

Dizertační práce

Biogenní aminy ve vybraných skupinách přírodních sýrů

Biogenic amines in selected cheese groups

Autor: **Ing. Radka Flasarová**

Studijní program: P2901 Chemie a technologie potravin

Studijní obor: 2901V013 Technologie potravin

Školitel: prof. doc. Ing. František Buňka, Ph.D.

Konzultanti: prof. RNDr. Vlastimil Kubáň, DrSc.
doc. Ing. Vendula Pachlová, Ph.D.

Zlín, srpen, 2018

Vydala **Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně** v edici **Doctoral Thesis**.
Publikace byla vydána v roce 2018.

Klíčová slova: dekarboxylázová aktivita, biogenní aminy, volné aminokyseliny, přírodní sýry, Lactococcus, Lactobacillus, zákysové a nezákysové bakterie mléčného kvašení

Key words: decarboxylation activity, biogenic amines, free amino acids, nature type of cheese, Lactococcus, Lactobacillus, starter and nonstarter lactic acid bacteria

Práce je dostupná v Knihovně UTB ve Zlíně.

„Je zhola zbytečné se ptát, má-li život smysl či ne. Má takový smysl, jaký mu dáme.“

Lucius Annaeus Seneca

Poděkování:

Na tomto místě bych ráda poděkovala mému školiteli, doc. Ing. Františku Buňkovi, Ph.D. a konzultantům prof. RNDr. Vlastimilu Kubáňovi, DrSc. a doc. Ing. Vendule Pachlové, Ph.D. za jejich odborné vedení, cenné rady, připomínky, a také jejich čas, který mi věnovali během mého doktorského studia a psaní této dizertační práce. Mé další poděkování patří i doc. RNDr. Leoně Buňkové, Ph.D. za pomoc a konzultaci v rámci problematiky týkající se zejména posuzování dekarboxylázové aktivity a mikrobiologické části mé dizertační práce, laborantkám Ing. et Ing. Ludmile Zálešákové, Lence Machálkové a Bc. Veronice Kučabové za pomoc a participaci na měření mých experimentů v chemické a mikrobiologické laboratoři. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat mé rodině, přátelům a blízkým za psychickou podporu a trpělivost, kterou mi po celou dobu studia vyslovovali.

Děkuji vše, kteří se jakýmkoli způsobem zapřičinili na vzniku této dizertační práce.

Tato práce vznikla za podpory Grantové agentury České republiky GAČR 503/11/1417, interních grantů Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně (IGA/FT/2012/026, IGA/FT/2013/010, IGA/FT/2014/001 a IGA/FT/2015/004) a projektu Národní agentury zemědělského výzkumu QJ1210300.

ABSTRAKT

Cílem předložené dizertační práce bylo zabývat se problematikou vzniku a výskytu biogenních aminů ve vybraných skupinách přírodních sýrů. Navzdory tomu, že biogenní aminy mohou plnit v nízkých koncentracích u řady mikroorganismů, rostlin i živočichů významné fyziologické funkce, příjem vyšších koncentrací biogenních aminů může mít negativní vliv na konzumentovo zdraví. Sýry představují vhodné prostředí pro vznik a výskyt vyšších koncentrací biogenních aminů, neboť řada mikroorganismů využívajících se při výrobě sýrů jako zákysové mikroorganismy vykazují značnou pozitivní dekarboxylázovou aktivitu.

V praktické části byl sledován obsah biogenních aminů v přírodních sýrech, přičemž vzorky byly odebírány v různých fázích technologického procesu výroby. Následně byla zkoumána míra schopnosti produkovat biogenní aminy mikroorganismy, které byly z těchto sýrů izolovány a identifikovány. Dekarboxylázová aktivita vybraných kmenů byla zkoumána v reálném systému přírodního sýru holandského typu, který byl vyroben laboratorně. Hodnoty všech sledovaných biogenních aminů byly srovnávány s kontrolními modelovými vzorky sýrů, tedy sýry bez přídavku sledovaného dekarboxyláza pozitivního kmene.

Bylo zjištěno, že zástupci zákysových kultur *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 824 a CCDM 946 vykazují značnou pozitivní dekarboxylázovou aktivitou, přičemž vzniká putrescin a tyramin ve významně vysokých koncentracích. Hodnoty putrescinu byly na konci doby zrání u obou vzorků vyšší než $800,0 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$. Během sledování dekarboxylázové aktivity nezákysových bakterií bylo zjištěno, že v přítomnosti kmene *Lactobacillus paracasei* DEPE T51 a DEPE T52 nedochází ke vzniku tak závažných koncentrací, jako tomu bylo v případě bakterií *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* DEPE T3 a DEPE T36. Celkové množství biogenních aminů u *Lactobacillus paracasei* DEPE T51 a DEPE T52 nepřesáhly hodnotu $100,0 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$. U bakterií rodu *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* DEPE T3 a DEPE T36 byla zpozorována významná tyramin-pozitivní dekarboxylázová aktivita, neboť koncentrace tyraminu 90. den zrání modelových vzorků byla v rozmezí $188,2 - 222,1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$. Porovnání s koncentracemi celkového obsahu biogenních aminů bylo zjištěno, že tyramin tvořil až 66 % z celkového množství 8 sledovaných biogenních aminů.

ABSTRACT

The aim of this dissertation thesis was to deal with rice and occurrence of biogenic amines in selected groups of natural cheeses. These amines can play important physiological functions at many microorganisms, plants and animals. On the other hand, higher concentrations of biogenic amines may have a negative effect on consumer health. Cheeses represent suitable environment for the rise of higher concentrations of biogenic amines. Number of microorganisms used in the cheeses production as feed microorganisms exhibit a marked positive decarboxylase activity. Thanks this reaction free amino acids appeared which are than decarboxylated to form biogenic amines.

In the practical part, the content of biogenic amines in natural cheeses was monitored. The samples were taken from various stages of the technological process of production. Subsequently, the degree of ability to produce biogenic amines by means of microorganisms was investigated. The microbes were isolated and identified from cheeses. The decarboxylase activity of selected strains has been investigated in a real Dutch-type natural cheese which was made in laboratory.

It has been found that representatives of the *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 824 and CCDM 946 show a marked positive decarboxylase activity. Production of putrescine and tyramine at significantly high concentrations was observed. The putrescine amount at the end of the maturation time of both samples were greater than 800,0 mg·kg⁻¹. During the monitoring of the decarboxylase activity of non-starter bacteria, it was found that in the presence of the *Lactobacillus paracasei* strain DEPE T51 and DEPE T52, no such rise of significant concentrations as in the case of *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* DEPE T3 and DEPE T36. The total amount of biogenic amines in *Lactobacillus paracasei* DEPE T51 and DEPE T52 did not exceed 100 mg·kg⁻¹. For bacteria of the genus *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* DEPE T3 and DEPE T36, significant tyramine-positive decarboxylase activity was observed, because the tyramine concentration was from 188, 2 to 222,1 mg·kg⁻¹. on the 90th day of maturation. Two samples inoculated by means of *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* DEPE T3 a DEPE T36 showed tyramine concentrations in 66% from total numbers of 8 biogenic amines which were studied.

OBSAH

ABSTRAKT	4
ABSTRACT	5
1. SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	8
1.1 Biogenní aminy	8
1.1.1 Vznik biogenních aminů	9
1.1.2 Toxikologické účinky biogenních aminů	16
1.1.3 Výskyt biogenních aminů	18
1.2 Zrání přírodních sýrů	21
1.2.1 Metabolizmus laktózy a reakce kyseliny mléčné	22
1.2.2 Metabolizmus citrátu	27
1.2.3 Proteolýza a metabolizmus aminokyselin	28
1.2.4 Lipolýza a metabolizmus mastných kyselin	32
1.3 Mikroorganismy produkující biogenní aminy ve vybraných skupinách přírodních sýrů	33
2. CÍLE PRÁCE	37
3. ZVOLENÉ METODY ZPRACOVÁNÍ	38
3.1 Popis experimentální části	38
3.1.1 První experiment	38
3.1.2 Druhý experiment	39
3.1.3 Třetí experiment	40
3.2 Laboratorní výroba vzorků přírodních sýrů	40
3.2.1 Výroba vzorků k experimentu 2 a 3	40
3.3 Použité metody analýz	45
3.3.1 Posouzení dekarboxylázové aktivity	45
3.3.2 Analýza základních parametrů sýrů	46
3.3.3 Texturní profilová analýza	46
3.3.4 Mikrobiologická analýza	46
3.3.5 Stanovení obsahu volných aminokyselin	47
3.3.6 Stanovení obsahu biogenních aminů	48
3.3.7 Statistické zpracování dat	49
4. Hlavní výsledky práce	50
4.1 Výsledky 1. experimentu	50
4.2 Výsledky 2. experimentu	63
4.3 Výsledky 3. experimentu	75
5. SOUHRNNÁ DISKUZE	87
6. PŘÍNOS PRÁCE PRO VĚDU A PRAXI	91
7. ZÁVĚR	92
8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	94
9. SEZNAM ILUSTRACÍ	105
10. SEZNAM TABULEK	108
11. SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK	109

12. PŘÍLOHY	110
13. SEZNAM PUBLIKACÍ AUTORA	117
14. CURRICULUM VITAE.....	119

1. SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

Přírodní sýry se v posledních letech řadí ke stále více oblíbeným potravinám, což dokazuje i statistika Českého statistického úřadu, kde přírodní sýry jsou rozděleny na skupiny tvrdé, měkké a plísňové sýry. Spotřeba přírodních sýrů vzrostla z 9,4 kg na 1 osobu za rok 2004 na 11,3 kg na 1 osobu za rok 2016. V případě spotřeby mléka a mléčných výrobků došlo meziročně ke zvýšení o 5,8 kg obyvatele za rok 2016 na hodnotu 242,3 kg ve srovnání s rokem předešlým (Báčová, 2016; Lukavcová, 2017; Vodičková, 2016).

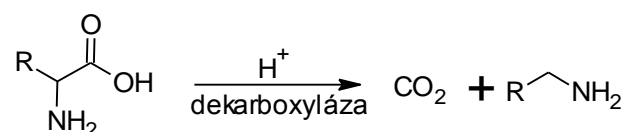
Sýry mají své charakteristické organoleptické vlastnosti (zejména chuť a vůni), které jsou důsledkem řady biochemických reakcí, protože při nich vznikají významné sensorické látky (Calzada et al., 2013, s. 4817; El-Zahar, El-Zager a Ramadan, 2014, s. 73; Fox et al., 2000, s. 12-15; 2004, s. 103-140; Roginski, Fuquay a McSweeney, 2002, s. 795). Tyto biochemické reakce probíhají již od prvních hodin výroby sýrů (nejvíce během lisování a solení sýrů), avšak k největším biochemickým změnám dochází až v průběhu zrání sýrů. Během zrání sýrů mohou být mimo jiné tvořeny biogenní aminy ve významných koncentracích, přičemž přítomnost a konzumace vysokých koncentrací mohou negativně ovlivňovat konzumentovo zdraví (Church, McCance & Widdowson, 2002, s. 110; Fox et al., 2000, s. 15; McSweeney, 2004, s. 128; Roginski, Fuquay a McSweeney, 2002, s. 799).

1.1 Biogenní aminy

Biogenní aminy (BA) jsou nízkomolekulární látky, které vznikají dekarboxylací příslušných aminokyselin působením mikroorganismů (MO) s pozitivní dekarboxylázovou aktivitou. Jejich výskyt v nízkých koncentracích je přirozený u všech živočichů, rostlin i mikroorganismů, kde plní řadu významných fyziologických funkcí (Brown, Stevens a Haas, 2001, s. 638; Buňková et al., 2013, s. 548; Dadáková, Křížek a Pelikánová, 2009, s. 365; El-Zahar, El-Zager a Ramadan, 2014, s. 74; Önal, 2007, s. 1475). Některé biogenní aminy mohou v organismu působit jako stabilizátory makromolekul (spermidin, spermin, aj.), prekurzory hormonů (např. tyramin), lokální tkáňové hormony (histamin, adrenalin, dopamin, tryptamin atd.), či jako mediátory synaptických nervů (zejména dopamin). Biogenní aminy mohou v organismu také vystupovat jako stavební látky, které se účastní syntézy dalších hormonů, nebo mohou sloužit jako zdroj dusíku pro řadu významných reakcí (Önal, Tekkeli & Önal, 2013, s. 510; Samková, Dadáková & Pelikánová, 2013, s. 309-310). Na druhou stranu konzumace vyšších množství biogenních aminů může mít závažný negativní vliv na organismus (Buňková et al., 2009, s. 534, 2010, s. 880; El-Zahar, El-Zager a Ramadan, 2014, s. 74; Fiechter, Sivec a Mayer, 2013, s. 191; Innocente et al., 2007, s. 1285; Li et al., 2014, s. 355).

1.1.1 Vznik biogenních aminů

Biogenní aminy vznikají v potravinách převážně degradací volných aminokyselin pomocí mikroorganismů s pozitivní dekarboxylázovou aktivitou. Vznik BA v potravinách může být do jisté míry ovlivněn i samotnou výrobou dané potraviny. Obr. 1 znázorňuje obecné reakční schéma dekarboxylace volné aminokyseliny za vzniku oxidu uhličitého a příslušného biogenního aminu. Dekarboxylázy, které katalyzují reakce vzniku BA, mohou být produkovány různými druhy mikroorganismů, avšak jedná se spíše o vlastnost konkrétních kmenů než celého druhu (BioCyc Database Collection, 2016; Buňková et al., 2009, s. 534; 2011, s. 113; Fiechter, Sivec a Mayer, 2013, s. 191; Loizzo et al., 2013, 38-40, Pachlová et al., 2016, 1-2).



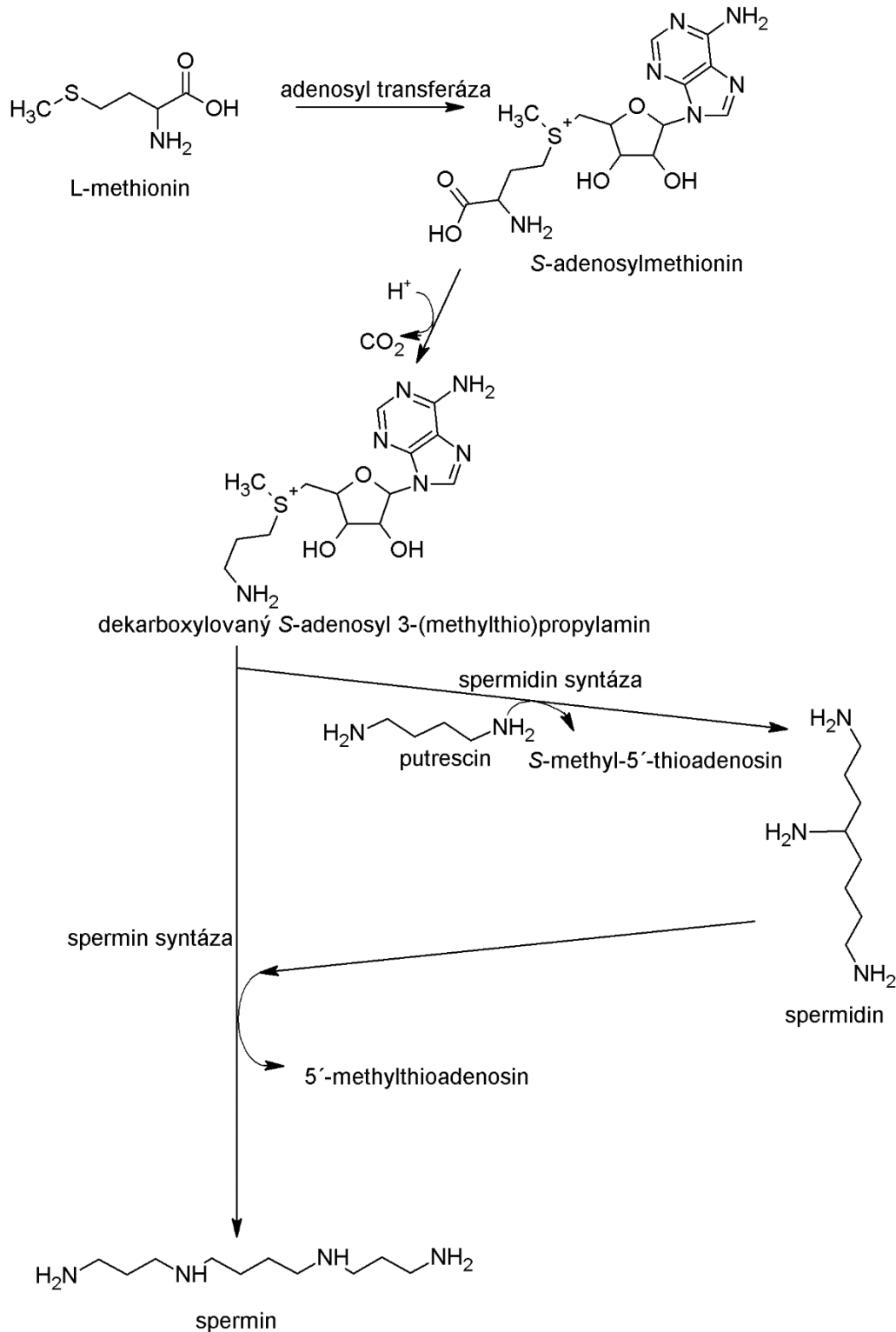
Obr. 1: Obecné reakční schéma vzniku biogenních aminů (upraveno podle BioCyc Database Collection, 2016).

Řada biogenních aminů vzniká jednostupňově, tedy výše uvedenou metabolickou drahou za účasti dekarboxylace jedním enzymem, např. histamin z L-histidinu působením histidin-dekarboxylázy. V Tabulce 1 je uveden přehled biogenních aminů, volných aminokyselin, ze kterých konkrétní BA vznikají a příslušný enzym. Tyto enzymy katalyzují celou reakci a využívají pyridoxal-5-fosfát jako kofaktor (GenomeNet, 2018; Komprda, T., 2001, s. 275; 2004, s. 58; 2008, s. 30; Shalaby, 1996, s. 676).

