu byla během celého zracího procesu nulová a jejich přítomnost nebyla zaznamenána ani v zákysech pro výrobu sýrů. Nejméně produkovaným biogenním

aminem byl spermidin, přičemž jeho koncentrace nepřesáhla hodnotu 2 mg/kg po celou dobu zrání. Dalším nejméně vznikajícím aminem byl putrescin, který dosáhl své nejvyšší koncentrace $17,8 \pm 1,1$ mg/kg ve třetím měsíci zrání. Na celkovém obsahu biogenních aminů v sýrech se v množství průměrně $22,4 \pm 1,1$ mg/kg (A) a $26,4 \pm 1,5$ mg/kg (B) podílel spermin. Nejvyšších koncentrací BA v sýrech dosahoval tyramin (Graf 15 – 16). Ve výrobě A byla jeho počáteční koncentrace v rozmezí 6,4 – 8,2 mg/kg. Na konci zrání byla hodnota tyraminu v kontrolních vzorcích sýrů v rozmezí 75,5 – 87,2 mg/kg. Ve výrobě B byl obsah tyraminu několikanásobně vyšší. Z hodnoty $20,7 \pm 1,2$ mg/kg (v 1. sérii) vzrostl obsah tyraminu ve 3. měsíci zrání na $676,9 \pm 41,4$ mg/kg, přičemž celková koncentrace biogenních aminů byla $727,3 \pm 11,2$ mg/kg čerstvé hmoty sýrů. V druhé sérii vzorků byla v prvním dni měření zjištěna hodnota tyraminu $26,6 \pm 1,1$ mg/kg z celkového množství BA $48,5 \pm 0,6$ mg/kg. V důsledku 3. měsíčního zrání se na celkové produkci vzniklých biogenních aminů v koncentraci $696,1 \pm 12,7$ mg/kg podílel v množství $644,0 \pm 48,0$ mg/kg právě tyramin.

Tabulka 5 – Koncentrace biogenních aminů v zákysech první série.

Zákysy před pro- kysáním	Koncentrace BA [mg/l]	Zákysy po pro- kysání	Koncentrace BA [mg/l]
Az1	$7,9 \pm 0,1$	Az2	$31,8 \pm 0,4$
BzB1	$5,6 \pm 0,2$	BzB2	$684,1 \pm 20,4$
BzA1	$6,1 \pm 0,2$	BzA2	$19,2 \pm 0,8$

Kde: Az – smetanový záky; BzB – bujónový záky pro výrobu B; BzA - smetanový záky pro výrobu B; 1- odběr před prokysáním; 2 – odběr po prokysání.

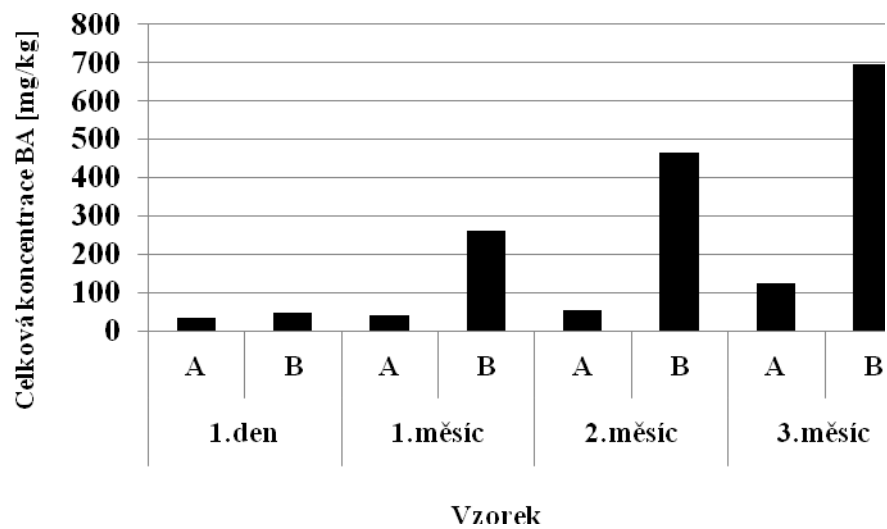


Graf 13 - Celkové koncentrace biogenních aminů u vzorků sýrů první série; kde: A – kontrolní výroba, B – s přidavkem dekarboxyláza pozitivního kmene.

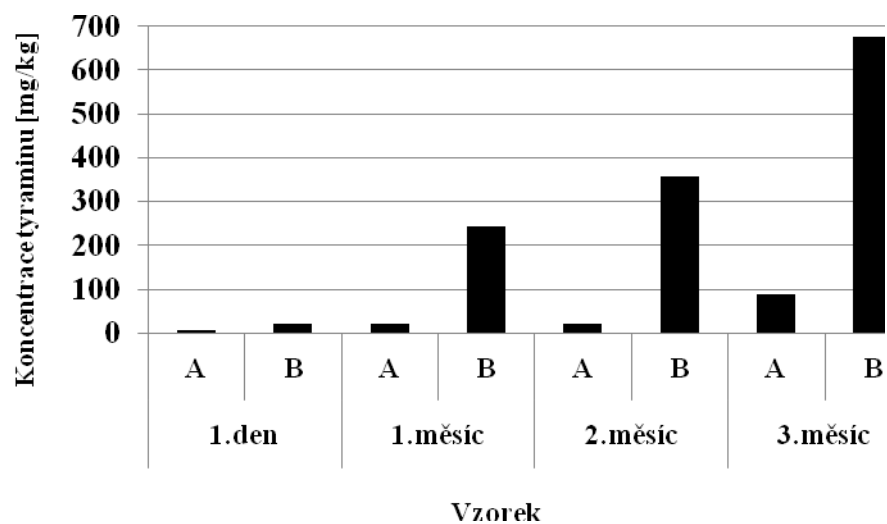
Tabulka 6 - Koncentrace biogenních aminů v zákyselch druhé série.

Zákysy před prokysáním	Koncentrace BA [mg/l]	Zákysy po prokysání	Koncentrace BA [mg/l]
Az1	8,9 ± 1,0	Az2	25,1 ± 0,5
BzB1	4,3 ± 0,3	BzB2	721,5 ± 31,2
BzA1	6,8 ± 0,2	BzA2	16,7 ± 0,6

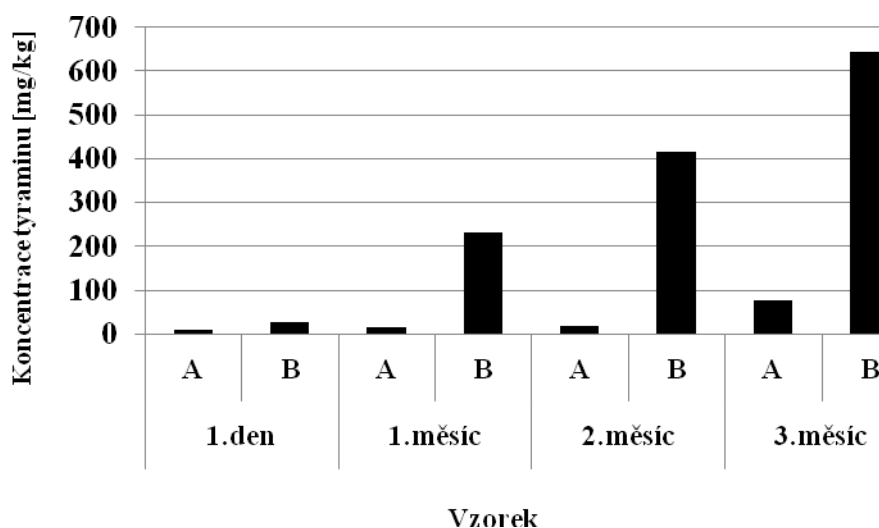
Kde: Az – smetanový zákys; BzB – bujónový zákys pro výrobu B; BzA - smetanový zákys pro výrobu B; 1- odběr před prokysáním; 2 – odběr po prokysání.



Graf 14 - Celkové koncentrace biogenních aminů u vzorků sýrů druhé série; kde: A – kontrolní výroba, B – s přidavkem dekarboxyláza pozitivního kmene.



Graf 15 - Celkové koncentrace tyraminu u vzorků sýrů první série; kde: A – kontrolní výroba, B – s přidavkem dekarboxyláza pozitivního kmene.



Graf 16 - Celkové koncentrace tyraminu u vzorků sýrů druhé série; kde: A – kontrolní výroba, B – s přidavkem dekarboxyláza pozitivního kmene

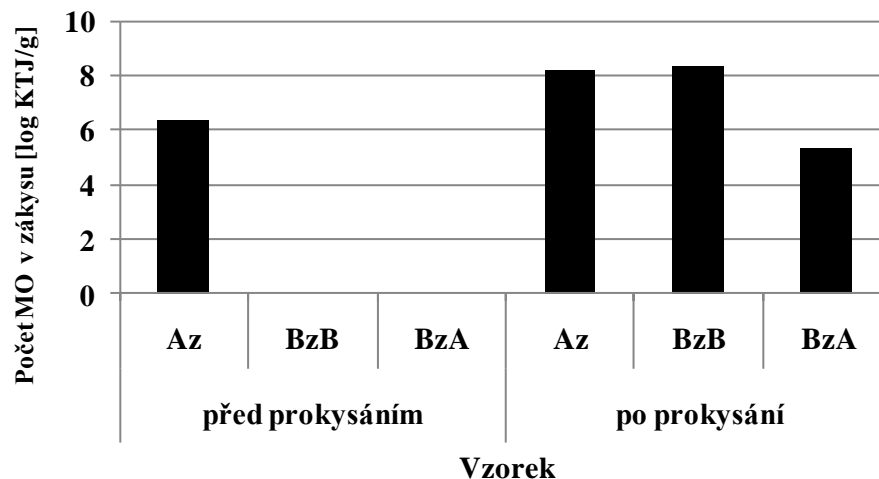
6.4 Mikrobiologická analýza

Mikrobiologická analýza sloužila k posouzení změn v zastoupení jednotlivých skupin mikroorganismů v průběhu zrání sýrů vyrobených z komerčního smetanového zákysu ve srovnání se sýry s přidavkem dekarboxyláza pozitivního kmene.