Tabulka 1 Vznik biogenních aminů z příslušných aminokyselin (upraveno podle Komprda, T., 2004, s. 58; 2008, s. 30; GenomeNet, 2018)

biogenní amin	volná aminokyselina	enzym
agmatin	arginin	arginin dekarboxyláza EC 4.1.1.19
fenylethylamin	fenylalanin	fenylalanin dekarboxyláza EC 4.1.1.53
histamin	histidin	histidin dekarboxyláza EC 4.1.1.22
kadaverin	lyzin	lyzin dekarboxyláza EC 4.1.1.18
putrescin	ornitin	ornitin dekarboxyláza EC 4.1.1.17
tyramin	tyrozin	tyrozin dekarboxyláza EC 4.1.1.25

Některé biogenní aminy však mohou vznikat i z jiných biogenních aminů. Například spermidin vzniká methylací putrescinu *S*-adenosyl-L-methioninem, či reakce spermidinu za vzniku sperminu (Obr. 2) (Ancín-Azpilicueta et al., 2008, s. 258; BioCyc Database Collection, 2016; Halász et al., 1994, s. 43; Kalač, 2014, s. 27; Komprda et al., 2008, s. 30).

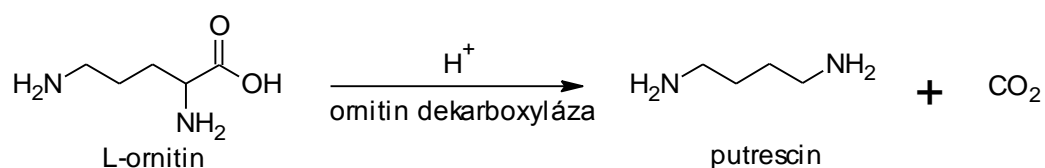


Obr. 2: Vznik spermidinu a sperminu (upraveno podle podle BioCyc Database Collection, 2016).

Oproti tomu vznik putrescinu je mnohem složitější a jeho syntéza je závislá na typu přítomných bakterií, kterými je dekarboxylován. V přítomnosti gramnegativních bakterií může být putrescin tvořen až třemi drahami působením až 8 enzymů. Působením grampozitivních bakterií může být putrescin tvořen dvěma drahami za přítomnosti 3 enzymů (viz. níže) (Ancín-Azpilicueta et al., 2008, s. 258; Fiechter, Sivec a Mayer, 2013, s. 191; Loizzo et al., 2013, 38-40; Roginski, Fuquay a McSweeney, 2002, s. 842).

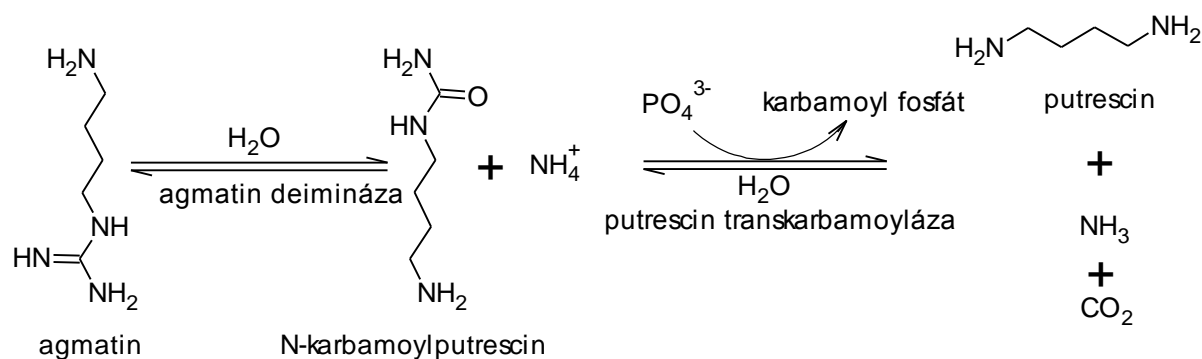
Syntéza putrescinu působením grampozitivních bakterií

Grampozitivní bakterie mohou syntetizovat putrescin dvěma drahami. První metabolickou drahou je ornitin dekarboxylázová dráha (ODC), kde je aminokyselina L-ornitin přeměněna působením ornitin dekarboxylázy na putrescin a vedlejší produkt reakce oxid uhličitý (Obr. 3) (Macrobal et al., 2006, s. 7954; Ten Brink et al., 1990, s. 74). Schopnost syntetizovat putrescin touto drahou byla zpozorována například u *Oenococcus oeni*, *Lactobacillus* spp., aj. (Fiechter, Sivec a Mayer, 2013, s. 191; Ladero et al., 2011, s. 554; Loizzo et al., 2013, s. 39; Macrobal et al., 2004, s. 214; 2006, s. 7955; Roginski, Fuquay a McSweeney, 2002, s. 842).



Obr. 3: Ornitin dekarboxylázová dráha (upraveno podle BioCyc Database Collection, 2016).

Další možností vzniku putrescinu působením grampozitivních bakterií je agmatin deiminázová dráha (AgDI) (Obr. 4) (BioCyc Database Collection, 2016).



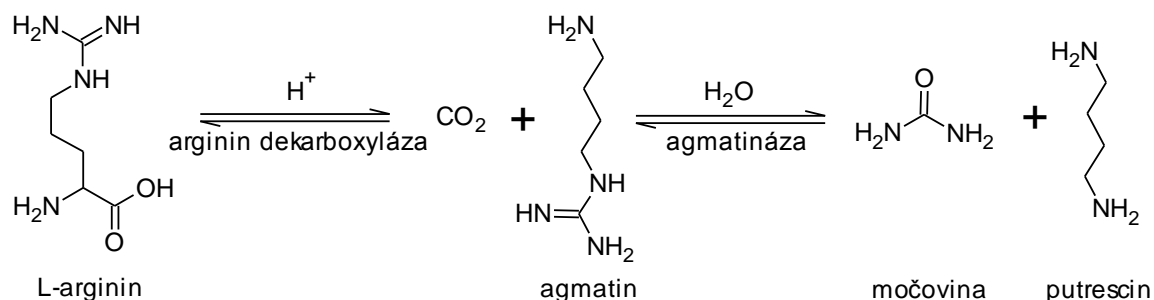
Obr. 4: Agmatin deiminázová dráha (upraveno podle BioCyc Database Collection, 2016).

Této dráhy se účastní dva enzymy, a to agmatin deimináza a putrescin transkarbamoyláza. Agmatin deimináza se podílí na přeměně agmatinu na *N*-karbamoylputrescin a amoniak. *N*-karbamoylputrescin je následně působením putrescin transkarbamoylázy rozložen na putrescin a karbamoylfosfát. Vzniklý karbamoylfosfát je následně rozkládán kinázou za vzniku ATP, oxidu uhličitého a amoniaku. Grampozitivní bakterie tak touto cestou mohou získávat energii. AgDI dráha byla popsána např. u *Lactobacillus collinoides*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus mali*, *Leuconostoc mesenteroides* aj. (Ladero et al., 2011, s. 555; Loizzo et al., 2013, s. 38; Macrobal et al., 2004, s. 214; Roginski, Fuquay a McSweeney, 2002, s. 852); Wunderlichová et al., 2014, s. 1012).

Syntéza putrescinu působením gramnegativních bakterií

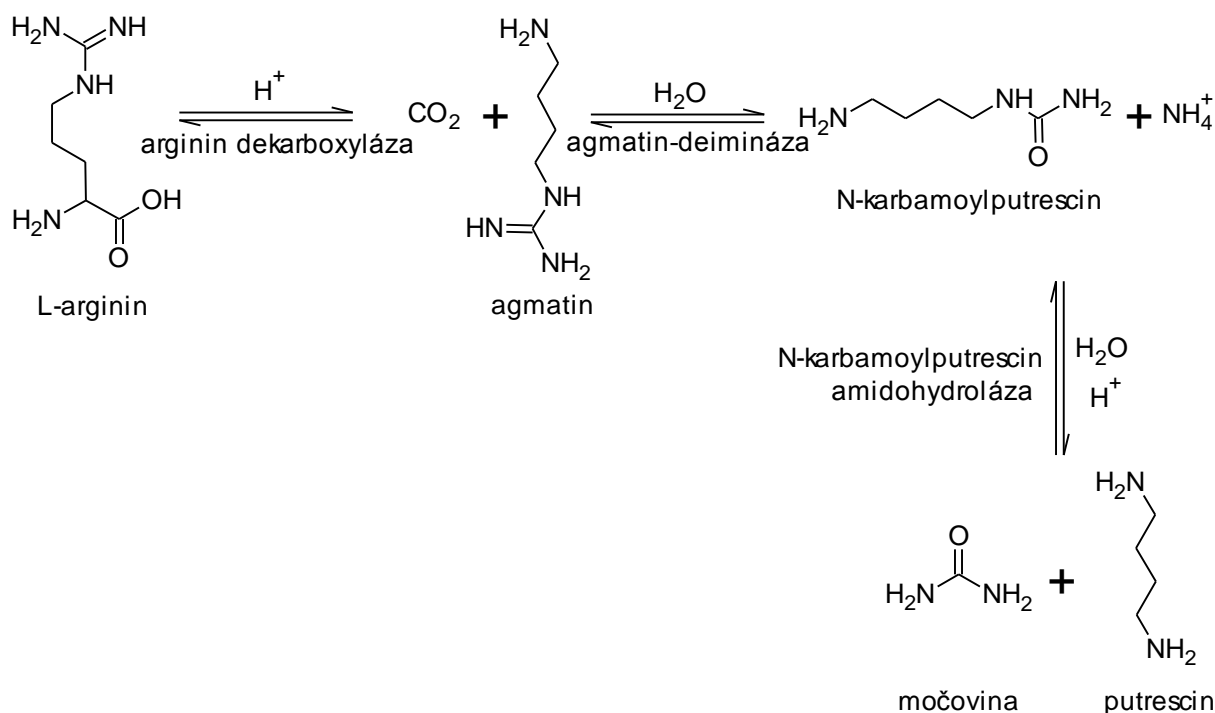
Na rozdíl od grampozitivních bakterií, syntéza putrescinu působením gramnegativními bakteriemi je značně složitější a jeho vznik může být až třemi drahami. První dráha, stejně jako u grampozitivních bakterií, je vznik putrescinu ODC dráhou (Obr. 3) (např. působením bakterií z čeledi *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* spp.) (Fiechter, Sivec a Mayer, 2013, s. 191; Loizzo et al., 2013, s. 38; Roginski, Fuquay a McSweeney, 2002, s. 842).

Další možnou syntézou putrescinu je arginin dekarboxylázová dráha (ADC), jež může v závislosti na přítomných mikroorganizmech probíhat dvěma způsoby (Obr. 5 a 6). Obě dráhy mají společný první krok, a to aminokyselina *L*-arginin je dekarboxylována na agmatin působením arginin dekarboxylázy. Díky enterobakteriím je následně agmatin přeměněn působením agmatin ureohydrolázy na močovinu a putrescin (Obr. 5) (Fiechter, Sivec a Mayer, 2013, s. 191; Loizzo et al., 2013, s. 38; Roginski, Fuquay a McSweeney, 2002, s. 842).



Obr. 5: Arginin dekarboxylázová dráha působením enterobakterií (upraveno podle BioCyc Database Collection, 2016).

Oproti tomu zástupci bakterií rodu *Pseudomonas* je agmatin nejprve přeměněn na *N*-karbamoylputrescin (enzym agmatin deimináza), který je následně rozložen vlivem *N*-karbamoylputrescin amidohydrolázy na putrescin a močovinu (Obr. 6) (Cunin et al., 1986; Fiechter, Sivec a Mayer, 2013, s. 192; Loizzo et al., 2013, s. 38).



Obr. 6: Arginin dekarboxylázová dráha působením bakterií rodu *Pseudomonas* (upraveno podle BioCyc Database Collection, 2016).

Samotný vznik biogenních aminů je však značně závislý na okolních podmínkách, které se do značné míry podílí i na míře koncentrace BA v potravinách. Faktory vzniku BA mohou být rozděleny na přímé a nepřímé. V dřívějších studiích bylo dokázáno, že významný vliv na konečnou koncentraci BA v potravinách má za příznivých podmínek i doba skladování potravin, kde s rostoucí dobou skladování roste i hodnota BA (Fiechter, Sivec a Mayer, 2013, s. 192; Kalač, 2014, s. 28; Loizzo et al., 2013, s. 38; Roginski, Fuquay a McSweeney, 2002, s. 842; Wunderlichová et al., 2013, s. 269; 2014, s. 1013).

Míra produkce sledovaného BA může být dána dvěma faktory. Buď tím, že každá buňka produkuje více sledovaného BA, ale počet buněk je stejný. Nebo produkce BA je stejná nebo i menší, avšak buněk je přítomno více. Vyhodnocení kinetiky produkce biogenních aminů bývá zpravidla vyjadřováno pomocí Gompertového modelu, který modifikoval Zwietering (Zwietering et al., 1990, s. 1-3). Následující vzorec vyjadřuje závislost sledovaného biogenního aminu (y) [$\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$] na čase (t) (Buňková et al., 2011; s. 113; Zwietering et al., 1990, s. 1-3):

$$y = A_{BA} \cdot \exp \left\{ - \exp \left[\frac{\mu_{BA} \cdot e}{A_{BA}} (\lambda_{BA} - t) + 1 \right] \right\}$$

kde:

μ_{BA}maximální rychlost produkce BA [$\text{mg}\cdot\text{h}^{-1}$]

λ_{BA}prodleva neboli čas, kdy je poprvé zjištěna produkce BA [h]

A_{BA}asymptota, která je definována jako maximální produkce BA

Pro výpočet parametrů μ_{BA} , λ_{BA} a A_{BA} může být použita nelineární regresní analýza (Marquardt-Levenburgova metoda) za použití podmínky: $\mu_{BA} > 0$, $\lambda_{BA} > 0$ a $A_{BA} > 0$ (Buňková et al., 2011; s. 113).

Závislost vyprodukovaného obsahu konkrétního biogenního aminu vyjádřeného na jednu buňku v čase (produkce při optimálních podmínkách) vyjadřuje „yield factor $Y_{BA/CFU}$ “. Tento faktor udává vyprodukovanou koncentraci biogenního aminu přepočtenou na jednu buňku. Počítá se dle následující rovnice (Buňková et al., 2011; s. 113; Dalgaard, 1995, s. 319; Emborg a Dalgaard, 2008, s. 227; Jørgensen, Huss a Dalgaard, 2000, s. 921; Zwietering et al., 1990, s. 3):

$$BA_t = BA_0 + Y_{BA/CFU} \cdot (N_t - N_0) \cdot 1000$$

kde:

BA_t a BA_0 ...koncentrace BA v čase t a v čase 0 [$\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$]

N_t a N_0 ...jsou celkové počty mikroorganismů v čase t a v čase 0 [$\text{CFU} \cdot \text{l}^{-1}$]

Marquardt-Levenburgova metoda je použita za podmínky $Y_{BA/CFU} > 0$ (Emborg a Dalgaard, 2008, s. 227).

Přímé faktory vzniku biogenních aminů

Mezi významné přímé faktory vzniku BA patří zejména přítomnost dostatečného množství příslušných volných aminokyselin, případně jejich derivátů, z nichž jsou BA pomocí dekarboxylace syntetizovány. Z tohoto důvodu je vznik biogenních aminů přímo ovlivněn samotnou proteolýzou. To je i důkazem, že u dlouhodobě zrajících sýrů bývají detekovány vyšší koncentrace biogenních aminů v důsledku probíhající proteolýzy za vzniku až volných aminokyselin. Tyto aminokyseliny následně vstupují do reakcí za vzniku BA (viz. výše) (Komprda et al., 2008, s. 220; Linares et al., 2012, s. 2-3; Novella-Rodriguez et al., 2004, s. 246).

Druhým, velmi podstatným, předpokladem pro vznik BA je přítomnost mikroorganismů s pozitivní dekarboxylázovou aktivitou (viz. kapitola 1.3 Mikroorganismy produkující biogenní aminy ve vybraných skupinách přírodních sýrů) (Buňková et al., 2010, s. 881; Dadáková, Křížek a Pelikánová, 2009, s. 366; Mayer, Fiechter a Fischer, 2010, s. 7955; Samková, Dadáková a Pelikánová, 20013, s. 310).

Nepřímé faktory vzniku biogenních aminů

Nepřímé faktory pro vznik biogenních aminů jsou takové, které mají vliv na samotné množení, růst a celkový metabolismus mikroorganismů s pozitivní dekarboxylázovou aktivitou. Mezi takové podmínky patří například koncentrace sacharidů (především glukózy), teplota, pH, přítomnost kyslíku, koncentrace NaCl, aj. Tyto podmínky jsou však závislé na konkrétním druhu, jenž produkuje enzym pro dekarboxylaci dané aminokyseliny na konkrétní biogenní amin,

a nelze tak souhrnně specifikovat výše uvedené podmínky (Dadáková, Křížek a Pelikánová, 2009, s. 366; Samková, Dádáková a Pelikánová, 20013, s. 310).