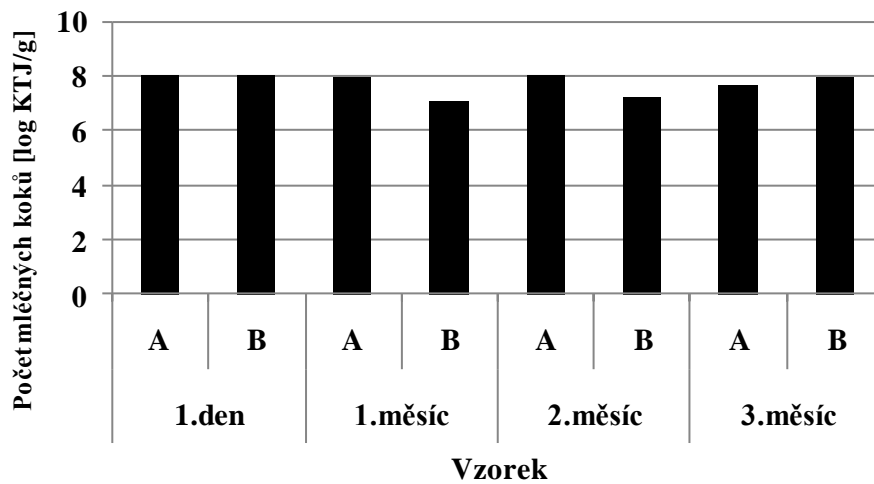
6.4.1 Výsledky stanovení počtu mléčných koků

Mikrobiologickou analýzou zákysů pro výrobu sýrů 1. série bylo před prokysáním ve smetanovém zákysu pro kontrolní výrobu detekována přítomnost mléčných koků v množství $(2,0 \pm 0,1) \cdot 10^6$ KTJ/ml. Po prokysání došlo k pomnožení mléčných koků na hodnotu $(1,5 \pm 0,1) \cdot 10^8$ KTJ/ml zákysu. V bujónu a smetanovém zákysu pro výrobu B před prokysáním nebyla přítomnost mléčných koků zjištěna. Po prokysání byla hodnota v bujónu $(2,2 \pm 0,1) \cdot 10^8$ KTJ/ml a ve smetanovém zákysu pak $(2,0 \pm 0,1) \cdot 10^5$ KTJ/ml. Grafické znázornění změn v počtu mléčných koků v jednotlivých sériích je v Grafu 17 a 19. Přítomnost mléčných koků ve vzorcích sýrů 1. série byla u obou výrob podobná. U výroby A byla nejvyšší koncentrace zaznamenána 1. den zrání a to $(1,0 \pm 0,1) \cdot 10^8$ KTJ/g vzorku, u výroby s přidavkem dekarboxyláza pozitivního kmene pak $(1,1 \pm 0,1) \cdot 10^8$ KTJ/g. Nejnižší koncentrace mléčných koků ve výrobě A byla detekována ve 3. měsíci zrání v množství $(5,0 \pm 0,1) \cdot 10^7$ KTJ/g.

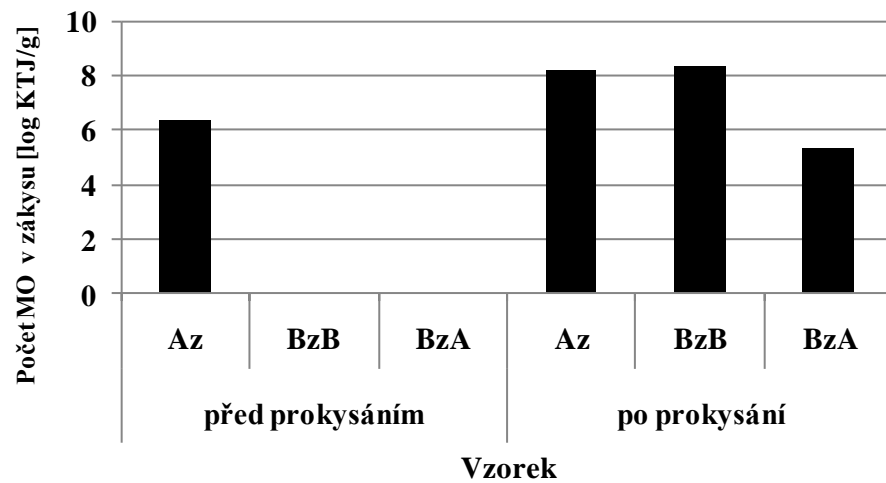
V 2. sérii sýrů byla koncentrace mléčných koků velice podobná. Hodnota v bujónu a smetanovém zákysu pro výrobu B byla před prokysáním nulová. Po prokysání byla hodnota v bujónu $(2,3 \pm 0,1) \cdot 10^8$ KTJ/ml a ve smetanovém zákysu $(2,0 \pm 0,1) \cdot 10^6$ KTJ/ml. V sýrech druhé série byla koncentrace mléčných koků vyšší ve výrobě B. Ve výrobě A se počet koků pohyboval v první den zrání $(8,7 \pm 0,1) \cdot 10^8$ KTJ/g a na konci, po 3. měsících zrání pak $(4,0 \pm 0,1) \cdot 10^5$ KTJ/g. Změny v počtu mléčných koků v obou sériích sýrů jsou čitelné v Grafu 18 a 20.



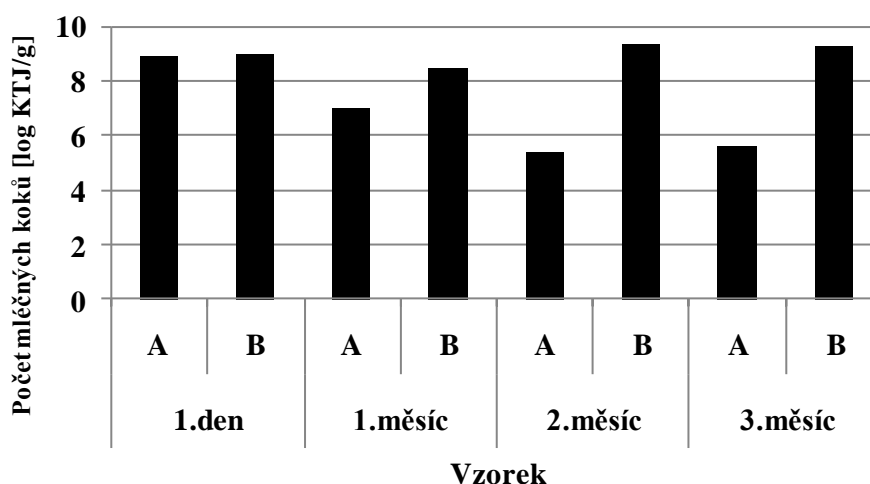
Graf 17 - Grafické znázornění změn v počtu mléčných koků v jednotlivých typech vzorků zákysů první série; kde: Az – smetanový zákys; BzB – bujónový zákys; BzA – smetanový zákys pro výrobu B.



Graf 18 - Grafické znázornění změn v počtu mléčných koků v první sérii vzorků; kde: A – kontrolní výroba, B – s přidavkem dekarboxyláza pozitivního kmene.



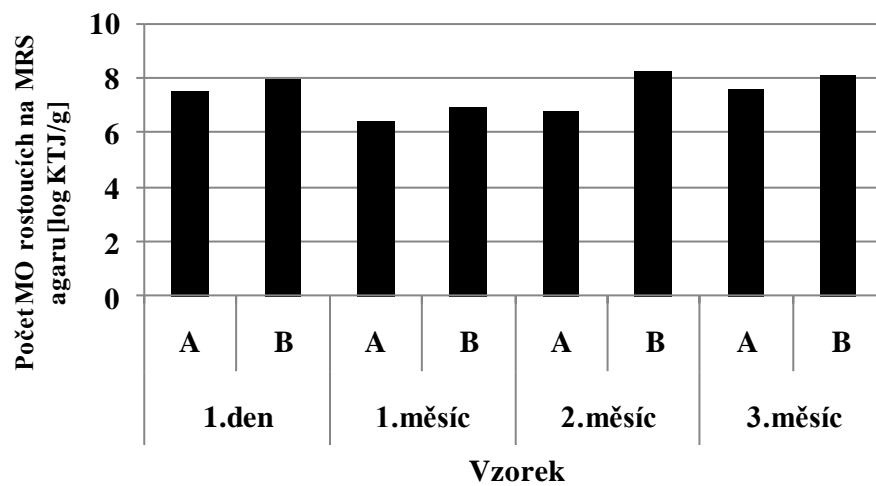
Graf 19 - Grafické znázornění změn v počtu mléčných koků v jednotlivých typech vzorků zákysů druhé série; kde: Az – smetanový zákys; BzB – bujónový zákys; BzA – smetanový zákys pro výrobu B.



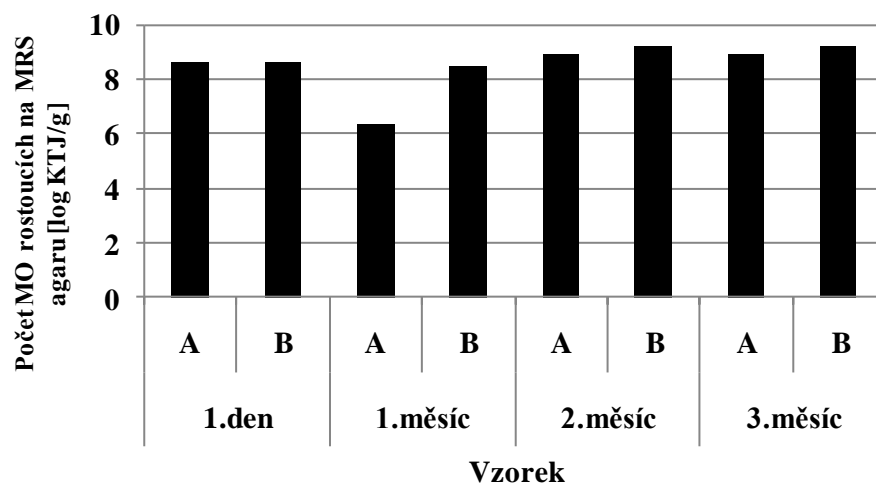
Graf 20 - Grafické znázornění změn v počtu mléčných koků v druhé sérii vzorků; kde: A – kontrolní výroba, B – s přidavkem dekarboxyláza pozitivního kmene.