Vliv pH

Pro bakterie mléčného kvašení se za optimální pH považuje slabě kyselé prostředí (5,4 – 6,4), avšak v závislosti na kmenu se tyto hodnoty mohou lišit. Dekarboxylázy mají své optimální pH dokonce v rozmezí 4,0 – 5,5. (Komprda, 2004, s. 85; Santos, 1996, s. 214) Někteří autoři tvrdí, že vznik alkalických biogenních aminů může být z důvodu ochrany proti kyselému prostředí. Greif, Greifová a Karovičová (2006, s. 22) nebo Masson, Talon a Montel (1997, s. 201) ve svých studiích uvádí, že v kyselém prostředí byla produkce biogenních aminů dokonce zvýšená. Vlivem hodnoty pH tak mohou nastat dva případy. Produkce BA vlivem nízkého pH poklesne, neboť pH okolí bude významně nižší než optimální pH dekarboxylačního enzymu nebo pH optimálního růstu mikroorganismů s pozitivní dekarboxylázovou aktivitou. V druhém případě může nastat, že i přes nízké hodnoty pH okolí se množství produkovaných BA zvyšuje. Tento jev může nastat z důvodu, že buňky budou produkovat alkalické BA z důvodu snahy snížit kyselost okolí (Bover-Cid et al., 2008, s. 270, Buňková et al., 2011, s. 113-114).

Vliv teploty

Významným nepřímým faktorem ovlivňujícím vznik a koncentraci BA je teplota. Značná část bakterií s pozitivní dekarboxylázovou aktivitou patří mezi mezofilní bakterie, jejich optimální teplota růstu je v rozmezí 10 – 45 °C. Avšak stejně jako i u vlivu pH na produkci BA, tak i zde jsou přesné teploty optimálního růstu v závislosti na konkrétním mikrobiálním kmenu (Komprda, 2004, s. 54; Santos, 1996, s. 214).

Pachlová et al. (2012, s. 2-3) se zabývala sledováním vlivu teploty v průběhu zrání sýrů na samotnou produkci biogenních aminů. Bylo zjištěno, že s nižší teplotou dochází i ke snížení tvorby BA. Tento jev je díky tomu, že nižší teplota rovněž působí na snížení aktivity mikroorganismů s pozitivní dekarboxylázovou aktivitou (Pachlová et al., 2012, s. 5; Naila et al., 2010, s. 142).

Vliv přítomnosti využitelných sacharidů

Mezi významné sacharidy, jejichž přítomnost ovlivňuje růst mikroorganismů s pozitivní dekarboxylázovou aktivitou, patří zejména glukóza. Řada publikací uvádí koncentrace glukózy v rozsahu 0,5 – 2,0 % (w/v) za optimální. Avšak koncentrace glukózy, která je vyšší než výše uvedený rozsah, mohou mít již negativní vliv na přítomnost a růst mikroorganismů produkujících BA (Komprda, 2004, s. 55; Santos, 1996, s. 213).

Vliv NaCl

Kombinací i dalších nepřímých faktorů spolu s koncentrací NaCl lze ovlivnit vznik biogenních aminů v konečných produktech. Avšak koncentrace NaCl lze

upravovat jen do jisté míry, aby byly zachovány požadované vlastnosti finálního produktu (zejména chuť). Nižší koncentrace NaCl dokonce produkci BA mohou podpořit (1 – 2 % (w/v)). Na druhou stranu vyšší koncentrace NaCl (více než 3 % NaCl (w/v)) v prostředí může inhibovat růst mikroorganismů s pozitivní dekarboxylázovou aktivitou, a tudíž i vznik biogenních aminů (Komprda, 2004, s. 56; Korkeala, Alanko a Tiusanen, 1992, s. 28).

1.1.2 Toxikologické účinky biogenních aminů

Biogenní aminy mohou ve vysokých koncentracích negativně ovlivňovat lidský organizmus a stát se tak pro něj stát toxickými. Z hlediska jejich toxikologického působení na lidský organizmus jsou biogenní aminy rozděleny na psychoaktivní a vazoaktivní látky. BA patřící mezi psychoaktivní látky působí v organismu na nervové přenašeče. Intoxikace psychoaktivními látkami se může projevovat dočasnými změnami vnímání či chování. Zástupcem této skupiny látek je např. histamin. BA, které v organismu působí jako vazoaktivní látky, mohou ovlivňovat kardiovaskulární systém, a to přímo či nepřímo (rozšířením cév a snížením tak krevního tlaku). Intoxikace takovými BA může způsobovat i kontrakce hladkého svalstva. Tyto látky mohou být dále děleny na vazokontraktibilní (např. tyramin) či vazodilatační (např. fenylethylamin). Z hlediska rizikovitosti jsou významnou skupinou potravin alkoholické nápoje. Přítomný alkohol může snížit aktivitu detoxifikačního mechanismu a zvýšit tak riziko intoxikace biogenními aminy (viz. níže) (Buňková et al., 2010, s. 881; Dang, Pesek a Matyska, 2013, s. 4227; Křížek et al., 2014, s. 466-467; Mayer, Fiechter a Fischer, 2010, s. 3252; Önal, Tekkeli a Önal, 2013, s. 510).

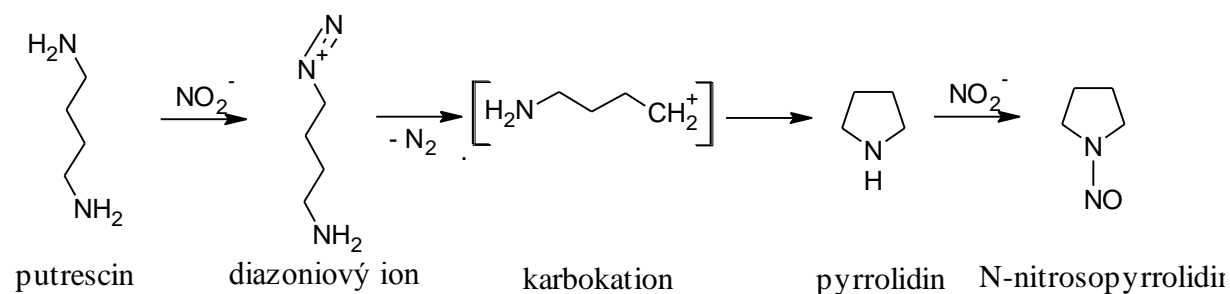
Mezi nejvýznamnější biogenní aminy z hlediska negativního účinku na lidský organizmus se řadí zejména histamin a tyramin. Intoxikace histaminem může být pozorovatelná v rámci několika minut až hodin, kdy může docházet k anafylaktickému šoku, snížení krevního tlaku, bolestem hlavy přecházející v silné migrény, kontrakce hladkého svalstva střev (břišní křeče, zvracení, průjemy), zarudnutí očí, kůže, potíže s dechem, či třes (Buňková et al., 2010, s. 881; Li et al., 2014, s. 356; Innocente et al., 2007, s. 1286; Dang, Pesek a Matyska, 2013, s. 4227; Křížek et al., 2014, s. 467; Mayer, Fiechter a Fischer, 2010, s. 3252). Konzumace potravin s koncentrací histaminu 40 – 100 mg·kg⁻¹ může vyvolat středně těžkou otravu a koncentrace nad 100 mg·kg⁻¹ může vést k velmi silným otravám. Legislativně však není uvedena žádná hranice, která by udávala toxickou koncentraci histaminu v sýrech (Anonym, 2011, s. 17; Kalač a Křížek, 2005, s. 28; Önal, 2007, s. 1476; Parente et al., 2001, s. 883). Obdobné koncentrace histaminu publikoval ve své práci i Nout (1994, s. 295), který jako maximální přípustnou koncentraci v potravinách uvedl hodnotu 50 – 100 mg·kg⁻¹. V případě alkoholických nápojů se uvádí koncentrace histaminu 8 – 20 mg·l⁻¹ jako množství, které může u konkrétních jedinců způsobit negativní fyziologické účinky na lidský organizmus. Tyto účinky mohou být

rozpoznatelné v řádu několika minut až hodin (Moreno-Arribas a Polo, 2009, s. 289).

Tyramin se řadí mezi vazokontraktibilní biogenní aminy, které mohou způsobovat hypertenzi. Mimo to může tyramin způsobovat bolesti hlavy, zvracení, či rozšíření cév, aj. (Buňková et al., 2010, s. 881; Calzada et al., 2013, s. 4817; Křížek et al., 2014, s. 467; Önal, 2007, s. 1476, Quereshi et al., 2013, s. 304). Koncentrace tyraminu 100 – 800 mg·kg⁻¹ v potravíně je v řadě publikací označována jako toxická pro lidský organizmus. Dle Nout (1994, s. 295) je množství tyraminu 1080 mg·kg⁻¹ toxická i pro konzumenty s funkčním detoxifikačním mechanismem (viz níže). Pro konzumenty užívající inhibitory aminooxidáz může mít konzumace potravin obsahující koncentraci tyraminu již 6 mg·kg⁻¹ negativní účinky na jejich zdraví (Anonym 2011, s. 19; Halász et al., 1994, s. 43; Önal, 2007, s. 1475; Santos, 1996, s. 214; Ten Brink et al., 1990, s. 75). Pro alkoholické nápoje byla uvedena hodnota tyraminu 25 – 40 mg·l⁻¹ jako koncentrace, která může vyvolat negativní účinky na lidský organizmus (Moreno-Arribas a Polo, 2009, s. 389).

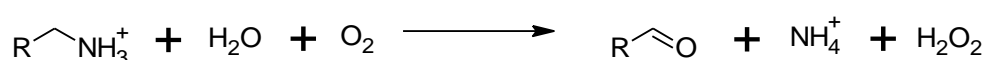
Obdobné toxikologické účinky na lidský organizmus jako má tyramin (hypertenze, bolest hlavy, zvracení, rozšiřování cév aj.) může mít také konzumace vyšších koncentrací tryptaminu a fenylethylaminu (Anonym, 2011, s. 21).

Další biogenní aminy, např. putrescin a kadaverin, nemají samy o sobě významný negativní vliv na lidský organizmus. Avšak přítomnost putrescinu a kadaverinu může zesilovat výše uvedené účinky histaminu a tyraminu. Možným rizikem především putrescinu je také fakt, že může být prekurzorem vzniku nitrosaminů, což jsou karcinogenní látky (Karovičová a Kohajdová, 2005, s. 71; Wunderlichová et al., 2014, s. 269). *N*-nitrosopyrrolidin je jedním z nitrosaminů, při jejichž vzniku je jako prekurzor putrescin. Od roku 1978 je tato látka *N*-nitrosopyrrolidin řazena Mezinárodní agenturou pro výzkum rakoviny mezi možné karcinogeny. Vznik *N*-nitrosopyrrolidinu z putrescinu je znázorněn na Obr. 7. Putrescin nejprve podléhá deaminaci a následně cyklizací vzniká pyrrolidin. V přítomnosti nitrosačního činidla pak vzniká *N*-nitrosopyrrolidin (Drabik-Markiewicz et al., 2011, s. 1540; Gasarasi et al., 2001, s. 51-53; Karovičová a Kohajdová, 2005, s. 71; Kostyukovskii a Melamed, 1988, s. 626; Yurchenko a Mölder, 2006, s. 326).



Obr. 7: Vznik *N*-nitrosopyrrolidinu z putrescinu (upraveno podle Wunderlichová et al., 2014, s. 1014).

Lidský organismus je přirozeně chráněn před intoxikací biogenními aminy, a to pomocí detoxifikačního mechanismu. Tento mechanismus je složen ze střevních enzymů a to monoaminoxidáz, diaminoxidáz a histamin-*N*-methyltransferázy. Tyto enzymy katalyzují oxidativní deaminaci aminů za vzniku příslušného aldehydu, amoniaku a peroxidu vodíku (Obr. 8). Vznikající aldehydy jsou toxické, a tak jsou následně rychle přeměněny na aminokyseliny a laktamy působením intracelulárních aldehyd-dehydrogenáz. Na druhou stranu, tento detoxifikační mechanismus může být ovlivněn několika faktory. U některých jedinců může být nízká hladina detoxifikačních enzymů genetickou příčinou, působením alkoholu, či užíváním léčiv (zejména psychofarmak, které obsahují inhibitory aminoxidáz). Funkčnost detoxifikačního mechanismu taktéž klesá s rostoucím věkem (Innocente et al., 2007, s. 1286; Loizzo et al., 2013, s. 39-40; Ůnal, 2007, s. 1476; Redruello et al., 2013, s. 1030).



Obr. 8: Obecné reakční schéma oxidativní deaminace biogenních aminů (upraveno podle BioCyc Database Collection, 2016).

1.1.3 Výskyt biogenních aminů

Biogenní aminy jsou v nízkých koncentracích přirozeně se vyskytující látky u všech mikroorganismů, živočichů i rostlin. Z hlediska fyziologie zde plní řadu významných a důležitých funkcí jako například stabilizátory makromolekul, lokální tkáňové hormony, aj. (viz. 1.1. Biogenní aminy).

Vyšší koncentrace BA však mohou negativně ovlivňovat konzumentovo zdraví. Vznik tak závažně vysokých koncentrací BA může být důsledkem přítomné mikroflóry v potravinách (Buňková et al., 2010, s. 880; Mayer, Fiechter, Fischer, 2010, s. 3252). Původ přítomných mikroorganismů s pozitivní dekarboxylázovou aktivitou v potravinách může být:

- mikroorganismy z původní suroviny (často tyto MO mohou být vnímány také jako kontaminanty, avšak mohou se podílet na řadě významných biochemických procesech, díky nimž finální produkt získá požadované a žádoucí vlastnosti). V mlékárenství se těmito mikroorganismům přispívajícím k vytváření typické jakosti výrobku říká „nezákysové bakterie“, nebo také nonstartérové;
- přídavek mikroorganismů do suroviny během technologie výroby – jedná se o zákysové (neboli startérové) kultury (viz. kapitola Fermentované potraviny);
- mikroorganismy, které se do suroviny dostaly v průběhu technologického procesu – nezákysové (nonstartérové) mikroorganismy, avšak nejsou přímo považovány za kontaminanty, neboť se významně podílí na důležitých biochemických procesech

v průběhu zrání výrobků (zejména sýrů) (viz. kapitola Fermentované potraviny);

- kontaminující mikroflóra, která se do potraviny dostala v průběhu technologie výroby potravin vlivem špatných hygienických podmínek, či nevhodným skladováním. Velká řada kontaminující mikroflóry má pozitivní dekarboxylázovou aktivitu. Výskyt BA zejména u nefermentovaných potravin je zpravidla díky kontaminující mikroflóře, a proto mohou být BA někdy označovány za indikátory čerstvosti potravin (viz. Nefermentované potraviny) (Komprda, 2004, s. 53; Mayer, Fiechter, Fischer, 2010, s. 3252; Santos, 1996, s. 214).

Na základě typu potravin v souvislosti s jejím technologickým procesem výroby je můžeme rozdělit na fermentované a nefermentované potraviny (Buňková et al., 2010, s. 881; Dadáková, Křížek a Pelikánová, 2009, s. 366; Innocente et al., 2007, s. 1285; Mayer, Fiechter, Fischer, 2010, s. 3252; Moreno-Arribas a Polo, 2009, s. 341; Önal, 2007, s. 1476).

Nefermentované potraviny

Přítomnost BA v nefermentovaných potravinách je zejména díky výskytu a působení kontaminující mikroflóry. Vzhledem k tomuto faktu mohou být BA označovány jako ukazatel kažení potravin. Tento ukazatel je vyjádřen jako BAI (Biogenic Amines Index), který se počítá dle následujícího vzorce (Buňková et al., 2010, s. 880; El-Zahar, El-Zager a Ramadan, 2014, s. 74; Fiechter, Sivec a Mayer, 2013, s. 192; Hernández-Jover et al., 1996, s. 3098; Innocente et al. 2007, s. 1286; Li et al., 2014, s. 356):

$$BAI = \frac{c_{\text{histaminu}} + c_{\text{putrescinu}} + c_{\text{kadaverinu}}}{1 + c_{\text{sperminu}} + c_{\text{spermidinu}}}$$

kde: c.....koncentrace sledovaného BA [$\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$]

Na základě hodnoty indexu BAI je možné posoudit kvalitu sledovaného masa. V případě hodnoty BAI menší než $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ jde o kvalitní čerstvé maso. Hodnoty BAI v rozmezí $5 - 20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ je maso akceptovatelné kvality, v případě hodnot $20 - 50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ maso nízké kvality a hodnoty překračující hranici $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ maso nevyhovující kvality, tedy maso zkažené (Hernández et al., 1996, s. 3098)

Významně vyšší koncentrace BA u nefermentovaných potravin byly detekovány zejména u ryb. Obsah BA v čerstvém rybím maso je téměř zanedbatelný, avšak s prodlužující se dobou jeho skladování, či při kažení se obsah biogenních aminů rapidně zvyšuje a může tak dosahovat hranic toxicity (viz. kapitola 1.1.2 Toxikologické účinky biogenních aminů). Vyšší koncentrace BA (zejména histaminu) byly detekovány především u čeledi *Scombridae* čili

makrelovití. Z toho důvodu se intoxikace BA konzumací masa této čeledi nazývá skombrotoxikóza (též známá jako histaminóza). Nařízení komise (ES) č. 2073/2005 ze dne 15. listopadu 2005 o mikrobiologických kritériích pro potraviny stanovuje hodnotu obsahu histaminu v produktech rybolovu z druhů ryb spojovaných s vysokým obsahem histidinu (zejména druhy ryb čeledi *Scombridae*, *Clupeidae*, *Engraulidae*, *Coryfenidae*, *Pomatomidae*, *Scombrosidae*). U odebraných vzorků nesmí obsah histaminu překročit hranici $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$. Toto množství může být u 2 z 9 odebraných vzorků překročeno o 100 %, tedy obsah histaminu u dvou z devíti vzorků jedné šarže může být $200 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$. Tvorba a výskyt histaminu v rybím mase je důsledkem zejména výskytu vyššího množství aminokyseliny histidinu (prekurzor histaminu), který je mimo jiné i součástí bílkovinné složky krevního barviva. BA byly detekovány i u zeleniny, ovoce (např. banány). V ostatních nefermentovaných potravinách je obsah BA zpravidla zanedbatelný v případě, že není přítomná kontaminující mikroflóra (Dang, Pesek a Matyska, 2013, s. 4227; Loizzo et al., 2013, s. 39; Quereshi et al., 2013, s. 304; Santos, 1996, s. 213).

Fermentované potraviny

Z hlediska obsahu BA představují fermentované potraviny poměrně významnější skupinu potravin, neboť jsou zde detekovány značné koncentrace biogenních aminů. Jedná se o takové potraviny, u nichž byla v průběhu technologického procesu výroby použita fermentace. Díky tomu mohou biogenní aminy ve fermentovaných potravinách vznikat působením nejen zákysových kultur (pokud pomineme produkci BA působením kontaminující mikroflóry), ale i nezákysových mikroorganismů. Řada těchto mikroorganismů může vykazovat značnou dekarboxylázovou aktivitu (Buňková et al., 2010, s. 881; El-Zahar, El-Zager a Ramadan, 2014, s. 74; Innocente et al., 2007, s. 1286; Leuschner, Kurihara a Hammes, 1999, s. 1142; Spizzirri et al., 2013, s. 44). Proto je podstatné vybírat kombinaci takových startérových mikroorganismů, které nevykazují žádnou či minimální pozitivní dekarboxylázovou aktivitu. Z toho důvodu jsou rizikovou skupinou vzhledem k vyššímu obsahu BA zejména sýry a fermentované masné výrobky. Významné vyšší koncentrace biogenních aminů mohou být detekovány i u fermentovaných nápojů (především pivo a víno). I když množství BA zde nemusí být příliš velké, riziko intoxikace BA je značně vysoké. Tento jev může být důsledkem zpravidla rychlé konzumace poměrně vyššího množství fermentovaných nápojů obsahujících BA. Dalším rizikem fermentovaných nápojů je, že přítomný alkohol může zvyšovat účinky jednotlivých biogenních aminů či může inaktivovat detoxifikační mechanismus, jenž člověka přirozeně chrání před otravou biogenními aminy (viz. kapitola 1.1.2 Toxikologické účinky biogenních aminů) (Mayer, Fiechter, Fischer, 2010, s. 3252; Quereshi et al., 2013, s. 304; Samková, Dadáková a Pelikánová, 2013, s. 310).

Vysoké koncentrace biogenních aminů byly detekovány i v sýrech, protože sýry představují zpravidla optimální prostředí pro produkci BA. Díky kombinaci několika faktorů ovlivňující dekarboxylaci aminokyselin za vzniku BA může docházet k tvorbě vysokých, či až toxických koncentrací BA. Významným faktorem je přítomnost mikroorganismů s dekarboxylázovou aktivitou. Dekarboxylační aktivita byla zpozorována u řady mikroorganismů, které jsou součástí kyslíkových kultur. Přehled kyslíkových kultur v různých skupinách sýrů je uveden v Příloze A. Mimo kyslíkové mikroorganismy se v sýrech mohou vyskytovat i nekyslíkové bakterie, u kterých byla taktéž detekována schopnost dekarboxylace aminokyselin za vzniku BA (Buňková et al., 2010, s. 880; Innocente et al., 2007, s. 1285; Calzada et al., 2013, s. 4817; El-Zahar, El-Zager a Ramadan, 2014, s. 74; Loizzo et al., 2013, s. 39). Přítomnost nekyslíkových bakterií je do jisté míry u sýrů žádoucí, neboť se mohou značně podílet na řadě biochemických reakcí v průběhu zrání sýrů (viz. kapitola 1.2 Zrání přírodních sýrů). Vlastnost mít pozitivní dekarboxylázovou aktivitu mají jednotliví zástupci, nikoliv celý kmen. Mezi bakterie s pozitivní dekarboxylázovou aktivitou se řadí např. *Lactobacillus brevis*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Streptococcus thermophilus*. Druhým předpokladem pro vznik vyšších množství BA je delší doba zrání sýrů, neboť s jeho rostoucí dobou zpravidla rostou i koncentrace BA. Třetím předpokladem je mikrobiální čistota vstupní suroviny, tedy mléka. V případě výroby sýrů z tepelně neošetřeného, tj. syrového mléka, je riziko vyšší tvorby BA způsobeno pomocí bakterií mléčného kvašení či kontaminující mikroflóry s pozitivní dekarboxylační aktivitou, zejména pomocí bakterií čeledi *Enterobacteriaceae*. Snížení rizika vzniku BA, které jsou tvořeny pomocí kontaminující mikroflóry v sýrech, by bylo možné předejít např. vhodnou hygienou při technologickém procesu výroby sýrů, zařazením alespoň šetrné pasterace mléka při technologii výroby sýrů (při teplotě 72 – 75 °C po dobu 15 – 20 sekund). Tyto postupy mohou minimalizovat výskyt kontaminujících bakterií (zničení zejména většiny saprofytických mikroorganismů při zachování aktivity laktoperoxidázy a pokud možno co nejmenší denaturace syrovátkových bílkovin) (Quereshi et al., 2013, s. 304; Samková, Dadáková a Pelikánová, 2013, s. 310; Spizzirri et al., 2013, s. 44).

Výskyt konkrétních biogenních aminů v přírodních sýrech se může lišit v závislosti na použité mikroflóře (ať už kyslíkových či nekyslíkových mikroorganismů s pozitivní dekarboxylázovou aktivitou). Mezi velmi často vyskytující se BA v přírodních sýrech byly detekovány zejména histamin, tyramin, putrescin a kadaverin (Buňková et al., 2009, s. 535; 2013, s. 549; Calzada et al., 2013, s. 4817; Schirone et al., 2013, s. 138).

1.2 Zrání přírodních sýrů

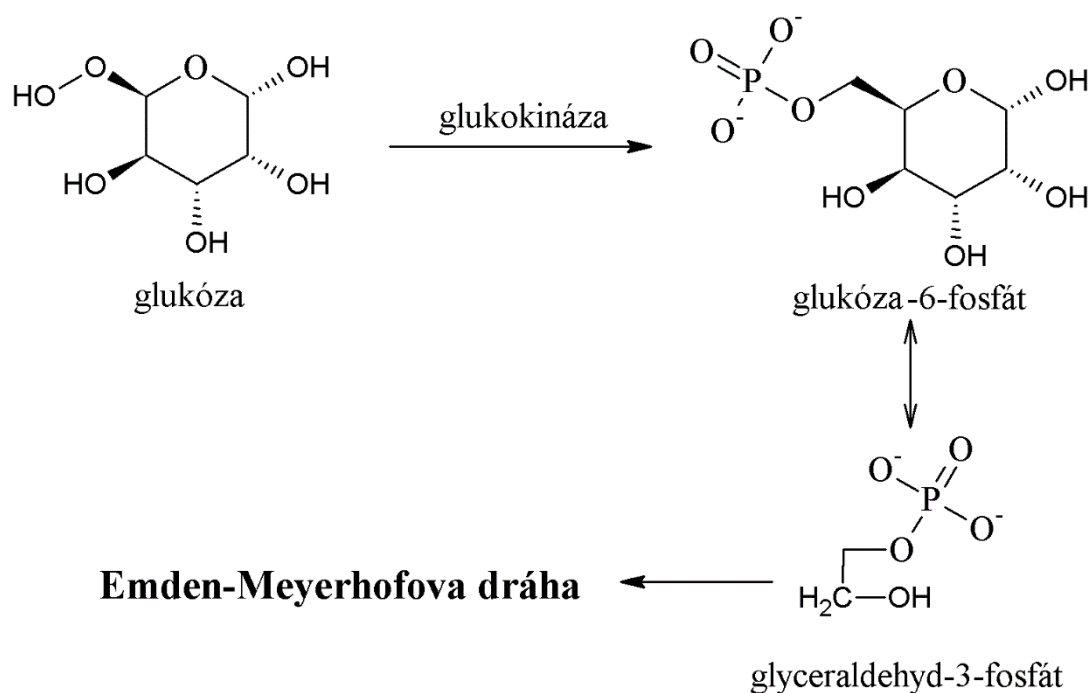
V přírodních sýrech dochází v průběhu zrání k řadě významných biochemických reakcí, které mají za následek vývoj typické textury, aroma i chuti přírodních sýrů. Mezi takové významné biochemické reakce u přírodních sýrů

se řadí zejména přeměna disacharidu laktózy za vzniku kyseliny mléčné a její následný rozklad, hydrolýza bílkovin až na aminokyseliny, které dále reagují za vzniku řady významných sensoricky aktivních látek, či v menší míře pro přírodní sýry lipolýza s následnou reakcí vzniklých mastných kyselin. Na těchto významných biochemických procesech se může podílet nejen živá mikroflóra, ale také neživá mikroflóra. Lyzí těchto buněk dochází k uvolňování enzymů do okolí, které se rovněž podílí na řadě biochemických reakcí (Calzada et al., 2013, s. 4817; El-Zahar, El-Zager a Ramadan, 2014, s. 74; Fox et al., 1998, s. 384; 2000, s. 524; 2004, s. 421; Roginski, Fuquay a McSweeney, 2002, s. 842; Schirone et al., 2013, s. 138).

1.2.1 Metabolismus laktózy a reakce kyseliny mléčné

Laktóza (disacharid složený z galaktózy a glukózy, které jsou spojeny β 1 – 4 glykozidickou vazbou) je nejvíce zastoupeným sacharidem obsaženým v mléce.

Převážná část laktózy odchází do syrovátky během výroby sýrů. Zbývá část laktózy je ve větší míře rozložena již během prvních 24 hodin od počátku výroby sýrů, u polotvrdých a tvrdých přírodních sýrů dochází k úplnému rozkladu laktózy během prvních dnů zrání (Fox et al., 2000, s. 487). U přírodních sýrů dochází k homofermentativnímu rozkladu laktózy zejména pomocí bakterií mléčného kvašení (BMK) (především bakterie *Lactococcus* spp., *Leuconostoc* spp., *Lactobacillus* spp., *Streptococcus* spp., které ji využívají jako zdroj energie pro jejich růst a množení). BMK mohou metabolizovat laktózu třemi způsoby, které jsou závislé na jejím způsobu transportu (Obr. 9 – 11).



Obr. 9: Reakce glukózy přes glukóza-6-fosfát na glyceraldehyd-3-fosfát (upraveno podle Grossiord et al., 1998, s. 79).

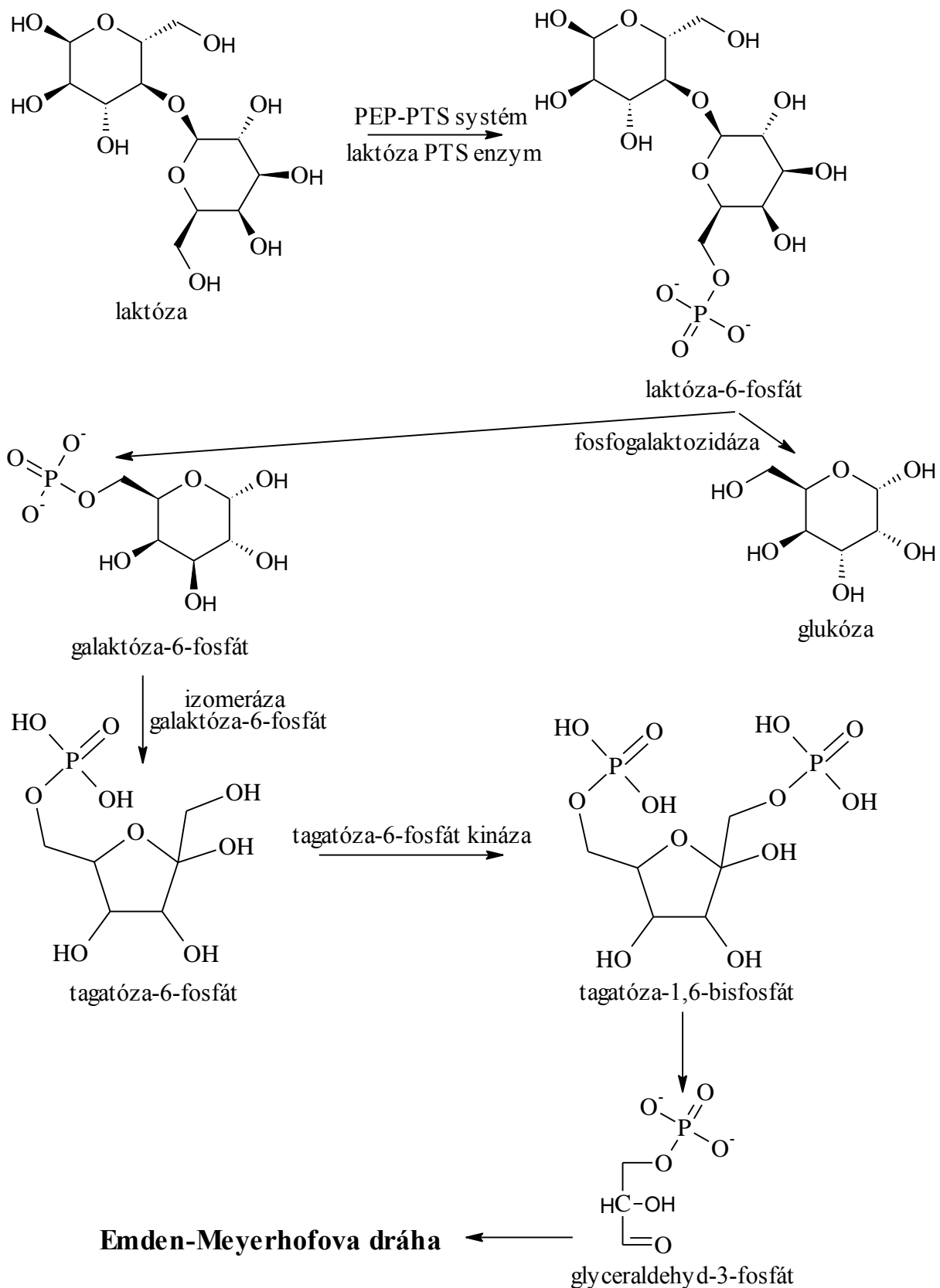
V případě utilizace laktózy dvěma drahami vzniká současně i glukóza, která je pomocí glukokinázy přeměněna na glukóza-6-fosfát (Obr. 9). Glukóza následně vstupuje do Emden-Meyerhofovy dráhy (Obr. 12). Třetí možnost utilizace laktózy probíhá za přítomnosti laktóza-galaktohydrolázy. Díky přidavku vody vzniká D-glukopyranóza a β -D-galaktóza.

První možností utilizace laktózy tedy může probíhat pomocí fosfotransferázového systému závislého na fosfoenolpyruvátu (PEP-PTS) – tagatóza-6-fosfát dráha (využívají například bakterie rodu *Lactococcus*) (Obr. 9). Tagatóza-6-fosfát dráha je založena na fosforylaci laktózy, kde konečným produktem je tagatóza-1,6-bisfosfát, jenž je rozkládán na glyceraldehyd-3-fosfát (Obr. 10) vstupující do Emden-Meyerhofovy dráhy (Fox et al., 2000, s. 549; 2004, s. 574; McSweeney a Sousa, 2004, s. 294; Roginski, Fuquay a McSweeney, 2002, s. 842).

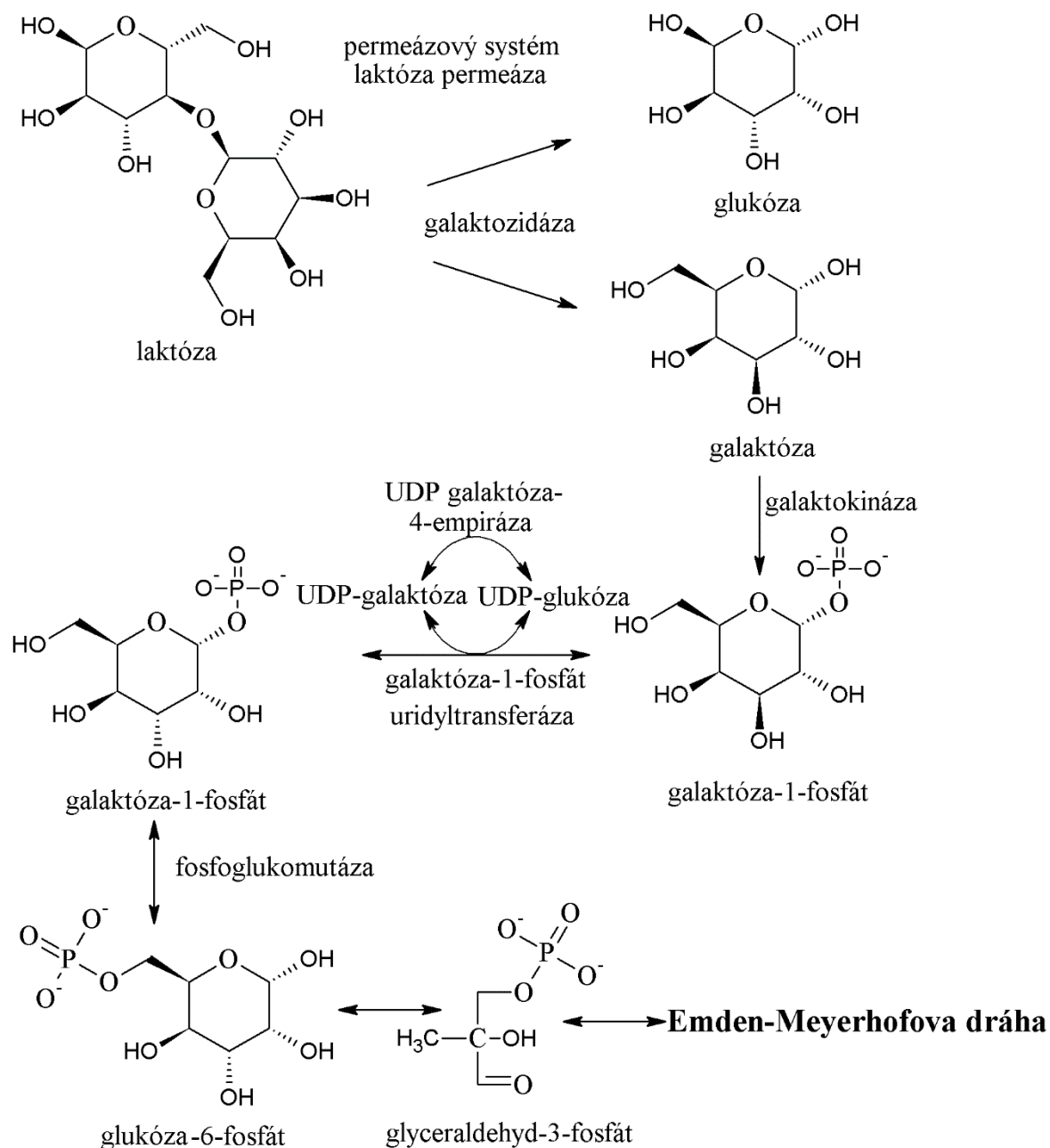
Permeázový systém neboli Leloirova dráha (Obr. 11), probíhá pomocí 3 enzymů (galaktokináza, galaktóza-1-fosfát uridylyltransferáza a UDP-galaktóza-4-epimeráza kódované v genu *gal*, identifikovaný např. u *Leuconostoc lactis*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus casei*, *Streptococcus thermophilus*, aj.). Leloirova dráha představuje hlavní cestu pro využití galaktózy při nízkých koncentracích extracelulárních sacharidů. Vzniklá glukóza-1-fosfát při této dráze může být následně přeměněna na glukóza-6-fosfát, který dále vstupuje do Emden-Meyerhofovy dráhy (Obr. 12) (Fox et al. 1993, s. 354; 2000, s. 489; 2004, s. 347; McSweeney a Sousa, 2000, s. 294; Roginski, Fuquay a McSweeney, 2002, s. 842).