6.4.2 Výsledky stanovení počtu bakterií rostoucích na MRS agaru

V průběhu zrání sýrů byl v sýrech 1. série zaznamenán počet bakterií v prvním dni ($3,0 \pm 0,1$). 10^7 KTJ/g ve výrobě A a ($8,0 \pm 0,1$). 10^7 KTJ/g ve výrobě B. V 1. měsíci zrání došlo ke snížení počtů bakterií na MRS agaru. V posledním měsíci zrání pak hodnota v počtu bakterií dosáhla ($4,0 \pm 0,1$). 10^7 KTJ/g (výroba A), ($1,2 \pm 0,1$). 10^8 KTJ/g (výroba B). Druhá série sýrů vykazovala vyšší počty mikroorganismů rostoucích na MRS agaru avšak stejně jako u předchozí série došlo v 1. měsíci zrání ke snížení počtu bakterií. Na začátku měření bylo v sýrech kontrolní výroby zjištěno ($4,0 \pm 0,1$). 10^8 KTJ/g a u výroby s přidavkem dekarboxyláza pozitivního kmene pak ($4,1 \pm 0,1$). 10^8 KTJ/g vzorku. U A výroby byl nejvyšší nárůst zaznamenán ve 3. měsíci zrání, kdy počet bakterií dosáhl hodnoty ($8,4 \pm 0,1$). 10^8 KTJ/g. Ve výrobě B bylo nejvyšší hodnoty ($1,5 \pm 0,1$). 10^8 KTJ/g dosaženo ve druhém měsíci zrání. Počty mikroorganismů rostoucích na MRS agaru jsou znázorněny v Grafu 21 – 22.



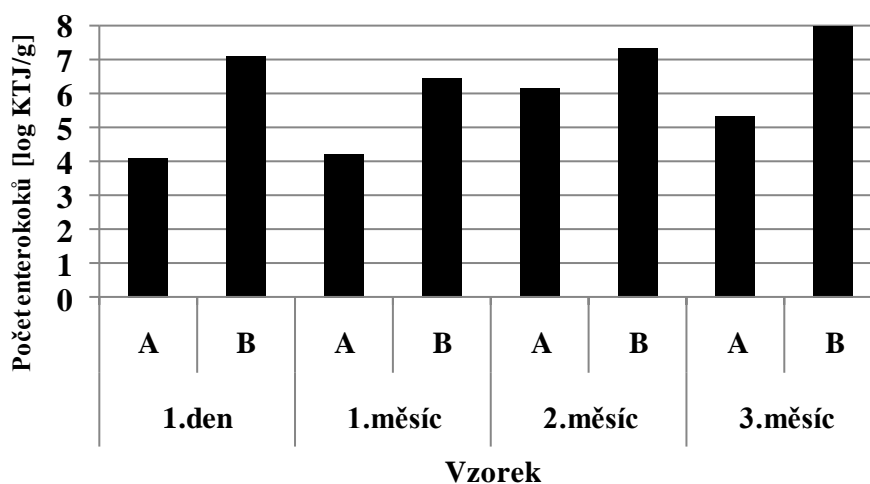
Graf 21 - Grafické znázornění změn v počtu bakterií rostoucích na MRS agaru v první sérii vzorků; kde: A – kontrolní výroba, B – s přidavkem dekarboxyláza pozitivního kmene.



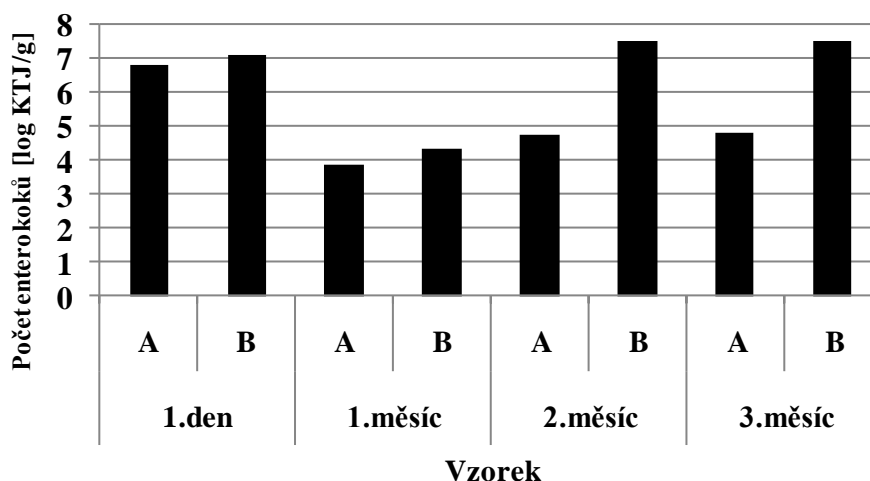
Graf 22 - Grafické znázornění změn v počtu bakterií rostoucích na MRS agaru v druhé sérii vzorků; kde: A – kontrolní výroba, B – s přidavkem dekarboxyláza pozitivního kmene.

6.4.3 Výsledky stanovení počtu enterokoků

Výsledky stanovení počtů enterokoků byly v obou sériích velice podobné až na rozdíl v hodnotách v první den zrání u výroby A, kdy u první série byly počty enterokoků během celé doby zrání nejnižší, kdežto u série 2. byly naopak nejvyšší. Ve výrobě B došlo v obou sériích k poklesu počtu enterokoků v 1. měsíci zrání. Poté následovalo zvýšení počtu k hodnotám $(2,1 \pm 0,1) \cdot 10^7$ KTJ/g (1. série, 2. měsíc) a $(3,2 \pm 0,1) \cdot 10^8$ KTJ/g (2. série, 2. měsíc). Ve třetím měsíci první série dosáhly počty enterokoků hodnot $(10,2 \pm 0,1) \cdot 10^8$ KTJ/g v druhé sérii byly téměř shodné s počty v druhém měsíci zrání. Výsledné hodnoty počtu enterokoků jsou v Grafu 23 – 24.



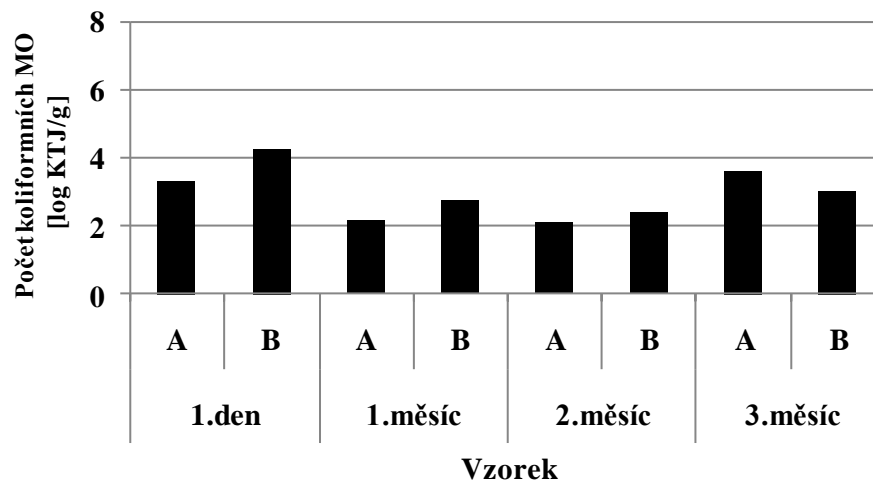
Graf 23 - Grafické znázornění změn v počtu enterokoků v první sérii vzorků; kde:
A – kontrolní výroba, B – s přidavkem dekarboxyláza pozitivního kmene.



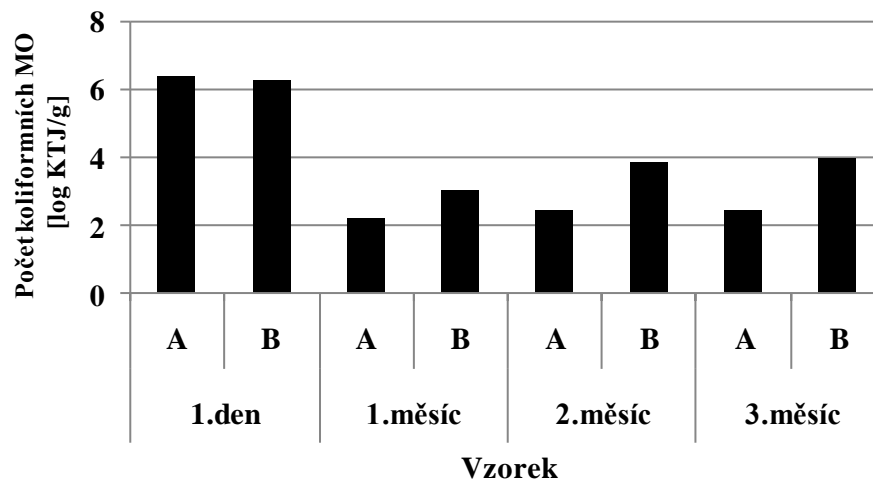
Graf 24 - Grafické znázornění změn v počtu enterokoků v druhé sérii vzorků; kde:
A – kontrolní výroba, *B* – s přidavkem dekarboxyláza pozitivního kmene.

6.4.4 Výsledky stanovení počtu koliformních MO

Počty koliformních MO (Graf 25 – 26) v sýrech byly po dobu celé analýzy v porovnání s ostatními zkoumanými mikroorganismy nízké, což vypovídá o dodržení hygienických předpokladů během výrobního procesu sýrů (zejména v první sérii). Nejvyšší počty koliformních MO byly prokázány v druhé sérii v první den zrání, kdy ve výrobě A dosahovaly $(2,3 \pm 0,1) \cdot 10^6$ KTJ/g. Hodnoty počtu koliformních MO byly nejnižší v 1. měsíci zrání u obou sérií, poté došlo pravděpodobně vlivem vhodných podmínek prostředí k pomnožení bakterií a ve třetím měsíci jejich počty z $(1,5 \pm 0,1) \cdot 10^2$ KTJ/g vzrostly na $(3,8 \pm 0,1) \cdot 10^3$ KTJ/g v případě výroby A. U výroby B pak z hodnoty $(1,0 \pm 0,1) \cdot 10^2$ KTJ/g na hodnotu $(9,0 \pm 0,1) \cdot 10^3$ KTJ/g sýra.