Principem Emden-Meyerhofovy dráhy (Obr. 12) je postupná fosforylace glukózy. Tato fosforylace probíhá díky působení enzymů hexokinázy a fosfoglukózaizomerázy. Konečným produktem Emden-Meyerhofovy dráhy je pyruvát, který je dále redukován pomocí bakterií mléčného kvašení na laktát vlivem laktát dehydrogenázy. V důsledku vzniku laktátu dochází v prvních dnech k poklesu pH sýrů. Přílišné okyselení sýra může negativně ovlivňovat růst nejen kontaminující mikroflóry, ale také mikroorganismů, jejichž enzymy by se mohly podílet na dalších biochemických procesech v průběhu zrání (Fox et al., 2000, s. 489; 2004, s. 347; McSweeney, 2004, s. 128).

Následnou reakcí kyseliny mléčné dochází k nárůstu pH sýrů a vzniku dalších sensoricky aktivních látek. Pomocí nezákysových bakterií mléčného kvašení či zákysovými bakteriemi rodu *Lactobacillus* může docházet k racemizaci (D-laktát, L-laktát, či jejich racemická směs). Bakterie mléčného kvašení mohou přeměňovat laktát na formiát, acetát, etanol a oxid uhličitý. Acetát se významně podílí na tvorbě aromatu mnoha sýrů.

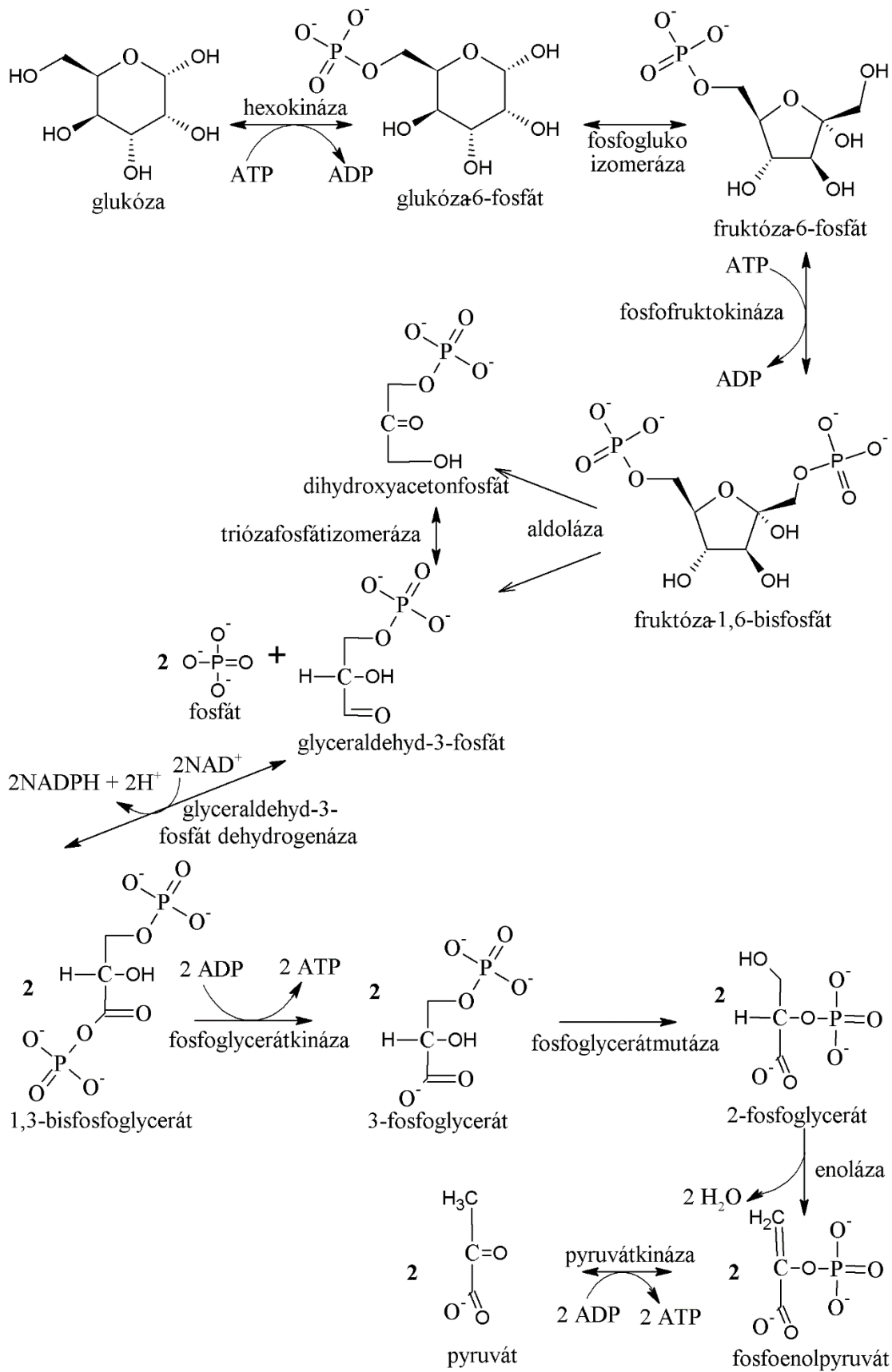


Obr. 10: Tagatóza-6-fosfát dráha utilize laktózy (upraveno podle Grossiord et al., 1998, s. 79).



Obr. 11: Leloirova dráha utilizace laktózy (upraveno podle Grossiord et al., 1998, s. 79).

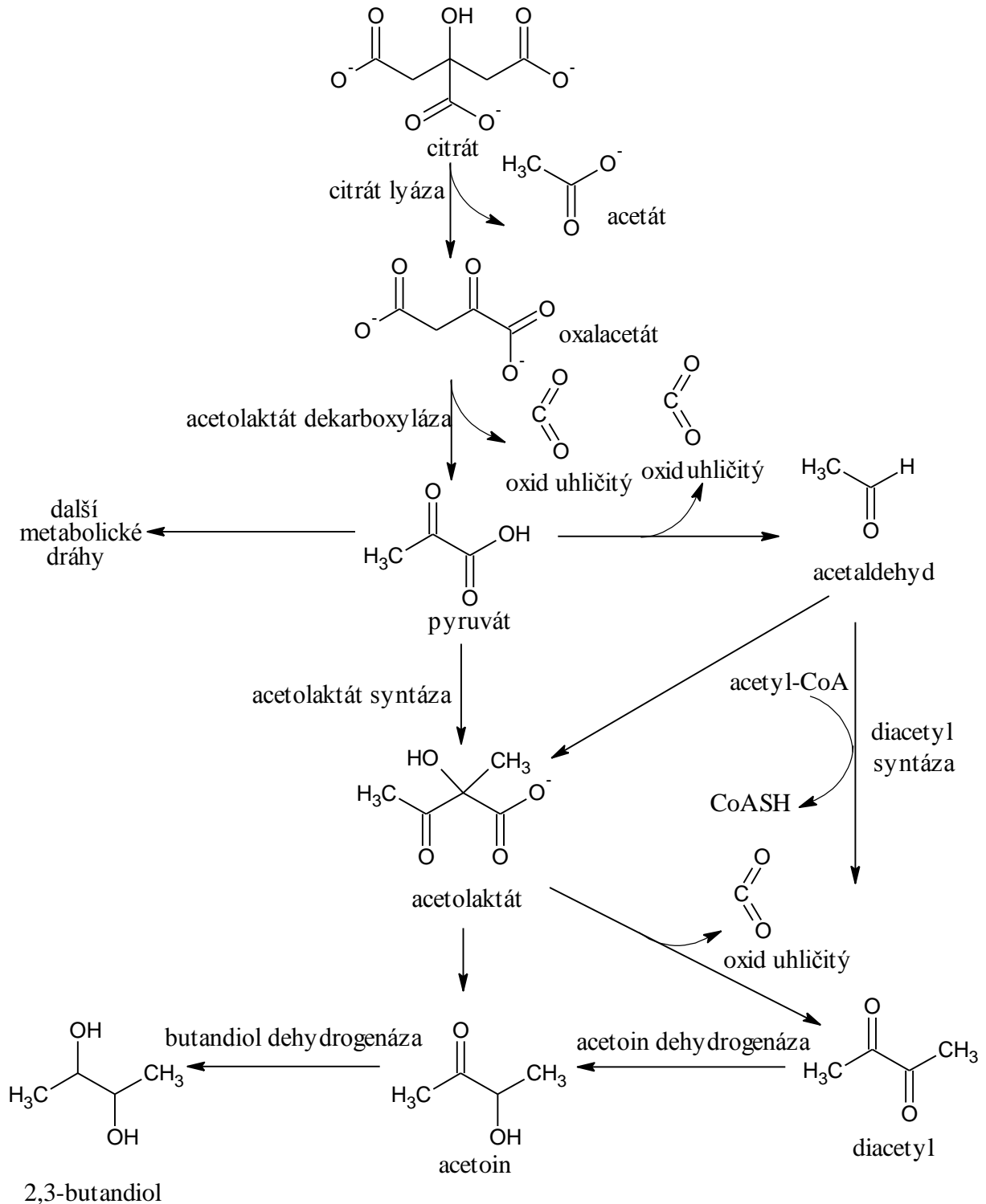
Vznikající oxid uhličitý v průběhu metabolismu laktózy pomocí bakterií mléčného kvašení má za následek tvorbu sýrových ok. Oxid uhličitý však může vznikat i během metabolismu citrátu (viz. níže). U sýrů holandského typu je vznik sýrových ok (typicky 3-5 ok o velikosti hrášku v nákroji). Tvorba menších ok může být důsledkem menšího množství laktózy či zrání při nižších teplotách, než je pro daný druh sýra charakteristický (Fox et al., 1998, s. 342; 2000, s. 387; 2004, s. 521; Grossiord et al., 1998, s. 78; McSweeney a Sousa, 2000, s. 294; Roginski, Fuquay a McSweeney, 2002, s. 842).



Obr. 12: Emden-Meyerhofova dráha (upraveno podle McSweeney a Sousa, 2000, s. 294).

1.2.2 Metabolizmus citrátu

Mléko obsahuje přibližně 1600 – 1800 mg citrátu na 1 l mléka, přičemž ~ 94 % veškerého citrátu přechází do syrovátky (v rozpustné formě), zbylý citrát zůstává v sýrenině ve formě koloidního citrátu (Fox, 1993, s. 478; McSweeney a Sousa, 2000, s. 294).



Obr. 13: Metabolizmus citrátu (upraveno podle McSweeney, 2004, s. 128).

Metabolismus citrátu může být významným prekurzorem pro vznik sensoricky aktivních látek produkovaných mezofilní kysločnou kulturou. Citrát může být metabolizován společně se zkvasitelnými cukry působením citrát-pozitivních laktokoků (např. *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis*) (Obr. 13).

Pro sýry holandské typu je významnou sensoricky aktivní látkou diacetyl a jeho následné rozkladné produkty (acetoin a 2,3-butandiol), v menším množství je tvořen i oxid uhličitý (Alewijn, 2006, s. 102; Bylund, 2003, s. 324; Fox et al., 2000, s. 612; McSweeney a Sousa, 2000, s. 294).

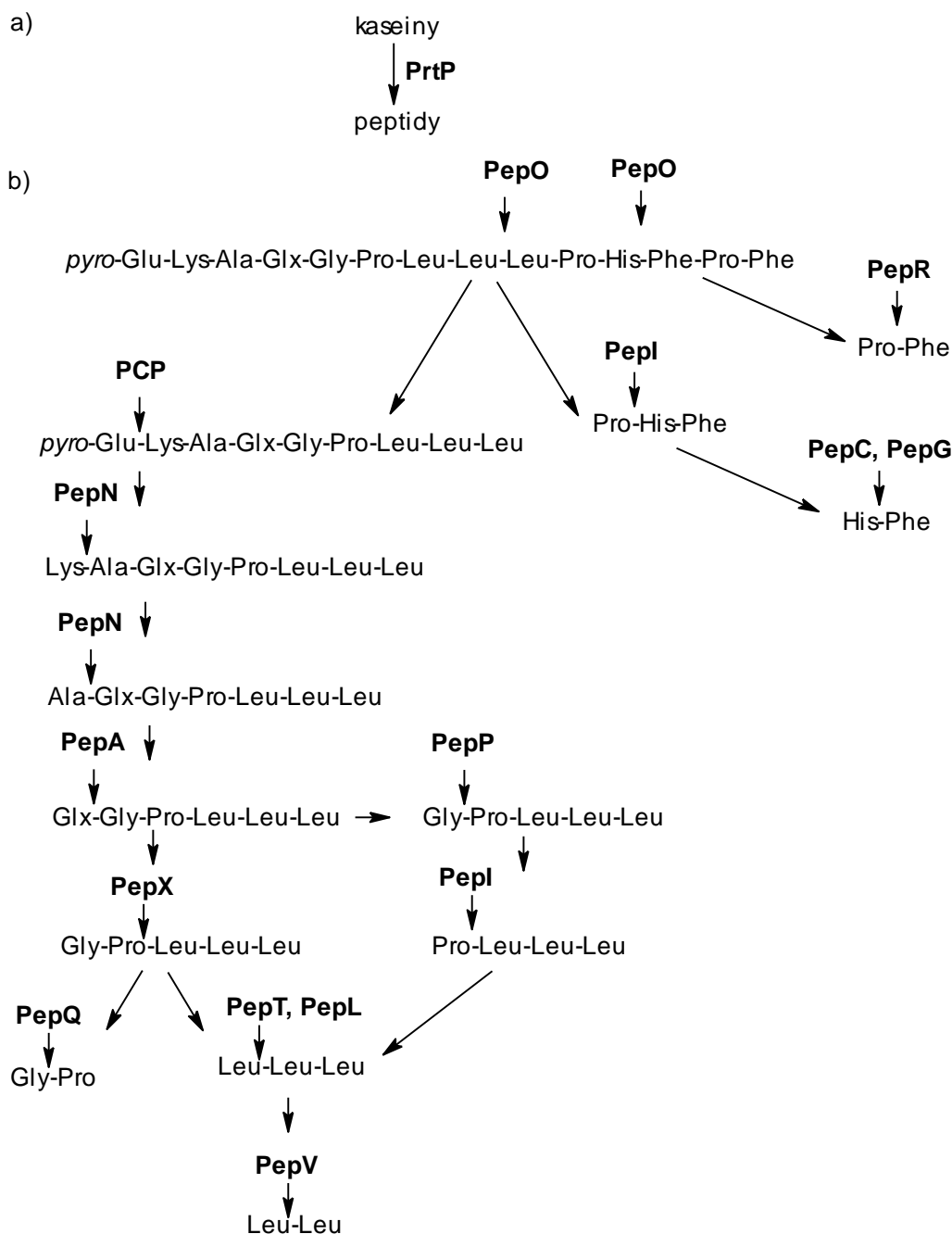
1.2.3 Proteolýza a metabolismus aminokyselin

Proteolýza je katalyzována enzymy, které mohou pocházet z různých zdrojů, avšak pro přírodní sýry jsou významné enzymy pocházející z koagulačního činidla, enzymy mléka a enzymy přítomných bakterií mléčného kvašení (zákysové a nezákysové). V některých případech mohou být při výrobě sýrů přidávány proteinázy, které mají za úkol urychlení zrání sýrů. Enzymy účastnící se proteolýzy proteinů mohou být rozděleny na:

- a) enzymy z koagulačního činidla (enzymy syřidla) – pro přírodní sýry zejména chymozin, jehož úkolem je specifická hydrolýza peptidové vazby aminokyselin Phe₁₀₅-Met₁₀₆ stabilizujících protein (κ -kasein) v průběhu syření mléka. Enzymy syřidla ve velké míře přechází do syrovátky, avšak přibližně 6 % zůstává v syřenině. Chymozin dále štěpí β -kasein na 7 místech, přičemž většina z nich se nachází v blízkosti hydrofobního terminálního uhlíku β -kaseinu a štěpí např. Leu₁₉₂-Tyr₁₉₃ za vzniku krátkých hydrofobních peptidů mající hořkou chuť. Primárním místem působení chymozinu na α_{s1} -kasein (α_{s1} -CN) je Phe₂₃-Phe₂₄, dále Leu₁₀₁-Lys₁₀₂. α_{s2} -kasein je odolnější vůči působení chymozinu, a tak je hydrolýza omezena na hydrofobní oblasti molekuly (sekvence 90 – 120 a 160 – 207) (Alewijn, 2006, s. 95; Grossiord et al., 1998, s. 78; McSweeney, 2004, s. 128; Pachlová et al., 2011, s. 102);
- b) enzymy mléka – plazmin a možné proteinázy somatických buněk (proteinázy z leukocytů somatických buněk, např. katepsin B, D a elastázy). Plazmin je složitý komplex, který se skládá z aktivního enzymu plazminu a jeho zymogenu plazminogenu, aktivátoru plazminogenu a inhibitorů plazminu. Plazmin, plazminogen i aktivátor plazminogenu jsou spojeny s kaseinovými micelami, zatímco inhibitory plazminu a inhibitory aktivátorů plazminogenu jsou přítomné v séru, a tak odchází v syrovátce. Na aktivaci plazminogenu se mohou podílet i enzymy somatických buněk. Specifičnost plazminu je omezena na peptidové vazby typu Lys-X, v menší míře na Arg-X, přičemž jsou kaseiny hydrolyzovány v pořadí β -kasein \approx α_{s2} -kasein $>$ α_{s1} -kasein (kde X označuje jakoukoli další aminokyselinu). κ -kaseinové vazby jsou pravděpodobně odolné vůči působení plazminu. β -kasein je plazminem štěpen na třech místech (Lys₂₈-Lys₂₉, Lys₁₀₅-His₁₀₆

a Lys₁₀₇-Glu₁₀₈) (Grossiord et al., 1998, s. 78; McSweeney a Sousa, 2000, s. 295);

- c) enzymy BMK – bakterie mléčného kvašení mají široký proteázový systém za vzniku aminokyselin, které jsou nezbytné pro jejich růst. Tyto bakterie mají proteázy v obalových vrstvách buněk (PrtP, laktocepin), několik intracelulárních oligoendopeptidáz (PepO a PepF), a nejméně 3 hlavní aminopeptidázy (PepN, PepC a PepG), glutamyl aminopeptidáza PepA, pyrrolidin karboxylylpeptidázu (PCP), leucyl aminopeptidázu (PepL), prolyl-dipeptidyl aminopeptidázu (PepX), prolyl iminopeptidázu (PepI), aminopeptidázu P(PepP), prolinázu (PepR), prolidázu (PepQ), hlavní dipeptidázu (PepV) a hlavní tripeptidázu (PepT). Enzym PrtP přispívá k tvorbě malých peptidů z α_{s1} -kaseinu či β -kaseinu, zatímco intracelulární enzymy buněk BMK aminopeptidázy, dipeptidázy a tripeptidázy jsou po rozpadu a uvolnění buněk zodpovědné za vznik volných aminokyselin (Obr. 14) (Grossiord et al., 1998, s. 78; McSweeney a Sousa, 2000, 295).



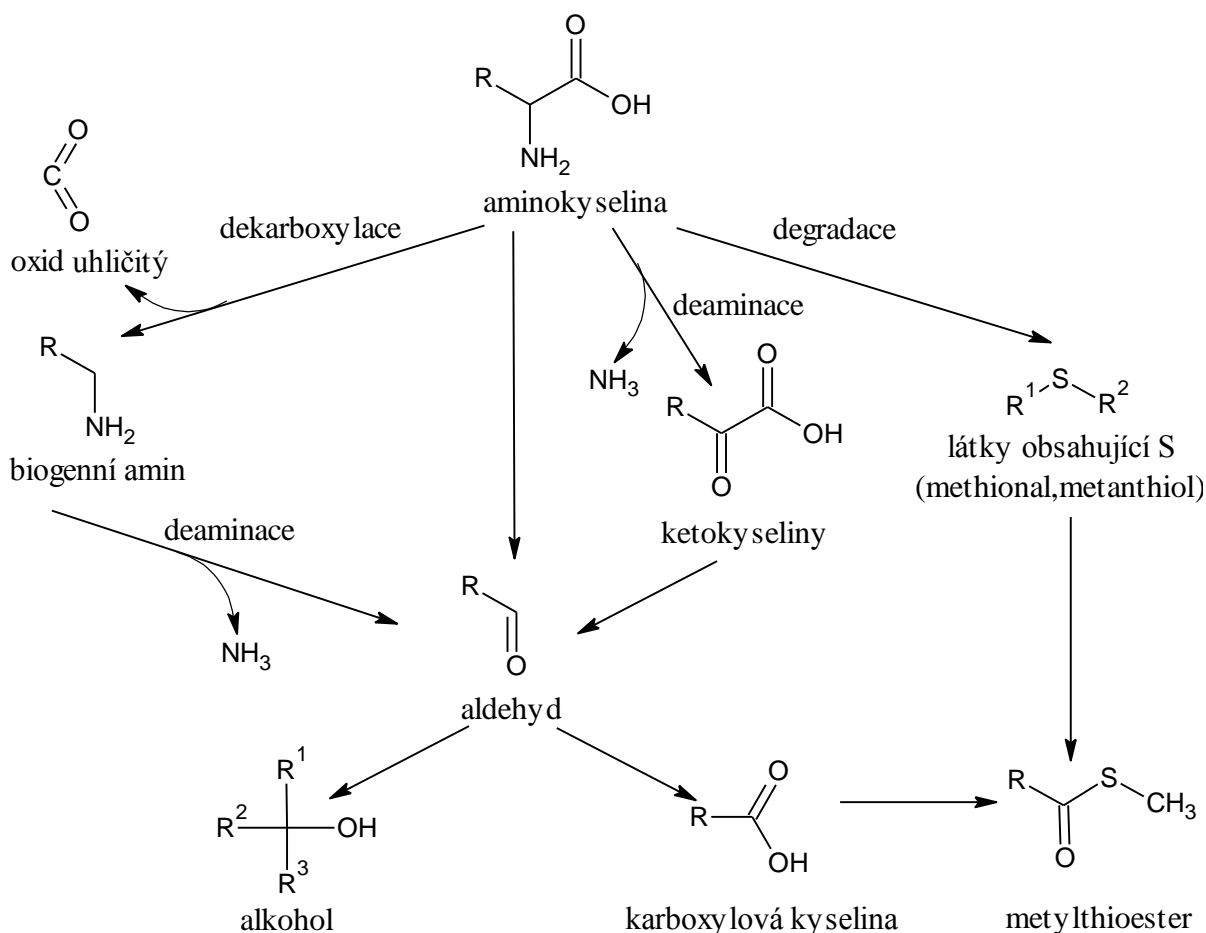
Obr. 14: Hydrolýza kaseinů a jejich derivátů peptidů pomocí enzymů bakterií rodu *Lactococcus* (upraveno podle McSweeney, 2004).

kde: a) hydrolýza kaseinů pomocí proteinázy PrtP bakteriemi rodu *Lactococcus*;
 b) degradace možných tetrapeptidů kombinovaným působením proteináz a peptidáz laktokoků (PepO – oligoendopeptidáza; PepI – prolyl iminopeptidáza; PCP – pyrrolidon karboxylyl peptidáza; PepN, PepC a PepG – hlavní aminopeptidázy; PepL – leucyl aminopeptidáza; PepA: glutamyl aminopeptidáza; PepX – X-prolyl-dipeptidyl aminopeptidáza; PepR – prolináza; PepQ – prolidáza; PepV – dipeptidáza; PepT – tripeptidáza.

d) Enzymy sekundárních kultur - (*Propionibacterium freudenreichii* ve švýcarských typech sýrů, *Penicillium roqueforti* v sýrech s plísní v těstě,

Penicillium camemberti u sýrů splísni na povrchu, a skupina gram-pozitivních bakterií sýrů zrajících pod mazem – rody *Brevibacterium*, *Arthrobacter*, aj.). *Brevibacterium linens* produkuje extracelulární proteinázy a aminopeptidázy a řadu intracelulárních enzymů (Grossiord et al., 1998, s. 78; McSweeney a Sousa, 2000, 294). K sekundárním kulturám se řadí i nezákysové bakterie (např. *Lactobacillus* spp., aj. Williamsa a Banksa (1997, s. 763) se ve své studii zabývali proteolytickou a hydrolytickou aktivitou enzymů nezákysové bakterií, které byly izolovány ze sýrů čedar. Nejčastějšími izolovanými mikroorganismy byl zejména *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* a *Lactobacillus plantarum*. Celkem bylo izolováno 34 proteolytických, 5 hydroláz a 5 esterolytických enzymů. Tyto enzymy jsou zodpovědné v průběhu zrání za typickou vůni.

Vzniklé aminokyseliny mohou dále reagovat za vzniku významných sensoricky aktivních látek (Obr. 15).



Obr. 15: Obecný reakční mechanismus aminokyselin (upraveno podle Fox et al., 2000, s. 73).

Jednou z významných reakcí v sýrech během zrání je deaminace AMK (odštěpení aminoskupiny) za vzniku α -ketokyselin. Další reakcí AMK a α -ketokyselin vznikají aldehydy a příslušné kyseliny dle Streckerovy degradace (např. vznik isobutanalu z leucinu a izoleucinu, methionalu z valinu, 3-metylbutanal z methioninu, aj.). Vznikající aldehydy se v sýrech nehromadí, neboť jsou poměrně rychle přeměněny na alkoholy nebo na odpovídající kyseliny. Neméně významnou reakcí AMK je jejich degradace (zejména metioninu) za vzniku sírných sloučenin (methionalu a metanthiolu). Degradace AMK je specifická např. u sýrů s plísní či sýrů zrajících pod mazem (díky enzymatické činnosti zejména sekundárních kultur). Vzniklé thioaldehydy a alkoholy mohou v těchto sýrech v průběhu zrání dále reagovat za vzniku metylthioesterů (Fox et al., 2000, s. 75, 2004, s. 185; McSweeney a Sousa, 2000, s. 294; Yvon a Rijnen, 2001, s. 186).

Dekarboxylace AMK za vzniku BA je jedna z nejdůležitějších reakcí, neboť vysoké koncentrace BA mohou negativně ovlivňovat konzumentovo zdraví. Přeměna AMK na BA probíhá působením dekarboxylačních enzymů mikroorganismů. Díky probíhající proteolýze vznikají volné aminokyseliny, čímž je splněn jeden ze dvou přímých faktorů mající vliv na vznik BA (viz. 1.1.1. Vznik biogenních aminů) (BioCyc Database Collection, 2016; Buňková et al., 2009, s. 534; 2011, s. 113; Fiechter, Sivec a Mayer, 2013, s. 191; Loizzo et al., 2013, s. 39; Pachlová et al., 2016, s. 2; Roginski, Fuquay a McSweeney, 2002, s. 841).

1.2.4 Lipolýza a metabolismus mastných kyselin

Lipolýza není u většiny přírodních sýrů žádoucí ve velké míře (např. u sýrů holandského typu), neboť vysoké koncentrace mastných kyselin by mohly vést ke žluknutí. Přibližně 3,5 – 4,5 % (w/w) lipidů je obsaženo v kravském mléce, přičemž 97 – 98 % z těchto lipidů tvoří triacylglyceroly. V průběhu lipolýzy jsou z těchto triacylglycerolů uvolňovány vysoké koncentrace krátkých až středně dlouhých řetězců mastných kyselin (zejména mastné kyseliny mající sudý počet uhlíků o rozsahu $C_4 - C_{18}$), čímž se přímo podílí na sensorické jakosti sýra (Fox et al., 2000; Fox & McSweeney, 1998; McSweeney, 2004).

Lipolýza je rozsáhlá zejména v tvrdých sýrech italského typu, sýrech s modrou plísní či v sýrech zrajících pod mazem (Fox et al., 2000, s. 75, 2004, s. 185; McSweeney a Sousa, 2000, s. 294; Yvon a Rijnen, 2001, s. 187).

Enzymy (lipázy) se mohou v sýrech vyskytovat z několika zdrojů (lipázy mléka, lipázy syřidlových past – zejména u syřidlových past používaných pro výrobu některých druhů italských sýrů, lipázy kyselých a nezákladových bakterií, přídavek exogenních lipáz, či lipázy sekundárních kultur). Mezi lipázy mléka patří např. lipoprotein lipáza, avšak jeho činnost je snížena pasterací. Lipoprotein lipáza (LPL) se účastní rozkladu triacylglycerolů, ale tukové kuličky v mléce jsou vůči účinkům LPL chráněny díky membráně obsahující inhibitory LPL. Kromě inhibitorů LPL nedochází v samotném mléce k rozsáhlé lipolýze, protože 90 % LPL je vázáno s kaseinovými micelami. LPL se podílí na hydrolyze

triacylglycerolů se středně dlouhým řetězcem, a to C₆ – C₁₂ (Fox et al., 2000, s. 75, 2004, s. 185; McSweeney a Sousa, 2000, s. 294; Yvon a Rijnen, 2001, s. 187).

Lipázy kyselých bakterií (zejména bakterie rodu *Lactococcus*) jsou slabě lipolytické, ale bylo zjištěno, že zejména při delší době zrání sýrů (jsou-li přítomny ve vyšších počtech) jsou zodpovědné za uvolňování mastných kyselin z triacylglycerolů. U sýrů švýcarského typu přispívají k lipolýze i bakterie rodu *Propionibacterium*. K lipolýze do značné míry přispívají i bakterie sekundárních kultur či kvasinky, které se využívají v technologii výroby některých druhů sýrů (sýry s plísní, sýry zrající pod mazem, aj.), např. *Brevibacterium linens*, *Geotrichum candidum* (Fox 1993, s. 124, 2004, s. 185; McSweeney a Sousa, 2000, s. 294; Yvon a Rijnen, 2001, s. 187).

1.3 Mikroorganismy produkující biogenní aminy ve vybraných skupinách přírodních sýrů

Dle vyhlášky Ministerstva zemědělství 397/2016 Sb., v platném znění, jsou přírodní sýry děleny dle konzistence ve vztahu k obsahu vody v tukuprosté hmotě sýra (VVTPH) na extra tvrdé (méně než 47,0 % VVTPH), tvrdé (47,0 – 54,9 % VVTPH), polotvrdé (55,0 – 61,9 % VVTPH), poloměkké (62,0 – 68,0 % VVTPH) a měkké sýry (více než 68,0 % VVTPH). Obsah vody v tukuprosté hmotě sýra se stanoví dle následujícího vzorce:

$$\% VVTPH = \frac{g \text{ vody}}{100 - g \text{ tuku}} \times 100$$

Další možností dělení přírodních sýrů dle vyhlášky Ministerstva zemědělství 397/2016 Sb., v platném znění, je dle obsahu tuku v sušině (TVS) na sýry vysokotučné (více než 60,0 % TVS), plnotučné (45,0 – 59,9 % TVS), polotučné (25,0 – 44,9 % TVS), nízkotučné (10,0 – 24,9 % TVS) a odtučněné sýry (méně než 10,0 %). Obsah tuku v sušině sýra se vypočítá dle rovnice:

$$\% TVS = \frac{g \text{ vody}}{100 - g \text{ tuku}} \times 100$$

Nedílnou součástí technologie výroby sýrů je využití kyselých bakterií (v oblasti mlékárenství nazývané také „čisté mlékařské kultury“). Tyto bakterie jsou zodpovědné za řadu biochemických přeměn v průběhu zrání sýrů, během kterých dochází k tvorbě řady sensoricky aktivních látek. Kromě kyselých bakterií mohou mikroflóru sýra tvořit i nezákysové bakterie, a tak je jejich přítomnost do jisté míry žádoucí. Přehled jednotlivých skupin a podskupin sýrů spolu s jejich nejčastěji používanými kyselými kulturami při výrobě sýrů je uveden v Příloze A (Fox et al., 2000, s. 347; 2004, s. 142).

Pro polotvrdé až tvrdé sýry (Gouda, Edam, aj.) jsou bakterie rodu *Lactococcus* velmi často využívány jako součást zákysových kultur při jejich výrobě. Burdychová a Komprda (2007, s. 150) se ve své publikaci zabývali sledováním dekarboxylázové aktivity u sýrů holandského typu vyrobených za použití dvou rozdílných zákysových kultur. Dekarboxylázová aktivita u mikroorganismů byla zkoumána pomocí PCR analýzy, která byla zaměřena na detekci specifické sekvence DNA kódující histidin-dekarboxyláza (schopnost produkce histaminu) a tyramin-dekarboxyláza enzymy (schopnost produkce tyraminu). Tyto výsledky byly porovnávány s koncentracemi sledovaných biogenních aminů, které byly získány pomocí HPLC. U vzorků sýrů vyrobených ze zákysové kultury (složená z mikroorganismů *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis*, *Streptococcus thermophilus* a *Lactobacillus helveticus*) bylo izolováno 14 kmenů s tyramin-dekarboxyláza enzymem. Pomocí HPLC analýzy zde byla zjištěna pětikrát vyšší koncentrace tyraminu ve srovnání se vzorky sýrů vyrobených za použití druhé zákysové kultury (složená z mikroorganismů *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* a *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*). Současně byla při výzkumu použita i metoda PCR. Byla zjištěna přítomnost tyrDC a hDC. Potvrdilo se, že je zde 100 % identita se sekvencemi *Lactobacillus* 30a ATCC 33222 pro histidin-dekarboxylázu a *Enterococcus faecalis* CNRZ 238 pro tyrosin-dekarboxylázu (Burdychová a Komprda, 2007, s. 151).