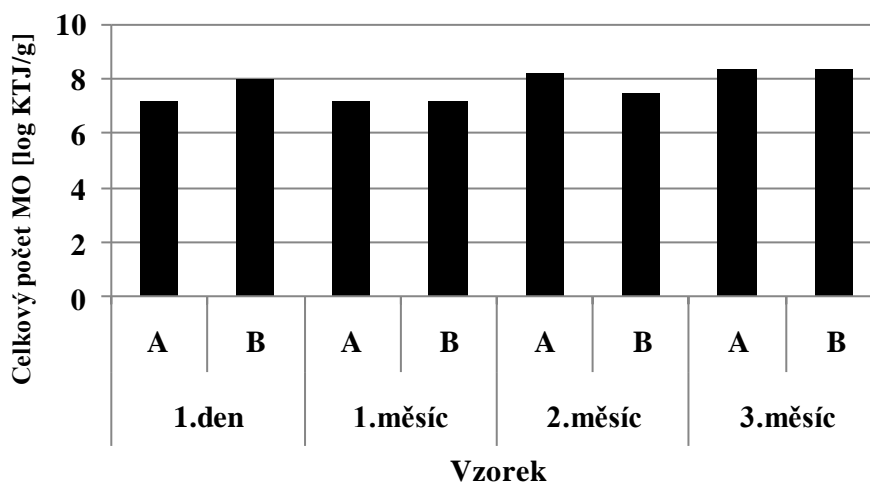
Graf 25 - Grafické znázornění změn v počtu koliformních MO v první sérii vzorků; kde: A – kontrolní výroba, B – s přidavkem dekarboxyláza pozitivního kmene.



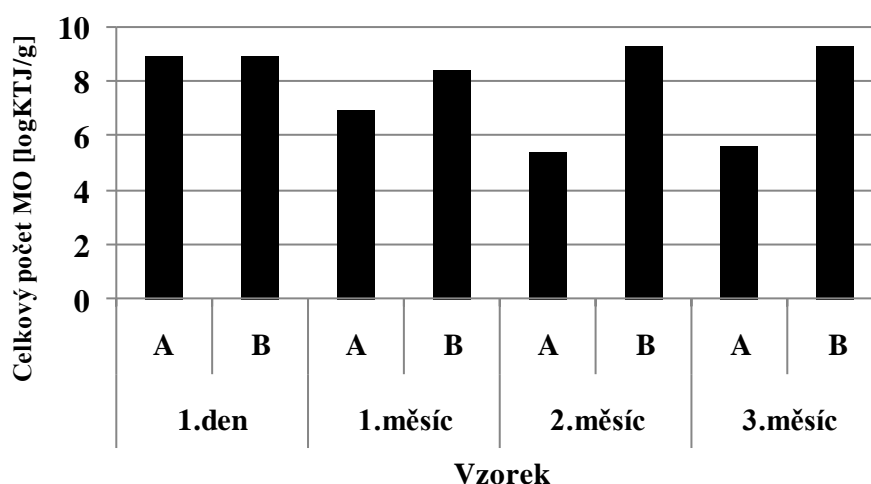
Graf 26 - Grafické znázornění změn v počtu koliformních MO v druhé sérii vzorků; kde: A – kontrolní výroba, B – s přidavkem dekarboxyláza pozitivního kmene.

6.4.5 Výsledky stanovení celkového počtu mikroorganismů

Výsledky počtu aerobních mezofilních a fakultativně anaerobních bakterií byly během doby zrání poměrně vyrovnané v rámci jedné série. V 1. sérii sýrů byl nejvyšší počet mikroorganismů zaznamenán ve 3. měsíci zrání ve výrobě A i výrobě B. Pohyboval se v rozmezí $(2,1 - 2,2) \cdot 10^8$ KTJ/g. Druhá série vykazovala nejvyšší hodnoty naopak v první den zrání v případě výroby A, poté postupně klesla na hodnotu $(5,4 \pm 0,1) \cdot 10^6$ KTJ/g zjištěnou ve 3. měsíci zrání. Výroba B měla hodnoty vyrovnané a to v rozmezí $10,8 \cdot 10^8$ KTJ/g (první den) až $20,0 \cdot 10^8$ KTJ/g (po 3. měsíci zrání). Celkové počty mikroorganismů rostoucích na PCA první i druhé série viditelné v Grafu 27 – 28.



Graf 27 - Grafické znázornění celkového počtu MO v první sérii vzorků; kde: A – kontrolní výroba, B – s přidavkem dekarboxyláza pozitivního kmene.



Graf 28 - Grafické znázornění celkového počtu MO v druhé sérii vzorků; kde: A – kontrolní výroba, B – s přidavkem dekarboxyláza pozitivního kmene.

6.5 Senzorická analýza

Předmětem zkoumání bylo dále zjistit, zda výskyt a množství biogenních aminů vznikajících v procesu zrání mají či nemají vliv na sensorické vlastnosti sýrů. Dojde-li k ovlivnění těchto vlastností, tak do jaké míry budou vnímány konečným spotřebitelem. Sensorické analýze byl podroben vzorek druhé série po třech měsících zrání. Srovnávala se kontrolní výroba A s výrobou B s přidavkem dekarboxyláza pozitivního kmene.

Testovanými parametry byly vzhled a barva, konzistence, chuť a vůně, tuhost a cizí pachuti. Vybraní hodnotitelé posuzovali jednotlivé vzorky pomocí ordinální sedmibodové stupnice s charakteristikou každého stupně. Pro určení preference byla zvolena metoda párové zkoušky.

Jednotlivé parametry (vzhled a barva, konzistence, chuť a vůně, tuhost a cizí pachuti) posuzované pomocí sedmibodové stupnice byly statisticky vyhodnoceny pomocí Kruskal–Wallisova testu na hladině významnosti 5 %. Výsledky testování ukázaly, že s 95% spolehlivostí nebyl shledán statisticky významný rozdíl mezi vzorky A a B. Párový preferenční test byl vyhodnocen pomocí Friedmanova testu. Z 11 hodnotitelů označilo 8 z nich vzorek A jako preferovanější. Výsledky testu prokázaly na hladině významnosti 5 % statisticky

významný rozdíl mezi vzorky A a B. Lze tedy s 95% spolehlivostí říci, že vzorky jsou rozdílné.

6.6 Souhrnná diskuze

Praktická část této práce spočívala ve sledování změn probíhajících během tříměsíčního zrání sýrů holandského typu s přidavkem dekarboxyláza-pozitivního kmene ve srovnání s tzv. kontrolou (sýry vyrobené z komerčního smetanového zákysu). Vyrobené vzorky byly po celou dobu měření uchovávány při teplotě do 10°C a postupně podrobeny jednotlivým analýzám. Základním sledovaným parametrem byl vývoj biogenních aminů v závislosti na použitém mikroorganismu s dekarboxylázovou aktivitou. Ke zhodnocení vlivu přítomnosti biogenních aminů na jakost přírodních sýrů byla provedena základní chemická, texturní, mikrobiologická a senzorická analýza.

Přítomnost starterových kultur s dekarboxylační aktivitou hned nemusí být důvodem tvorby biogenních aminů v toxicky významných koncentracích. Vznik biogenních aminů v sýrech je ovlivněn mnoha faktory jako je například hodnota pH, koncentrace soli, délka zrání či přítomnost volných aminokyselin v substrátu [33]. V sýrech A analyzovaných den po výrobě došlo k dostatečnému prokysání o čemž svědčí hodnota pH 4,96 - 4,98. Nárůst pH v průběhu zrání je důsledkem rozkladu vzniklé kyseliny mléčné na oxid uhličitý a další produkty, které zvyšují alkalitu prostředí. U výroby s přidavkem dekarboxyláza-pozitivního kmene lze z Grafu 1 – 2 vyčíst hodnotu pH přesahující 5,0, která je optimální pro růst a pomnožení starterové kultury kmene *Lactococcus*. Lze tvrdit, že u B výroby nebylo dosaženo požadovaného snížení pH vlivem vzniku kyseliny mléčné fermentací laktózy a sýry nebyly dostatečně prokysány [21]. V průběhu zrání došlo ve 3. měsíci k ustálení hodnot pH pohybující se v rozmezí 4,9 - 5,1, a to se shoduje s výsledky studie Halásze a kol. [69], podle kterých je pro tvorbu biogenních aminů přijatelnější slabě kyselé prostředí.

Během zrání sýrů dochází k odumírání dominující starterové mikroflóry a lyze buněk pak probíhá poměrně rychle. Rychlost lyze pak závisí na jednotlivém kmenu a ovlivňuje chuť výsledného produktu. Fox et al [7] zjistili, že kmen *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* podléhá lyzi daleko rychleji než kmen *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. Dále tvrdí, že důvodem pomalého odumírání buněk je relativně nízká koncentrace soli v prvních dnech zrání. Hodnoty NaCl získané měřením zaznamenaly v první den výroby sýrů zanedbatelné množství soli v rozmezí 0,22 - 0,31 % (w/w). S rostoucí dobou zrání koncentrace rostla až k hodnotě

kolem 2,0 % získané ve 3. měsíci zrání, kde byla zaznamenána také nejvyšší tvorba tyraminu, stejně jako tomu bylo v práci Buňkové a kol. [80] zabývající se vlivem tvorby biogenního aminu tyraminu v závislosti na koncentracích 0 – 2 % (w/w) NaCl. Výzkumem bylo zjištěno, že právě v množství 2 % NaCl dochází k nejvyšší produkci tyraminu v sýrech.