Schopností produkovat biogenní aminy (tyramin, histamin, fenylethylamin a tryptamin) vybranými bakteriemi rodu *Lactococcus* v polotvrdých italských sýrech se zabýval i Genovese et al. (2013, 1074-1076). Dekarboxylázová aktivita byla sledována u tří kmenů *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. Všechny sledované kmeny byly označeny jako mikroorganismy s negativní fenyletylamin- a tryptamin-dekarboxylázovou aktivitou, neboť po celou dobu experimentu nebyly tyto BA detekovány. Schopnost produkce histaminu dekarboxylací histidinu byla zjištěna u dvou kmenů *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*. U jednoho kmene *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* byla také zpozorována značná pozitivní tyramin-dekarboxylázová aktivita v porovnání s ostatními kmeny. Dle Ladero et al. (2012, s. 310) byly označeny kmeny *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (celkem 5 kmenů) a kmeny *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* (celkem 4 kmeny) s pozitivní putrescin-dekarboxylázovou aktivitou.

Burdychová & Komprda (2007, s. 151) uvedli, že produkce histaminu v sýrech holandského typu během jejich studie byla důsledkem působení bakterií rodu *Lactobacillus* (*Lactobacillus curvatus* a *Lactobacillus lactis*), které jsou mnoha autory označovány jako nezákysové bakterie sýrů holandského typu (Fox et al., 2000, s. 142; Fröhlich-Wyder et al., 2013, s. 123). U bakterií rodu *Lactobacillus* (2 kmeny *Lactobacillus brevis* a 2 kmeny *Lactobacillus curvatus*), které se řadí mezi nezákysové bakterie sýrů holandského typu, byla rovněž popsána schopnost dekarboxylace argininu za vzniku putrescinu (Ladero et al., 2012, s. 310).

U těchto vybraných kmenů byla rovněž prokázána pomocí metody PCR přítomnost tyramin-dekarboxyláza genu pro tvorbu vysokých koncentrací tyraminu (Ladero et al., 2010, s. 933). Obdobné výsledky byly publikovány Buňkovou et al. (2010, s. 883). V této studii byla sledována dekarboxylázová aktivita mikroorganismů, které byly izolovány ze sýra Eidam. Jako producenti tyraminu byly popsány 3 kmeny *Lactobacillus curvatus*, 2 kmeny *Lactobacillus casei* a 1 kmen *Lactobacillus plantarum*. Mezi významné producenty putrescinu byly identifikovány 3 kmeny *Lactobacillus curvatus*.

Na druhou stranu, bakterie rodu *Lactobacillus* mohou být u sýrů švýcarského typu využívány jako zákysové bakterie. Dekarboxylázovou aktivitou 2 kmenů *Lactobacillus parabuchneri* v sýrech švýcarského typu se zabýval Fröhlich-Wyder et al. (2013, s. 122-126). Na konci doby experimentu bylo zjištěno, že vzorky inokulované jedním kmenem *Lactobacillus parabuchneri* obsahovaly v porovnání s ostatními vzorky sýrů významné koncentrace histaminu. Koncentrace histaminu po 90 dnech zrání vzorků dosahovala hodnoty až 300 mg·kg⁻¹. Součástí zákysových mikroorganismů sýrů švýcarského typu bývá i *Streptococcus thermophilus*. Kromě těchto druhů sýrů je součástí i zákysové kultury u extra tvrdých a tvrdých sýrů (např. Parmagiano Reggiano, Cheddar aj.). Řada dřívějších studií prokázala přítomnost genu histidin-dekarboxylázy u řady bakterií *Streptococcus thermophilus*, například u kmene *Streptococcus thermophilus* PRI60 (Gardini et al., 2012, s. 73-75). Jako dekarboxyláza negativní kmeny byly v této studii označeny zákysové bakterie sýrů švýcarského typu *Streptococcus thermophilus* a *Lactobacillus helveticus*. Během 45-ti dnů zrání sýrů inokulovaných sledovaným kmenem *Streptococcus thermophilus* byla zpozorována značná produkce histaminu, kde se jeho koncentrace blížily k hranici 200 mg·kg⁻¹ (Gardini et al., 2012, s. 73-75). Tyramin-dekarboxylázová aktivita byla rovněž potvrzena i u bakterií *Lactobacillus brevis* či *Lactobacillus curvatus*. Ladero et al. (2010, s. 934) uvedli, že tyto kmeny produkovaly tyramin až v koncentracích 600 mg·kg⁻¹ v sýrech typu Cabrales (sýr s plísní v těstě).

Biogenní aminy mohou být produkovány i bakteriemi, které mohou být izolovány z jiných potravin, např. masa, zeleniny, nápojů, aj. Lázaro et al. (2015, s. 15-20) se zabýval souvislostí vzniku biogenních aminů a celkového počtu mezofilních bakterií a bakterií rodu *Enterobacteriaceae* v průběhu skladování různých druhů drůbežního masa. Mezi nejvíce produkovánými biogenními aminy byl tyramin, putrescin a kadaverin. Zatím co u jiných druhů mas byly počty bakterií kolísavé a hodnoty biogenních aminů, u kachního masa byl zpozorován růst celkového počtu mezofilních mikroorganismů, a i bakterií rodu *Enterobacteriaceae* (rapidní nárůst v první polovině skladování, a to 1. – 9. den). Stejný rostoucí trend byl zaznamenán u koncentrace biogenního aminu putrescinu. Již 9. den přesahovaly jeho koncentrace hranici 7 mg·kg⁻¹ (Lázaro et al., 2015, s. 19). Bakterie mléčného kvašení se mohou vyskytovat i ve fermentované zelenině. Studií vzniku tyraminu pomocí BMK

ve fermentované zelenině kimchi provedli Kim a Kim (2014, s. 406). Až 230 izolátů bylo získáno z této fermentované zeleniny, ale pomocí PCR bylo zjištěno, že pouze 14 kmenů s izolovaných 230 dekarboxyluje tyrosin v podmínkách *in vitro*. U těchto 14 kmenů byl nalezen tyr-DC, z toho jen u 3 kmenů bakterií mléčného kvašení (6 kmenů *Lactobacillus brevis*, 4 kmeny *Lactobacillus curvatus*, 2 kmeny *Leuconostoc mesenteroides* a dva kmeny *Staphylococcus hominis*) (Kim a Kim, 2014, s. 407-413).

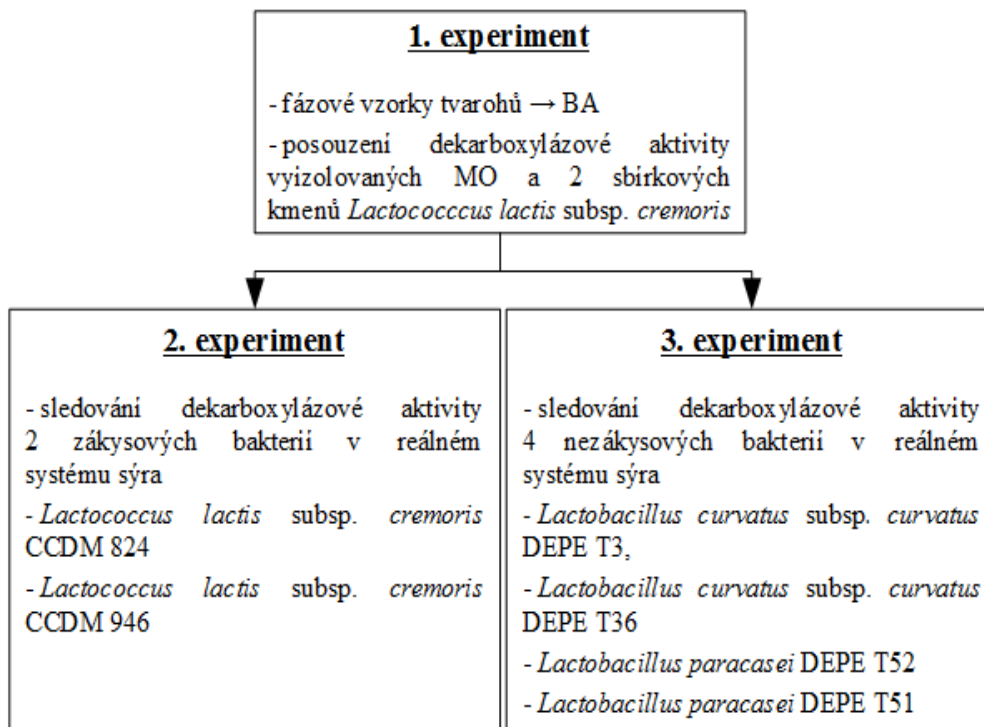
2. CÍLE PRÁCE

Cílem dizertační práce bylo sledování dekarboxylázové aktivity vybraných kmenů mikroorganismů v reálném systému modelových vzorků sýrů. Pomocí HPLC byl sledován vznik a konečné koncentrace osmi biogenních aminů (tryptaminu, fenylethylamin, putrescinu, kadaverinu, histaminu, tyraminu, spermidinu a sperminu) v průběhu zrání přírodních sýrů. Pro dosažení základního cíle dizertační práce bylo vhodné naplnit následující dílčí cíle:

- provedení monitoringu obsahu biogenních aminů u tvarohů v různých fázích výrobního procesu;
- zjištění schopnosti produkce biogenních aminů získanými mikroorganismy, které byly izolovány z přírodních sýrů;
- na základně předchozích dílčích cílů selektovat produkční kmene mikroorganismů, a to jak zákysových, tak nezákysových bakterií mléčného kvašení;
- výroba modelových vzorků přírodních sýrů s přídavkem zákysových bakterií s dekarboxyláza pozitivní aktivitou a sledování vývoje koncentrace biogenních aminů v průběhu zrání sýrů;
- výroba laboratorních vzorků sýrů holandského typu s přídavkem nezákysových bakterií s dekarboxyláza pozitivní aktivitou a sledování vývoje koncentrace biogenních aminů v průběhu zrání sýrů;
- studování vývoje dalších parametrů modelových vzorků sýrů s dekarboxyláza pozitivními kmeny ve srovnání s kontrolními vzorky sýrů (sýry bez přídavku sledovaného dekarboxyláza pozitivního kmene), a to texturní profilová analýza, mikrobiologická analýza, pH a parametry základní sensorické analýzy (sušina, obsah NaCl);
- vyhodnocení výsledků a formulování závěrů.

3. ZVOLENÉ METODY ZPRACOVÁNÍ

Dizertační práce byla rozdělena na 4 experimenty, které byly navrženy pro naplnění dílčích cílů (viz. kapitola 2. Cíle práce). Rozdělení a cíle těchto experimentů znázorňuje Obr. 16.



Obr. 16: Rozdělení dizertační práce, popis jednotlivých experimentů a jejich cílů.

3.1 Popis experimentální části

3.1.1 První experiment

Cílem prvního experimentu bylo sledovat vývoj obsahu biogenních aminů u tvarohů. Vzorky tvarohů byly odebírány v různých fázích technologie výroby a skladování. Následně byla sledována dekarboxylázová aktivita u mikroorganismů, které byly z těchto vzorků izolovány. Samotná izolace a identifikace mikroorganismů však nebyla předmětem této práce. Izolované mikroorganismy byly dodány spolupracujícím pracovištěm. Kromě izolátů byly pro testování dekarboxylázové aktivity použity i 2 sbírkové izoláty, které se běžně vyskytují v přírodních sýrech.

Pro analýzu obsahu biogenních aminů byly získány následující vzorky z různé fáze technologie výroby tvarohů: syrové mléko, pasterované odstředěné mléko (odběr za pasterem), pasterované mléko ve standardizačním tanku, mléko před prokysáním, tvarohovina před krájením, tvarohové zrno, tvaroh jemný ve spotřebitelském obalu (po 1. a 25. dnu skladování). V jednom výrobním dnu byly odebrány vzorky ze dvou paralelních výrob (označení A a B) (Tabulka 2).

Od spolupracujícího pracoviště bylo získáno celkem 79 izolovaných kmenů z tvarohů u kterých byla následně posuzována schopnost produkovat biogenní aminy. Pro posouzení dekarboxylázové aktivity byly rovněž vybrány i 2 sbírkové izoláty (Sbírka mlékařských mikroorganismů Laktoflora, CCDM) (bakterie *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*), které se běžně využívají jako zákysové bakterie při technologii výroby přírodních sýrů. Dekarboxylázová aktivita byla posuzována na základě jejich kultivace v modifikovaných bujonech, které představovaly optimální podmínky pro růst mikroorganismů, a podpořily tak jejich schopnost produkovat biogenní aminy.

Tabulka 2 Kódování vzorků odebrané v průběhu výroby a skladování tvarohů

označení vzorku	charakteristika vzorku
1	syrové mléko
2	pasterované odstředěné mléko – odběr za pasterem
3	pasterované mléko – ve standardizačním tanku
4A	mléko před prokysáním – výroba č. 1
4B	mléko před prokysáním – výroba č. 2
5A	tvarohovina před krájením – výroba č. 1
5B	tvarohovina před krájením – výroba č. 2
6A	tvarohové zrno – výroba č. 1
6B	tvarohové zrno – výroba č. 2
7A	tvaroh jemný ve spotřebitelském obalu – výroba č. 1 po 1 dnu skladování
7B	tvaroh jemný ve spotřebitelském obalu – výroba č. 2 po 1 dnu skladování
8A	tvaroh jemný ve spotřebitelském obalu – výroba č. 1 po 25 dnech skladování
8B	tvaroh jemný ve spotřebitelském obalu – výroba č. 2 po 25 dnech skladování

3.1.2 Druhý experiment

Na základě posouzení dekarboxylázové aktivity sledovaných kmenů předchozího experimentu byly vybrány dva mikroorganismy, které patří mezi zákysové bakterie mléčného kvašení přírodních sýrů, a to *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 824 (sýry s označením B₈₂₄) a CCDM 946 (sýry s označením B₉₄₆) (Obr. 16) (Fox et al., 1998, s. 246; 2000, s. 472; 2004, s. 214). U těchto mikroorganismů byla pozorována schopnost produkce 8 biogenních aminů v reálných podmínkách modelových vzorků sýrů. Obsah biogenních aminů v sýrech s přídatkem sledovaných dekarboxyláza pozitivních kmenů byl srovnáván s koncentrací biogenních aminů v kontrolních vzorcích sýrů (sýry

vyrobené pouze za použití komerční kyselivé kultury, viz 3.2.1 Výroba vzorků k experimentu 2 a 3), tedy sýrů bez přídavku sledovaného dekarboxyláza pozitivního kmene. Kontrolní vzorky sýrů měly označení vzorků A.

3.1.3 Třetí experiment

Cílem třetího experimentu bylo sledování produkce biogenních aminů nezákysových bakterií v reálném systému vzorku sýrů holandského typu, které byly vybrány na základě sledování dekarboxylázové aktivity v prvním experimentu (viz. kapitola 3.1.1) (Obr. 16). Pro naplnění cíle třetího experimentu byly vyrobeny přírodní sýry, které byly jednotlivě inokulovány kmeny *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* DEPE T3 (sýry s označením T₃), *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* DEPE T36 (sýry s označením T₃₆), *Lactobacillus paracasei* DEPE T52 (sýry s označením T₅₂) a *Lactobacillus paracasei* DEPE T51 (sýry s označením T₅₁) (Obr. 16). Kontrolní vzorky sýrů vyrobené pro tento experiment byly označeny jako vzorky C.

3.2 Laboratorní výroba vzorků přírodních sýrů

3.2.1 Výroba vzorků k experimentu 2 a 3

Modelové vzorky sýrů byly vyrobeny při laboratorních podmínkách. Samotný postup výroby sýrů holandského typu se mezi experimenty 2 a 3 nijak významně nelišil. Rozdíl byl pouze ve výběru mikroorganismů. Pro 2. experiment byly zvoleny 2 kmeny kyselivých bakterií *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 824 a CCDM 946. Pro 3. experiment byly použity kmeny nezákysových bakterií *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* DEPE T3, *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* DEPE T36, *Lactobacillus paracasei* DEPE T51 a *Lactobacillus paracasei* DEPE T52.

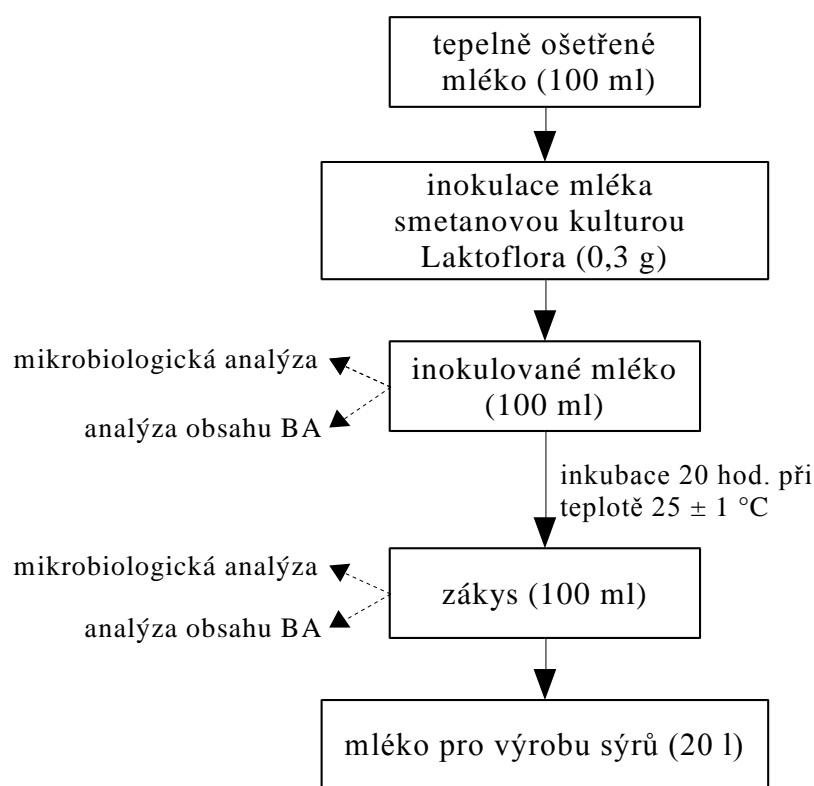
Pro každý mikroorganismus byla vyrobena 1 řada vzorků, která představovala dvě paralelní výroby (šarže), a to kontrolní výrobu A/C (sýry bez přídavku sledovaného kmene, tedy kontrolní vzorky sýrů obsahující pouze smetanovou kulturu Laktoflora, Milcom a.s., Česká republika) a výroba sýrů inokulované sledovaným kmenem (výroby B/T).