Textura tvoří souhrn vlastností typických pro daný typ sýra a výrazně ovlivňuje preference spotřebitele. Změny v texturních vlastnostech souvisí s řadou faktorů, mezi které patří mimo jiné koncentrace soli, druh použité starterové kultury či délka skladování [81]. Olson [24] tvrdí, že sýry s vyšší hodnotou pH jsou měkčí v porovnání se sýry s pH v kyselé oblasti. Toto tvrzení koresponduje se získanými výsledky měření tvrdosti u sýrů zejména u výroby s přidavkem dekarboxyláza-pozitivního kmene. Hodnoty pH první série byly v porovnání se sérií 2. patrně nižší, což se projevilo na výsledné tvrdosti sýrů této výroby. Maximální hodnota tvrdosti byla v první sérii 78,21 N, kdežto v druhé sérii odpovídala tvrdost na počátku zrání 41,48 N a v průběhu klesla na 5,89 N. Vzhledem k tomu, že tvrdost by se podle Lawrence [82] měla s rostoucí dobou zrání zvyšovat díky probíhající proteolýze, lze tuto abnormalitu (prokázána také u relativní lepivosti) vysvětlit možnou technologickou chybou při výrobě sýrů s přidavkem *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*. Dalším sledovaným parametrem byla kohezivnost, která svým klesajícím trendem potvrzuje práci Němcové a kol. [83]. Ta uvádí, že s rostoucí dobou zrání dochází důsledkem proteolýzy ke snižování kohezivnosti v hmotě sýra. Srovnáním hodnocených texturních parametrů u jednotlivých výrob (A, B) nebyly shledány zásadní rozdíly (s přihlédnutím k možnému pochybení ve výrobě B), proto nelze vliv biogenních aminů na texturu sýrů potvrdit.

Jak již bylo zmíněno v kapitole 6.5 Senzorická analýza, v testovaných parametrech nebyl prokázán statisticky významný rozdíl mezi vzorky. Přestože podle Foxe et al. [7] dosahují sýry s použitím kyselové kultury s převahou kmene *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* výraznější a intenzivnější chuti, označili vzorek B jako preferovanější před vzorkem vyrobeným z komerční smetanové kultury pouze 3 posuzovatelé z 11. Senzorickou analýzou se prokázalo, že přítomnost biogenních aminů významně neovlivňuje vzhled, barvu, konzistenci, chuť ani vůni sýrů. Podle Komprdy [36] by se však konzumenti se sníženou aktivitou enzymu monoaminoxidázy měli vyvarovat konzumaci sýrů holandského typu s dobou zrání delší než 5 měsíců.

Podmínkou vzniku toxického množství biogenních aminů v sýrech je proteolýza, která je při zrání sýrů považována za jeden z nejdůležitějších pochodů ovlivňujících kvalitu sýra. Na proteolýze se podílí nativní proteázy přítomné v mléce, proteázy starterových kultur, enzymy syřidla, ale také proteázy kontaminujících MO [7, 13, 14]. Počet starterových kultur v zákysu po prokysání by se měl pohybovat v rozmezí $10^7 - 10^9$ KTJ/ml [7]. Naměřené hodnoty počtu MO v zákysu odpovídají informaci z citovaného zdroje. Počty mléčných koků v obou sériích sýrů byly u výroby B poměrně vyrovnané po celou dobu zrání, což nesouhlasí s tvrzením, kdy podle Foxe et al. [7,19] s rostoucí dobou zrání dochází ke snižování starterových mikroorganismů. Mírně klesající (z původních 10^8 KTJ/g na 10^5 KTJ/g) trend byl zaznamenán u výroby A z důvodu snížení hodnoty pH a zvýšení koncentrace soli. Přítomnost a množství nejružnější biogenních aminů v polotvrdých sýrech je vysvětlováno složením startovacích kultur a počtem mléčných bakterií, které přežívající až do konce zrání [19]. Počet BMK rostoucích na MRS agaru se pohyboval v rozmezí hodnot $10^7 - 10^8$ KTJ/g a výrazně se během zrání neměnil. Vzhledem k prokázané dekarboxylační aktivitě některých kmenů se s jistotou podílely na tvorbě biogenních aminů zejména pak u výroby A. Mezi tyto bakterie patří tzv. nonstarterové kultury zahrnující kmeny *Lactobacillus*, které podle Foxe et al. [1] mohou přežít pasterační teploty a dále se množit. Tento fakt tedy potvrzuje neměnný charakter v počtu bakterií rostoucích na MRS agaru. Analýza enterokoků přítomných ve vyrobených sýrech je v rozporu s tvrzením, že laktobacily v sýrech přítomné ve větším počtu brání růstu a množení enterokoků [7,73]. V případě koliformních bakterií byl výskyt v sýrech ve vyšších koncentracích zaznamenán v první den zrání. Poté jejich množství kleslo na hodnoty v rozmezí $10^2 - 10^3$ KTJ/g napříč k tomu Fox et al. [7] uvádí, že počet koliformních bakterií v sýrech je na počátku zrání velmi nízký vlivem teploty používané pro výrobu sýrů holandského typu, přičemž méně odolné jsou gramnegativní bakterie.

Koncentrace BA v bujónovém zákysu pro výrobu B byla až 20 x vyšší v porovnání se smetanovým zákyssem, což se v přítomnosti *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* dalo předpokládat neboť výsledky studie Buňkové a kol. [17] již dříve prokázaly dekarboxylační aktivitu u zmíněného kmene za podmínek napodobujících technologii výroby přírodních sýrů, a tedy i teplota zrání $10 \pm 2^\circ\text{C}$ pozitivně působící na vznik BA byla shodná s teplotou použitou v této práci. Pomocí HPLC byla stanovována celková koncentrace biogenních aminů v sýrech, přičemž podstatně vyšší množství těchto bioaktivních látek bylo stejně

jako v zákysech pro tuto výrobu nalezeno u sýrů s přídavkem dekarboxyláza-pozitivního kmene. Počáteční koncentrace BA byla zanedbatelná zejména v případě B výroby, kdy první den vzorek sýra obsahoval průměrně 41,1 mg/kg. Postupný nárůst jejich množství na hodnoty 727,3 mg/kg (první série) a 696,1 mg/kg (druhá série) koreluje s tvrzením, že množství BA se procesem zrání v důsledku proteolýzy zvyšuje (viz kapitola 1.2.2 Proteolýza a reakce volných aminokyselin). Z 8 detekovaných aminů byly detekovány pouze 4 z nich, přičemž mezi nedetekované se řadil také histamin, který je podle Komprdy [36] v sýrech hojně vyskytujícím biogenním aminem. Nízký počet koliformních bakterií analyzovaných v sýrech neprokázal vznik ani kadaverinu, což souhlasí se stanoviskem Greifa et al. [84] který ve své studii uvádí jako původce vzniku kadaverinu a histaminu v sýrech některé druhy rodu *Enterobacteriace*. Spermin a spermidin se na celkovém obsahu biogenních aminů podílely v nízkých koncentracích, přičemž se jedná o aminy vznikající pomocí enzymů přítomných v mléce [85]. Z celkového obsahu biogenních aminů byl nejvíce zastoupeným tyramin. Ve výrobě B představoval ve 3. měsíci zrání 676,9 mg/kg z celkových 727,3 mg/kg, což potvrzuje výzkum Buňkové a kol. [17] o vlivu *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* na tvorbu tyraminu v sýrech. Ve výrobě A se na tvorbě tyraminu podílely v množství 75,5 – 87,2 mg/kg pravděpodobně laktobacily, kdy u rodu *Lactobacillus curvatus* byla dekarboxylázová aktivita na tyramin a putrescin prokázána [7]. Toto tvrzení koresponduje s detekcí putrescinu v množství 17,8 mg/kg ve 3. měsíci zrání.

ZÁVĚR

Předmětem předkládané práce bylo prokázat, zda dekarboxyláza-pozitivní bakterie mléčného kvašení, které se v praxi běžně používají do fermentovaných mléčných výrobků, ovlivňují jakostní parametry sýrů holandského typu. Součástí praktické části práce bylo vyrobit sýry s přídavkem kmene *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* a zkoumané parametry porovnat se sýry vyrobenými z komerčního smetanového zákysu. Analýzou jednotlivých vzorků pak bylo zjištěno:

- hodnota pH podpořila tvorbu biogenních aminů v sýrech, stejně tak i koncentrace soli do 2 % (w/w) pak přispěla k celkovému množství těchto látek,
- výroba s přídavkem dekarboxyláza-pozitivního kmene nevykazovala v porovnání s kontrolní výrobou významné rozdíly v texturních parametrech, které tedy v přítomnosti BA nebyly ovlivněny,
- při senzoričce analýze posuzovatelé nezaznamenali rozdíl mezi jednotlivými vzorky,
- v počtu mléčných koků ve výrobě B nebyl zaznamenán výrazný rozdíl hodnot v průběhu zrání, kdežto u kontrolní výroby byl v počtu mléčných koků zjištěn klesající trend; počty MO rostoucích na MRS agaru byly během zrání v obou výrobach vyrovnané; enterokoky byly v podstatně menším zastoupení u výroby A; koliformní bakterie vykazovaly v obou sériích klesající charakter od prvního dne výroby,
- celkové koncentrace biogenních aminů rostly úměrně s dobou zrání u obou výrob, přičemž nejvíce zastoupeným aminem byl tyramin v množství přesahujícím 600 mg/kg.

V této diplomové práci se tedy podařilo prokázat vliv dekarboxyláza-pozitivního kmene *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* na vznik biogenních aminů. Produkce tyraminu v tak vysokých koncentracích však může znamenat zdravotní riziko pro spotřebitele, zejména v případě nedodržení hygienických podmínek zajišťujících bezpečnost potravin, přičemž na vzniku biogenních aminů se do jisté míry podílí také kontaminující mikroflóra. Výsledky analýz předkládané práce mohou být jistým přínosem pro další výzkum zabývající se sestavováním zákysových kultur za účelem snížení jejich dekarboxylázové aktivity.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] FOX, P. F.; GUINEE, T. P.; COGAN, T. M.; McSWEENEY, P. *Fundamentals of Cheese Science, Gaithersburg*. Nakladatelství USA: Aspen Publication, 2002.
- [2] Český statistický úřad [online]. [citace z 2. února 2014]. Dostupné z: <http://www.czso.cz/csu/2012edicniplan.nsf/tab/C40050A1E0>.
- [3] RIDGWAY, J. *The complete cheese book*. London: Judy Piatkus Ltd., 1986.
- [4] Vyhláška Ministerstva zemědělství č. 77/2003 Sb. (v platném znění) ze dne 6. března 2003, kterou se stanoví požadavky pro mléko a mléčné výrobky, mražené krémy a jedlé tuky a oleje. In *Sbírka zákonů České republiky*. 2003, částka 32, s. 2488 – 2516.
- [5] *Spotřeba sýrů v ČR roste* [online]. [citace 16. března 2014]. Dostupné z: <http://zemedelec.cz/spotreba-syru-v-ceske-republice-roste/>.
- [6] ANONYM. *Sýry - Zlín - 2012: perspektivy výroby sýrů a hodnocení jejich jakosti: mezinárodní konference: Zlín, 15. listopadu 2012 : sborník příspěvků*. Vyd. 1. Zlín: UTB ve Zlíně, Fakulta technologická, 2012, 1 CD-ROM. ISBN 978-80-7454-231-2.
- [7] FOX, P. F. *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, Vol. 1., London: Elsevier Applied Science Publishers, 1987.
- [8] Český statistický úřad: *Spotřeba sýrů* [online]. [citace z 15. března 2014]. Dostupné z: [http://www.czso.cz/csu/csu.nsf/1e01747a199f30f4c1256bd50038ab23/4100f5e146962c05c12579d8003ba05f/\\$FILE/cpotr041012analyza.pdf](http://www.czso.cz/csu/csu.nsf/1e01747a199f30f4c1256bd50038ab23/4100f5e146962c05c12579d8003ba05f/$FILE/cpotr041012analyza.pdf).
- [9] *Sýry holandského typu* [online]. [citace z 2. února 2014]. Dostupné z: <http://dutchfood.about.com/od/aboutdutchcooking/a/SayCheese.htm>.
- [10] *Válka o sýr: Češi bojují za eidam, Holanďani chtějí edam* [online]. [citace 16. března 2014]. Dostupné z: <http://domaci.ihned.cz/c1-35280040-valka-o-syr-cesibojuji-za-eidam-holandani-chteji-edam>.
- [11] MORTIMORE, S.; WALLACE, C. *HACCP: A practical approach*. London: Chapman & Hall, 1994.
- [12] KADLEC, P.; MELZUCH, K.; VOLDŘICH, M.; a kol. *Co byste měli vědět o výrobě potravin?* Technologie potravin, 1. vyd. Ostrava: nakladatelství KEY Publishing s.r.o., 2009, 275 – 281. ISBN 978-80-7418-060-0.
- [13] FOX, P. F.; McSWEENEY, P.; COGAN, T. M.; GUINEE, T. P. *Cheese -major*

- cheese groups*, volume 2., 3rd edition. Academic press: 2004. ISBN 978-0-1226-3653-0.
- [14] FOX, P. F.; McSWEENEY, P. L. H. *Dairy chemistry and biochemistry*. 1st edition Tullamore: Thomson science, 1998. ISBN 0412720000.
- [15] FORMAN, L. *Mlékárenská technologie II*. 1. vyd. Praha: Vysoká škola chemicko – technologická, 1994, 217. ISBN 80-7080-214-6.
- [16] SCOTT, R.; ROBINSON, R. K.; WILBEY, R. A. *Cheesemaking practice*. Verlag : Springer, 1998. ISBN 978-0-7514-0417-3.
- [17] BUŇKOVÁ, L.; BUŇKA, F.; POLLAKOVÁ, E.; PODEŠVOVÁ, T.; DRÁB, V. The effect of lactose, NaCl and an aero/anaerobic environment on the tyrosine decarboxylase activity of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* and *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. *International Journal of Food Microbiology*. 2011, 2, 112 – 119.
- [18] MCSWEENEY, P. L. H.; HAYALOGLU, A. A.; O'MAHONY, J. A.; BANSAL, N. Perspectives on cheese ripening. *Australian Journal of Dairy Technology*. 2006, 61, 69 – 77.
- [19] FOX, P.F. *Cheese - chemistry, physics and microbiology*, volume 1. 2nd ed. Springer, 1999. ISBN 978-0-8342-1339-5.
- [20] DRDÁK, M.; STUDNICKÝ, J.; MÓROVÁ, E.; KAROVIČOVÁ, J. *Základy potravinářských technologií*. 1. vyd. Bratislava: MALÉ CENTRUM, 1996. ISBN 80-967064-1-1.
- [21] HUI, I.; YIU, H. *Dairy science and technology handbook*, New York: Wiley-VCH, 1993. ISBN 1-56081-078-5.
- [22] FORSS, D. A. Mechanisms of formation of aroma compounds in milk and milk products. *Journal of Dairy Research*, 1979, 46(4), 691-706.
- [23] MCSWEENEY, P. L. H.; SOUSA, M. J. Biochemical pathways for the production of flavour compounds in cheeses during ripening: A review. *Lait*, 2000, 80(3), 293-324.
- [24] OLSON, N. F. The impact of lactic acid bacteria on cheese flavor. *FEMS Microbiology Reviews*, 1990, 87(1-2), 131-147.
- [25] ROGINSKI, H.; FUQUAY, J. W.; FOX, P. F. *Encyclopedia of dairy sciences*. London: Academic press, 2002. ISBN 0-12-227235-8.

- [26] PACHLOVÁ, V. *Distribuce vybraných složek v přírodním sýru v průběhu jeho zrání*. Zlín, 2011. Dizertační práce. Univerzita Tomáše Bati. Školitel práce doc. Ing. František Buňka, Ph.D.
- [27] ADAMS, M. R.; MOSS, M. O. *Food Microbiology*. Cambridge: RSC Publishing, 2008. ISBN 0-85404-611-09.
- [28] CAPLICE, E.; FITZGERALD, G. F. Food fermentations: role of microorganism in food production and preservative. *International Journal of Food Microbiology*, 1999, 50, 131-149.
- [29] SINGHL, T. K.; DRAKE, M. A.; CADWALLADER, K. R. Flavor of Cheddar Cheese: A Chemical and Sensory Perspective. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2003, 2, 139-162.
- [30] KALACĚ, P.; KRÍŽEK, M. Biogenní aminy a polyaminy v potravinách a jejich vliv na lidské zdraví. *Potravinářská Revue*, 2005, 2, 40 - 42.
- [31] STARUSZKIEWICZ, W. F. Fluorometric determination of histamine in tuna: Collaborative study. *Journal Associate Official Agriculture Chemistry*, 1977, 60, 1131.
- [32] TAYLOR, S. L.; LIEVER, E.; LEATHERWOOD, M. A simplified method for histamine analysis of foods. *Journal Food Science*, 1978, 32, 247.
- [33] SHALABY, A. R. Significance of biogenic amines to food safety and human health. *Food Research International*, 1996, 29 (7), 675-690.
- [34] ASKAR, A.; TREPTOW, H. *Biogene amine in Lebensmitteln*. Stuttgart, Germany: Eugen Ulmer GmbH and Co, 1986, 197.
- [35] BRINK, B.; DAMINK, C.; JOOSTEN H. M. L. J.; HUIS IN'T VELD, J. H. J. Occurrence and formation of biologically active amines in foods. *Journal Food Microbiology*, 1990, 11, 73-84.
- [36] KOMPRDA, T. *Obecná hygiena potravin*. Brno: MZLU, 2004, 145. ISBN 978-80-7157-757-7.
- [37] VELÍŠEK, J. *Chemie potravin I*. Vyd. 2. uprav. Tábor: OSSIS, 2002. ISBN 8086659003.
- [38] RICE, S.L.; EITENMILLER, R. R.; KOEHLER, P.E. Biologically active amines in food. *Journal Milk Food Technology*, 1976, 39, 353-358.

- [39] FERNANDER, J.; MACKIE, I. M. Histidine metabolism in mackerel (*Scomber scombrus*). Studies on histidine decarboxylase activity and histamine formation during frozen storage of flesh and liver under sterile and non-sterile conditions. *Journal Food Technology*, 1979, 14, 131-139.
- [40] BLACKWELL, B. A.; MABBITT, L. A. Tyramine in cheese related to hypertensive crisis after monoamine oxidase inhibition. *Lancet*, 1965, 2, 938-940.
- [41] CELANO, G. V.; CAFARCHIA, C.; BUJA, F.; TIECCO, G. Ricerca di amine biogene in alcuni formaggi. *Ind. Alimentos*, 1992, 31, 764-768.
- [42] *Biogenní aminy v potravinách* [online]. [citace 4. dubna 2014]. Dostupné z: <http://www.chempoint.cz/biogenni-aminy-v-potravinach>.
- [43] FLASAROVÁ, R. *Distribuce obsahu volných aminokyselin a biogenních aminů v přírodním sýru eidamského typu*. Zlín, 2011. Diplomová práce. Univerzita Tomáše Bati. Vedoucí práce doc. Ing. František Buňka, Ph.D.
- [44] *Syntézy vzniku biogenních aminů a aminokyselin* [online]. [citace 4. dubna 2014]. Dostupné z: <http://biocyc.org/>.
- [45] EDWARDS, S. T.; SANDINE, W. E. Symposium: Microbial metabolites of importance in dairy products. *Journal of Dairy Science*, 1981, 64 (12), 2341-2438.
- [46] YURCHENKO, S.; MÖLDER, U. Volatile *N*-nitrosamines in various fish products. *Food chemistry*, 2006, 96, 325-333.
- [47] SINELL, H. J. Biogenic Amine als Risiko faktoren in der Fischhygiene. *Arch. Lebensmittelhygiene*, 1978, 29, 206-210.
- [48] KAROVIČOVÁ, J.; KOHAJDOVÁ, Z. Biogenic amines in food. *Chemical papers*, 2003, 1 (59), 70-79.
- [49] SANTOS, M. H. S. Biogenic amines: their importance in foods. *Journal of Food Microbiology*, 1996, 29 (2-3), 213-231.
- [50] NOUT, M. J. R. Fermented foods and food safety. *Food Research International*, 1994, 27 (3), 291-298.

- [51] TEN BRINK, B.; DAMINK, C.; BOS, K. D.; HUIS IN 'T VELD, J. H. J. Occurrence and formation of biogenic amines in food. (Aanwezigheid en vorming van biogene aminen in voedingsmiddelen). *De Ware(n) Chemicus*, 1988, 18, 76-82.
- [52] WAITES, W. M.; ARBUTHNOTT, J. P. Foodborne illness: an overview. *Lancet*, 1990, 336 (8717), 5 – 722.
- [53] SMITH, J. S.; KENNEY, P. B.; MOORE, M. M. Biogenic amine formation in fresh vacuum-packaged beef during storage at 1°C for 120 days. *Journal Food Protection*, 1993, 56,497-500.
- [54] KOMPRDA, T.; et. al. Some factors influencing biogenic amines and polyamines kontent in Dutch-type semi – hard cheese. *Eur Food Res Technol*, 2008, 27, 29 – 36.
- [55] JOOSTEN, H. M. L. J.; NORTHOLT, M.D. Detection, growth, and amine-producing capacity of lactobacilli in cheese. *Application Environmental. Microbiology*, 1989, 55, 2356–2359.
- [56] EL SODA, M. Acceleration of cheese ripening: recent advances. *Journal Food Protected*, 1986, 49, 395–399.
- [57] SOOD, V. K.; KOSIKOWSKI, F. V. Accelerated Cheddar cheese ripening by added microbial enzymes. *Journal Dairy Science*, 1979, 62, 1865–1872.
- [58] FOSTER, E. M.; NELESON, F. E.; SPECK, M. L.; DETSCH, K. N.; OLESEN, J. C. *Dairy Microbiology*. London: McMillan and Co. Ltd, 1958.
- [59] DEGHEIDI, M. A.; EFFAT, B. A.; SHALABY, A. R. Development of some biogenic amines during Ras cheese ripening with special reference to different starters. *Dairy Science and Technology*, 1992, 205-217.
- [60] SPANJER, M. C.; VAN ROODE, B. A. S. W. Towards a regulatory limit for biogenic amines in fish, cheese, and sauerkraut. *De Ware(n)-Chemicus*, 1991, 21, 139-167.
- [61] DIERICK, N.; VANDEKERCKHOVE, P.; DAMEYER, D. Changes in nonprotein nitrogen compounds during dry sausage ripening. *Journal Food Science*, 1974, 39, 301.
- [62] ASKAR, A.; EL-SAIDY, S.; ALI, A.; SHEHATA, M. I.; BASSIOUNY, S. S. Biogenic amines in fish products. *Deutsche lebensmittel Rundschau*, 1986, 82, 188 - 191.

- [63] STRATTON, J. E.; HUTKINS, W. R.; TAYLOR, S. L. Biogenicamines in cheese and other fermented foods. *Journal Food Chemistry*, 1991, 54, 460-470.
- [64] FOJTÍKOVÁ, L. *Biogenní aminy v pivu a vínu*. Zlín, 2008. Bakalářská práce. Univerzita Tomáše Bati. Vedoucí práce doc. Ing. Pavel Valášek, CSc.
- [65] YOSHIDA, A.; NAKAMURA, A. Quantitation of histamine in fishes and fishes products by high performance liquid chromatography. *Journal Food Hygiene*, 1882, 23, 339.
- [66] MURRAY, C. K.; HOBBS, G.; GILBERT, R. G. Scombrototoxin and scombrototoxin-like poisoning from canned fish. *Journal Hygiene Camb.*, 1982, 88, 215 - 218.
- [67] LOVENBERG, W. Some vaso- and psychroactive substances in food: amines stimulates depressants and hallucinogens. In *Toxicants Occurring Naturally in Foods*. Washington, DC: National Academy of Science, 1973.
- [68] JOOSTEN, H. M. L. G. The biogenic amine contents of Dutch cheese and their toxicological significance. *Milk Dairy*, 1988, 42, 25 – 42.
- [69] HALÁSZ, A.; BARÁTH, Á.; SIMON-SARKADI, L.; HOLZAPFEL, W. Biogenic amines and their production by microorganism in food. *Trends in Food Science & Technology*, 1994, 5 (2), 42-49.
- [70] Nařízení komise (ES) 2073/2005 o mikrobiologických kritériích pro potraviny, pokud jde o Enterobacteriaceae v pasterizovaném mléce a v dalších pasterizovaných tekutých mléčných výrobcích a o *Listeria monocytogenes* v potravinářské soli. In *Úřední věstník Evropské unie*. 2005, 338, s. 1 - 26.
- [71] MARINE-FONT, A. Alimentos y medicamentos: Interactions (3a parte). *Circular Farmacology*, 1978, 258, 43 - 45.
- [72] Vyhláška Ministerstva zdravotnictví č. 298/1997 Sb. (zrušena od 1. 3. 2002) ze dne 28. listopadu 1997, kterou se stanoví chemické požadavky na zdravotní nezávadnost jednotlivých druhů potravin a potravinových surovin, podmínky jejich použití, jejich označování na obalech, požadavky na čistotu a identitu přídatných látek a potravních doplňků a mikrobiologické požadavky na potravní doplňky a látky přídatné. In *Sbírka zákonů České republiky*. 1997, částka 99, s. 5474 - 5799.

- [73] YEN, G. C.; AND KAO, H. H. Antioxidative effect of biogenic amine on the peroxidation of linoleic acid. *Biosci. Biotechnical biochemistry*, 1993, 57, 115 - 116.
- [74] BUŇKOVÁ, L. a kol. Vliv aerobního/anaerobního prostředí na dekarboxylázovou aktivitu vybraných bakterií mléčného kvašení. *Potravinářstvo*. 2010, 4 (2), 3.
- [75] ČERNÍKOVÁ, M.; Z. VAŇÁTKOVÁ. *Praktická cvičení z potravinářské mikrobiologie*. 1. vyd. Zlín: UTB ve Zlíně, 2010. ISBN 978-80-7318-749-1.
- [76] YAMADA, H.; UWAJIMA, T.; KUMAGAI, H.; WATANABE, M.; OGATA, K. Bacterial monoamine oxidases. Part I. Purification and Crystallization of tyramine oxidase of *Sarcina lutea*. *Agr. Biol. Chem.*, 1967, 31, 890-896.
- [77] LADERO, V.; LINARES, D. M.; FERNÁNDEZ, M.; ALVAREZ, M. A. Real time quantitative PCR detection of histamine-producing lactic acid bacteria in cheese: Relation with histamine content. *Food Research International*, 2008, 41, 1015–1019.
- [78] *Úvod do potravinářské mikrobiologie* [online]. [citace 30. března 2014]. Dostupné z: http://tresen.vscht.cz/tmt/ESO/Svet_potravin/USP-S3_2013.pdf.
- [79] DADÁKOVÁ, E., KŘÍŽEK, M. a PELIKÁNOVÁ, T. Determination of biogenic amines in foods using ultra-performance liquid chromatography (UPLC). *Food Chemistry*. 2009, č. 119, 365–370.
- [80] BUŇKOVÁ, L.; BUŇKA, F.; HLOBILOVÁ, M.; VAŇÁTKOVÁ, Z.; NOVÁKOVÁ, D.; DRÁB, V. Tyramine production of technological important strains of *Lactobacillus*, *Lactococcus* and *Streptococcus*. *Eur. Food Research Technology*, 2009, 229, 533-538.
- [81] PAPPAS, C. P.; KONDYLI, E.; VOUTSINAS, L. P.; MALLATOU, H. Effects of salting method and storage time on composition and quality of Feta cheese. *Journal of the Society of Dairy Technology*, 1996, 49, 113–118.
- [82] LAWRENCE, R. C.; CREAMER, L. K.; GILLES, J. Texture Development During Cheese Ripening. *Journal of Dairy Science*, 1987, vol. 70 (8), 1748-1760 s.

- [83] NĚMCOVÁ, L.; ŠTĚTINA, J.; VALENTOVÁ, H. Proteolysis and consistency changes of Gouda and Eidamský blok cheeses during ripening. *Czech J. Food Science*, 2001, 19, 67 – 72.
- [84] GRIEF, G.; GREIFOVÁ, M.; KAROVIČOVÁ, J. Effects of NaCl concentration and initial pH value on biogenic amine formation dynamics by *Enterobacter* spp. bacteria in model conditions. *Journal of Food and Nutrition Research*, 2006, č. 45, s. 21 – 29.
- [85] BUŇKOVÁ, L. a kol. Monitoring výskytu biogenních aminů ve fermentovaných mléčných výrobcích v ČR. *Mlékařské listy*, 2012, č. 134, s. 1 – 3.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

GMM	Geneticky modifikovaný mikroorganismus
BMK	Bakterie mléčného kvašení
SVP	Správná výrobní praxe
SHP	Správná hygienická praxe
BA	Biogenní aminy
HPLC	Vysokotlaká kapalinová chromatografie
CPM	Celkové počty mikroorganismů
MO	Mikroorganismy

SEZNAM OBRÁZKŮ

<i>Obrázek 1 - Metabolismus galaktózy BMK [29].</i>	19
<i>Obrázek 2 - Schematické znázornění systému plazminu v mléce [14].</i>	21
<i>Obrázek 3 - Schéma vzniku histaminu z L – histidinu [43].</i>	25
<i>Obrázek 4 - Vznik putrescinu (dráha I.) [43].</i>	26
<i>Obrázek 5 - Vznik putrescinu (dráha II.) [43].</i>	27
<i>Obrázek 6 - Vznik putrescinu (dráha III.) [43].</i>	28

SEZNAM TABULEK

<i>Tabulka 1 – Vývoj spotřeby sýrů v ČR za roky 1992 – 2012 [8].</i>	12
<i>Tabulka 2 - Obecný přehled některých zástupců BA [25].</i>	24
<i>Tabulka 3 - Biogenní aminy a jejich farmakologický vliv na organizmus[33].</i>	34
<i>Tabulka 4 – Podmínky kultivace.</i>	44
<i>Tabulka 5 – Koncentrace biogenních aminů v zákysech první série.</i>	55
<i>Tabulka 6 - Koncentrace biogenních aminů v zákysech druhé série.</i>	56

SEZNAM GRAFŮ

<i>Graf 1 - Vývoj pH v průběhu zrání u vzorků sýrů první série.....</i>	<i>47</i>
<i>Graf 2 - Vývoj pH v průběhu zrání u vzorků sýrů druhé série.....</i>	<i>47</i>
<i>Graf 3 - Vývoj obsahu sušiny v průběhu zrání u vzorků sýrů první série.....</i>	<i>48</i>
<i>Graf 4 - Vývoj obsahu sušiny v průběhu zrání u vzorků sýrů druhé série.....</i>	<i>48</i>
<i>Graf 5 - Koncentrace NaCl v průběhu zrání u vzorků sýrů první série.....</i>	<i>49</i>
<i>Graf 6 - Koncentrace NaCl v průběhu zrání u vzorků sýrů druhé série.....</i>	<i>49</i>
<i>Graf 7 - Vývoj tvrdosti v průběhu zrání u vzorků sýrů první série.....</i>	<i>51</i>
<i>Graf 8 - Vývoj tvrdosti v průběhu zrání u vzorků sýrů druhé série.....</i>	<i>51</i>
<i>Graf 9 - Vývoj relativní lepivosti v průběhu zrání u vzorků sýrů první série.....</i>	<i>52</i>
<i>Graf 10 - Vývoj relativní lepivosti v průběhu zrání u vzorků sýrů druhé série.....</i>	<i>52</i>
<i>Graf 11 - Vývoj kohezivnosti v průběhu zrání u vzorků sýrů první série.....</i>	<i>53</i>
<i>Graf 12 - Vývoj kohezivnosti v průběhu zrání u vzorků sýrů druhé série.....</i>	<i>53</i>
<i>Graf 13 - Celkové koncentrace biogenních aminů u vzorků sýrů první série.....</i>	<i>56</i>
<i>Graf 14 - Celkové koncentrace biogenních aminů u vzorků sýrů druhé série.....</i>	<i>57</i>
<i>Graf 15 - Celkové koncentrace tyraminu u vzorků sýrů první série.....</i>	<i>57</i>
<i>Graf 16 - Celkové koncentrace tyraminu u vzorků sýrů druhé série.....</i>	<i>58</i>
<i>Graf 17 - Grafické znázornění změn v počtu mléčných koků v jednotlivých typech vzorků zákysů první série.....</i>	<i>59</i>
<i>Graf 18 - Grafické znázornění změn v počtu mléčných koků v první sérii vzorků.....</i>	<i>60</i>
<i>Graf 19 - Grafické znázornění změn v počtu mléčných koků v jednotlivých typech vzorků zákysů druhé série.....</i>	<i>60</i>
<i>Graf 20 - Grafické znázornění změn v počtu mléčných koků v druhé sérii vzorků.....</i>	<i>61</i>
<i>Graf 21 - Grafické znázornění změn v počtu bakterií rostoucích na MRS agaru v první sérii vzorků.....</i>	<i>62</i>
<i>Graf 22 - Grafické znázornění změn v počtu bakterií rostoucích na MRS agaru v druhé sérii vzorků.....</i>	<i>62</i>
<i>Graf 23 - Grafické znázornění změn v počtu enterokoků v první sérii vzorků.....</i>	<i>63</i>
<i>Graf 24 - Grafické znázornění změn v počtu enterokoků v druhé sérii vzorků.....</i>	<i>64</i>
<i>Graf 25 - Grafické znázornění změn v počtu koliformních MO v první sérii vzorků.....</i>	<i>65</i>
<i>Graf 26 - Grafické znázornění změn v počtu koliformních MO v druhé sérii vzorků.....</i>	<i>65</i>
<i>Graf 27 - Grafické znázornění celkového počtu MO v první sérii vzorků.....</i>	<i>66</i>

Graf 28 - Grafické znázornění celkového počtu MO v druhé sérii vzorků 67

SEZNAM PŘÍLOH

Příloha I – Dotazník k sensorickému hodnocení.....	87
--	----

PŘÍLOHA I - Dotazník k senzorickému hodnocení

SENZORICKÉ HODNOCENÍ SÝRŮ HOLANDSKÉHO TYPU

Jméno a příjmení:

Datum:

Hodina:

Podpis:

I. Senzorické hodnocení pomocí sedmibodové stupnice

Ochutnejte předložené vzorky sýrů a do tabulky zaznačte příslušný stupeň dle přiložené stupnice.

	Sledovaný znak				
Kód vzorku	Vzhled a barva	Konzistence	Chut' a vůně	Tuhost	Cizí pachutí
A					
B					

Vzhled a barva

- vynikající** – povrch sýrů suchý, jemná neporušená pokožka, hladká jemně zrnitá po lisování na perfoře, vzhled a tvar sýra pravidelný bez vlisů, nerovností, barva sýrového těsta smetanová, u zralých sýrů smetanově nažloutlá
- výborná** – povrch sýra suchý, neporušený, hladký s málo patrnými nerovnostmi (vlisy), tvar sýra pravidelný, odpovídající deklarovanému vzhledu, barva sýrového těsta homogenní v celé hmotě s odstínem smetanovým až žlutým.
- velmi dobrá** – povrch sýra suchý, případně jemně vlhčí, neporušený, hladký, vzhled sýra pravidelný s menšími nepravidelnostmi, mírné odchylky od homogenní smetanové, resp. nažloutlé barvy jsou u těsta přípustné. Tvar sýra celistvý.
- dobrá** - povrch sýra čistý, suchý, příp. jemně zmazovatělý na povrchu v důsledku vypocenému tuku, resp. vlhkosti, vzhled sýra pravidelný, připouští se menší počet patrných vlisů na povrchu cihly, malé odchylky od homogenní smetanové, resp. nažloutlé barvy. Výskyt barevných skvrn nepřipustný

5. **méně dobrá** – povrch sýra vlhký, na povrchu omezený výskyt cizích barevných skvrn a odstínů, silnější vlisy na povrchu, deformace tvaru sýra, barva sýra mírně mramorovitá, nehomogenní.
6. **vyhovující** – povrch sýra mazlavý, na povrchu výskyt cizích barevných skvrn a odstínů, silnější vlisy na povrchu, deformace tvaru sýra, barva sýra mramorovitá, nehomogenní, solný prstenec pod povrchem. Barva těsta nepřírozně bílá.
7. **nevyhovující** – povrch a tvar sýra deformovaný, nepravidelný, povrch silně narušený, barva sýra netypická s cizími odstíny, např. v důsledku plísní. Barva syrového těsta nehomogenní, bílé neprozralé těsto, v těstě silná mramorovitost, cizí barevné odstíny, hnilobná hnízda.

Konzistence

1. **vynikající** – těsto sýra vláčné, celistvé, jemné na skusu, mírně roztíratelné, lehce polykatelné. Na řezu v těstě sýra malý počet ok menší velikosti hrášku, oka čistá, hladká, pokud možno rovně rozložená. Nevyskytuje se provzdušnění těsta, syrovátková hnízda, trhlinky apod.
2. **výborná** – těsto celistvé, vláčné až roztíratelné, jemné na skusu. Na řezu větší počet typických ok velikosti hrášku. V těstě sýra přípustné mírné provzdušnění, nevyskytují se syrovátková hnízda
3. **velmi dobrá** – těsto celistvé, vláčné až roztíratelné, pod povrchem sýra mírně tužší. Připouští se „slepý sýr“ (bez ok). Těsto může být slabě provzdušněné, ojediněle se vyskytující syrovátkové hnízda.
4. **dobrá** – těsto celistvé, mírně tužší, resp. měkkí. Pod povrchem nebo v těstě se připouští ojedinělé trhlinky nebo mírná ořechovitost ok. Připouští se „slepý sýr“, slabší provzdušnění a menší výskyt syrovátkových hnízd.
5. **méně dobrá** – konzistence méně celistvá, nehomogenní, tužší, mírně viditelný solný prstenec pod povrchem sýra, oka ořechovitá, častější trhlinky v těstě sýra, provzdušnění a výskyt syrovátkových hnízd
6. **vyhovující** – konzistence málo celistvá, těsto tuhé nebo příliš měkké až mazlavé, patrný solný prstenec způsobený nedostatečným prozráním, oka ořechovitá, nepravidelná, netypická, nadměrné trhlinky v těstě sýra, časté provzdušnění a hojný výskyt syrovátkových hnízd.
7. **nevyhovující** - konzistence není celistvá, trhliny v těstě po duření, těsto tuhé, gumovité, rozpadavé, potřhané, drobivé. Síťová, provzdušněná oka, netypická, ořechovitá.

Chuť a vůně

1. **vynikající**- chuť čistá, typická pro sýry holandského typu, jemně mléčná nakyslá, nebo nasládlá, výrazná a plná v důsledku hlubokého prozráním sýra, harmonická. Vůně charakteristická, čistá bez jakýchkoliv cizích pachů.

2. **výborná** – čistá, harmonická, mléčně nakyslá, nebo hořko mandlová po použitých kulturách, stále výrazná a typická v důsledku odpovídajícího prozrání sýra. Vůně stále čistá a harmonická.
3. **velmi dobrá** – vůně čistá, harmonická, chuť s přípustnými mírnými odchylkami v harmonii, např. hořko mandlová, mírně slanější nebo kyselejší
4. **dobrá** – stále typická chuť pro sýry holandského typu, možné odchylky hořkosti, slanosti nebo kyselosti
5. **méně dobrá** – chuť méně harmonická. Výrazně převládá některý z hodnocených deskriptorů chuti např. kyselost hořkost, cizí příchut', slanost apod. Ve vůni se vyskytují cizí pachy.
6. **vyhovující** – chuť neharmonická. Ve vůni se můžou vyskytovat přijatelné cizí pachy (nečistý, netypický, cizí, sladový, nažluklý, nasládlý po duření)
7. **nevyhovující** – hořká, pálivá ostře kyselá, zatuchlá, plesnivá, žluklá, hnilobná, nepříjemná cizí chuť po chemikálii. Ve vůni výrazně nepříjemné cizí pachy po chemikáliích, hnilobné, zatuchlé, žluklé apod.

Tuhost

1. **sýr velmi tuhý** – tuhost sýra je příliš vysoká, sýr je špatně žvýkatelný
- 2.
- 3.
4. **optimální tuhost sýra**
- 5.
- 6.
7. **sýr měkký až rozbředlý** – sýr je rozpadavý až rozbředlý

Cizí pachuti

1. **sýr je bez cizích pachutí**
- 2.
- 3.
4. **pachuti akceptovatelné** – sýr obsahuje cizí příchuti – stále však akceptovatelné pro konzumaci
- 5.
- 6.
7. **odporné pachuti** – naprosto nepříjemné, koncentrace pachutí naprosto odporná

II.

Párový preferenční test

Ochutnejte předložené vzorky sýrů a křížkem značte, který vzorek více preferujete.

Vzorek A

Vzorek B