Samotná výroba sýrů se skládala ze tří kroků, a to přípravy zákysů (Obr. 17) pro výroby sýrů šarže A a C a Obr. 18 pro výroby sýrů šarže B a T, technologie výroby sýrů holandského typu a 90denního zrání sýrů při teplotě 10 ± 1 °C (Obr. 19 a 20). Použití zákysu je nedílnou součástí výrobního procesu sýrů, neboť tyto bakterie se do značné míry podílí na řadě biochemických procesů v průběhu zrání. Díky těmto biochemickým procesům v průběhu zrání dochází k tvorbě řady sensoricky aktivních látek udílejících charakteristickou chuť a vůni, která je typická pro daný druh sýra (viz. 1.2 Zrání přírodních sýrů) (Calzada et al., 2013, s. 4818; El-Zahar, El-Zager a Ramadan, 2014, s. 75; Fox et al., 2000, s. 243; 2004,

s. 475; Roginski, Fuquay a McSweeney, 2002, s. 842; Schirone et al., 2013, s. 138).

Příprava provozního zákysu

Pro přípravu provozního zákysu (Obr. 17) pro kontrolní výrobu (skupina sýrů A a C, tedy sýry bez přídavku sledovaného kmene) byla použita komerční mezofilní smetanová kultura (Laktoflora, Milcom, a.s., Česká republika), která byla složena z mikrobiálních druhů *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* a *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* var. *diacetylactis*. Mléko pro přípravu všech provozních zákysů bylo nejprve tepelně ošetřeno (30 minut při teplotě 100 ± 1 °C) a následně zchlazeno na teplotu 25 ± 1 °C. 100 ml tepelně ošetřeného mléka bylo smícháno s 0,3 g lyofilizované smetanové kultury. Takto připravená směs byla inkubována při teplotě 25 ± 1 °C po dobu 20 hodin.



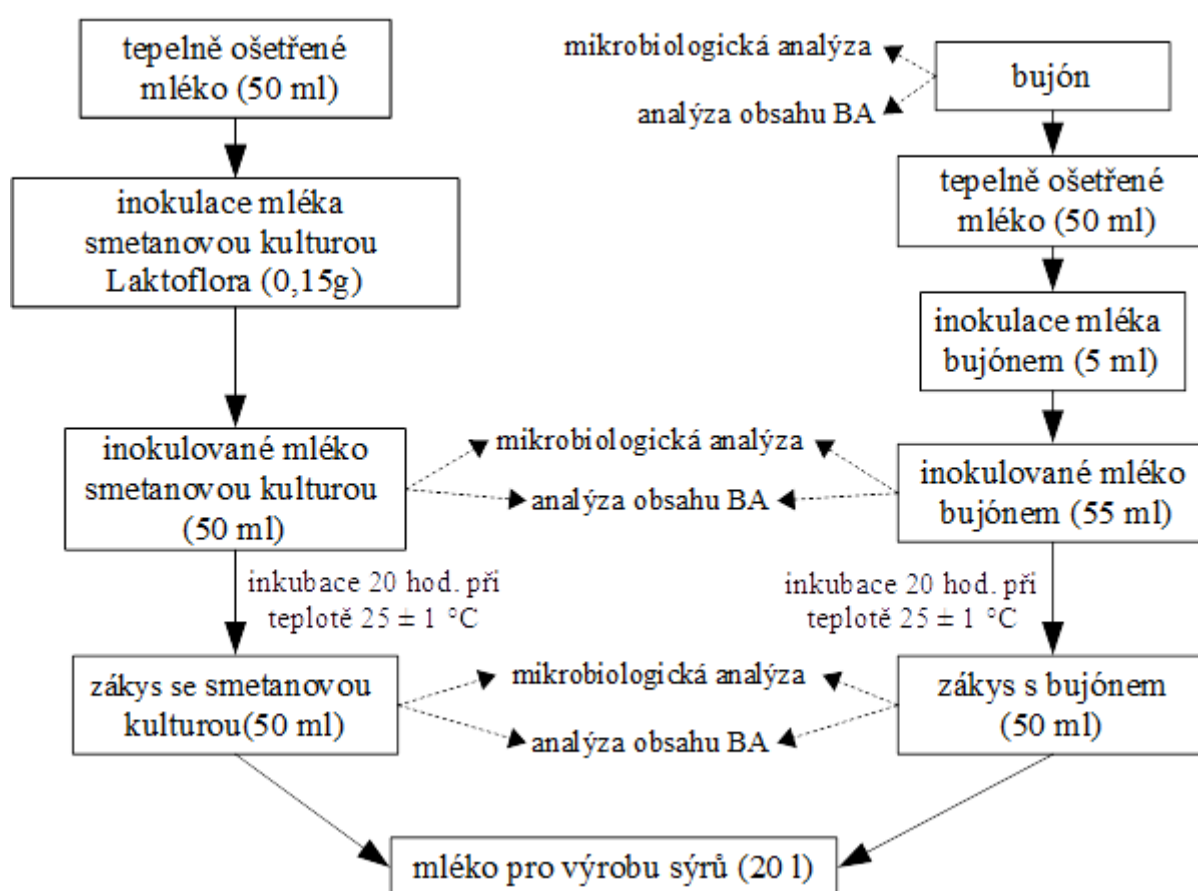
Obr. 17: Postup přípravy provozního zákysu pro kontrolní výroby vzorků A a C bez přídavku sledovaného kmene.

Pro výrobu modelových sýrů s přídavkem dekarboxyláza pozitivního kmene (výroby B a T) byly použity dva typy zákysů (Obr. 18) – 50 ml základního provozního zákysu (obsahující výše popsanou mezofilní komerční smetanovou kulturu) a 50 ml zákysu obsahující vybraný dekarboxyláza pozitivní kmen. Základní zákys byl připraven obdobným způsobem jako zákys pro kontrolní výrobu (smíchání 50 ml sterilovaného mléka s 0,15 g mezofilní smetanové kultury Laktoflora, Milcom, a.s., Česká republika). Zákys s přídavkem vybraného dekarboxyláza-pozitivního kmene byl připraven smícháním 50 ml tepelně

ošetřeného mléka a 5 ml inokulovaného bujónu (dekarboxylační médium inokulované sledovaným kmenem). Takto připravené zákysy byly inkubovány při teplotě 25 ± 1 °C po dobu 20 hodin.

Bujóny obsahující vybrané mikroorganismy byly připraveny podle Buňková et al. (2011, 113-115). 5 ml kultivačního média M17 (Merck, USA) s přidavkem 0,2 % (w/v) prekurzorů biogenních aminů (histidin, tyrozin, lyzin, ornitin a arginin) (Sigma-Aldrich, USA) bylo zaočkováno 25 μ l kultury ($10^7 - 10^8$ KTJ·ml⁻¹), a inkubováno při teplotě 30 ± 1 °C 20 hodin.

Tepelně ošetřené mléko, bujón, mléko inokulované sledovaným kmenem či zákysovou kulturou před kultivací a zákysy po kultivaci, jak znázorňují Obr. 17 a 18, byly podrobeny analýze obsahu biogenních aminů a mikrobiologické analýze (viz. 3.3 Použití metody analýz).

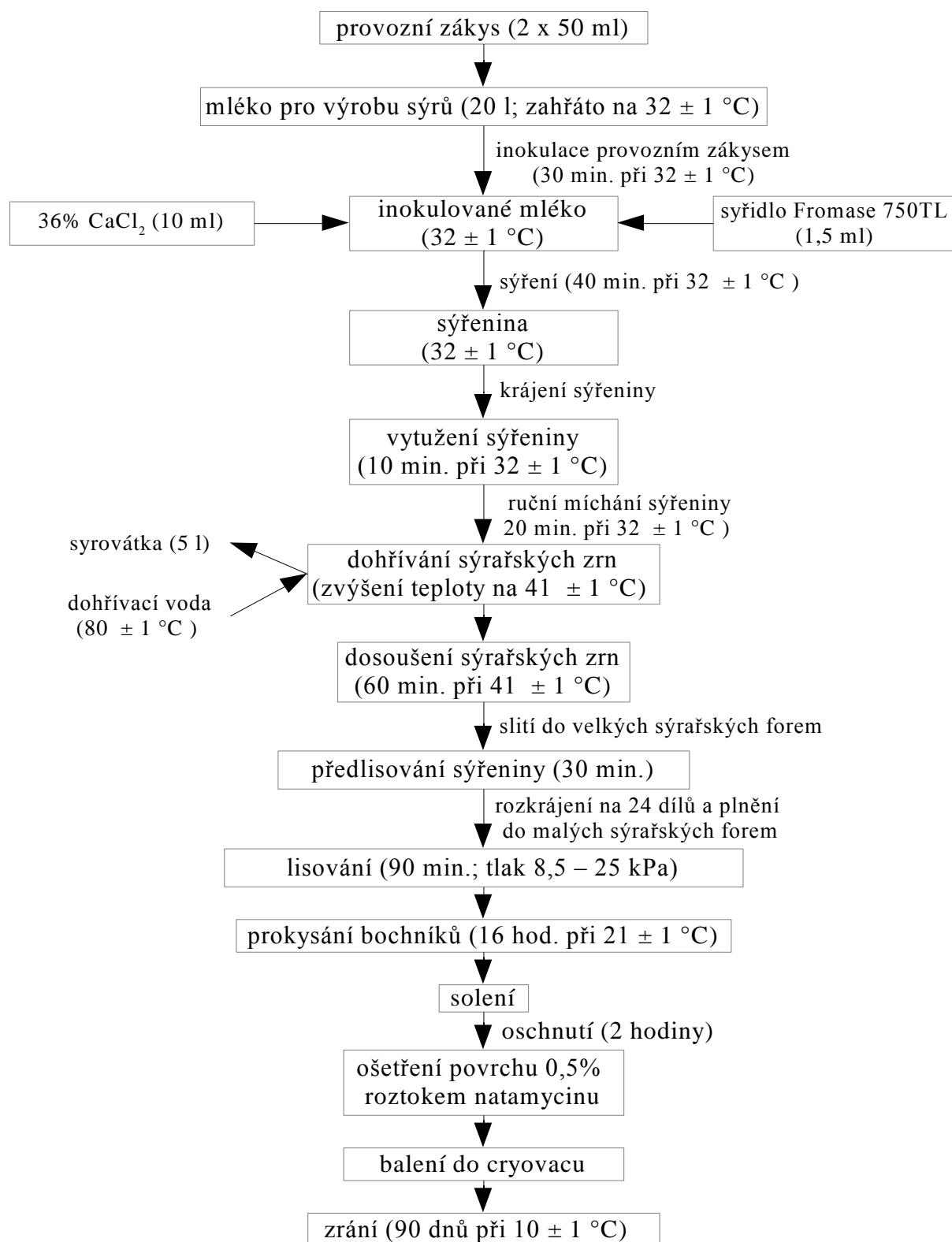


Obr. 18: Postup přípravy provozních zákysů pro výrobu sýrů označení B a T – zákys s běžnou komerční kulturou a zákys obsahující sledovaný kmen.

Výroba sýrů

Při laboratorních podmínkách byly vyráběny sýry holandského typu s přidavkem vybraného dekarboxyláza-pozitivního kmene (výroby B a T). Ke každé šarži obsahující sledovaný kmen byla vyrobena kontrolní šarže sýrů (výroba A a C, obsahující pouze mezofilní smetanovou kulturu Laktoflora, Milcom, a.s., Česká republika). Technologický proces výroby sýrů u experimentu 2 a 3 se nijak nelišil. Rovněž se mezi sebou nijak nelišila samotná technologie

výroby vzorků pro kontrolní výrobu A a C (výroba za použití pouze komerční smetanové kultury Laktoflora, Milcom a.s., Česká republika) a vzorků s přísadkou sledovaného kmene s pozitivní dekarboxylázovou aktivitou (výroby B a T).

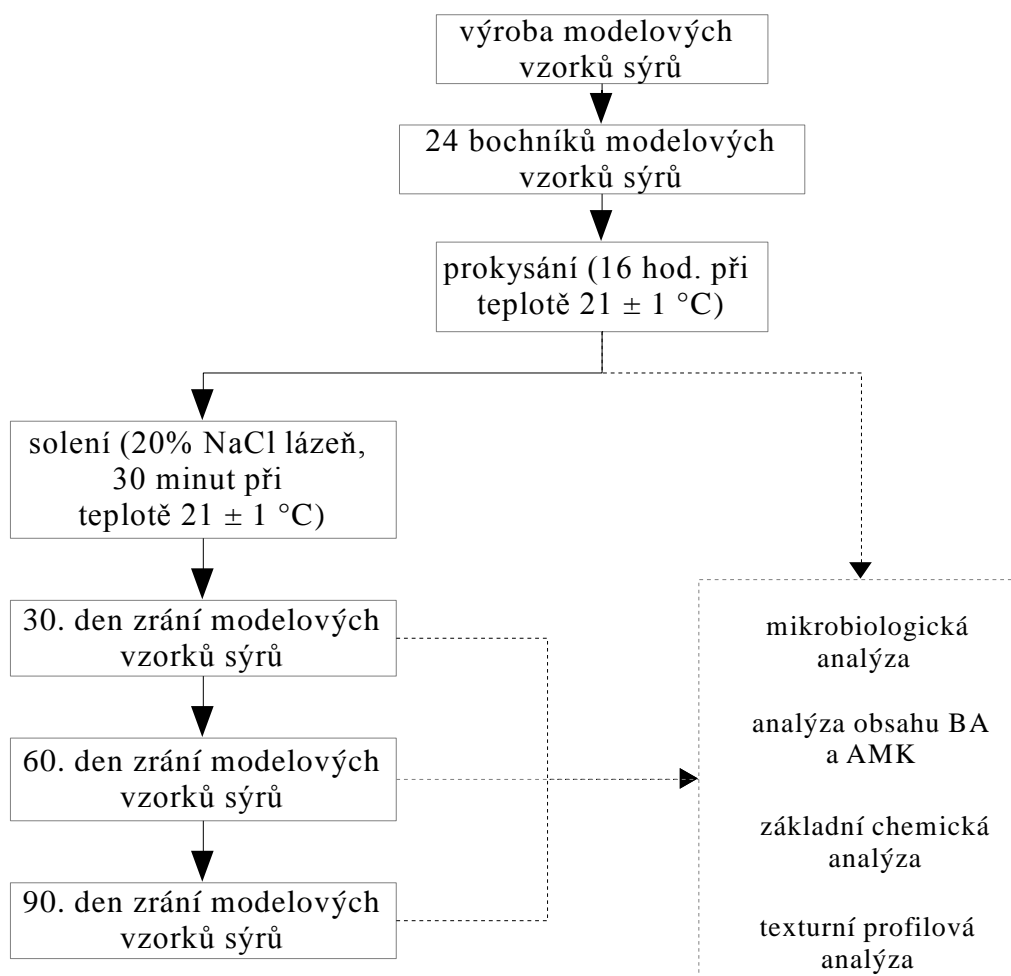


Obr. 19: Technologie výroby modelových vzorků sýrů.

Při výrobě jedné šarže bylo použito 20 l kravského mléka o tučnosti 2,5 %, přičemž bylo vyrobeno 24 bloků sýrů o průměrné hmotnosti 90 ± 3 g (Obr. 19). Mléko bylo před výrobou ošetřeno pasterací ($75\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 30 s) pomocí FT75 pastér (Armfield, Ringwood, Velká Británie) a následně zchlazeno na teplotu $32 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Výroba sýrů probíhala ve výrobním tanku MSKD-1 (Driml, Brno, Česká republika). Pasterované a zchladené mléko o teplotě $32 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ bylo inokulováno příslušným provozním zákysem a inkubováno po dobu 30 minut. Kontrolní výroba sýrů (výroby A a C), byla inokulována provozním zákysem připraveného za použití komerční zákysové kultury Laktoflora (Milcom, a.s., Česká republika), výroby B a T byla inokulována jak zákysem připraveného z komerční mezofilní kultury Laktoflora (Milcom, a.s., Česká republika) tak ze zákyse, který byl inokulován bujónem s pomnoženým sledovaným kmenem. Po uplynutí doby inokulace bylo přidáno 10 ml 36% (w/w) CaCl_2 (Milcom, a.s., Česká Republika) a 1,5 ml syřidla Fromase 750TL (DSM Food Specialities, Francie). Po uplynutí 40 minut sýření při teplotě $32 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ byla vzniklá sýřenina rozkrájena a nechána 10 minut v klidu. Poté byla sýřenina míchána 20 minut pro vytužení zrna. Následně nastal proces dohřívání, a to tak, že bylo odebráno 5 l syrovátky, která byla nahrazena stejným objemem dohřívací vody o teplotě $80 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$. Cílem přidavku dohřívací vody bylo zvýšení teploty sýřeniny na $41 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$. Následovalo dosoušení sýrařských zrn, které trvalo 60 minut při teplotě $41 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Po ukončení procesu dosoušení byla sýrařská zrna slita do dvou velkých forem ($38,0 \times 12,5 \times 7,5$ cm), kde byla ponechána 30 minut k předlisování sýřeniny. Po uplynutí doby předlisování byla tato sýřenina rozdělena do 24 sýrařských forem (každá velká forma pro předlisování byla rozdělena na 12 ks) (o průměru 7,0 cm a výšce 4,0 cm) a následně lisována po dobu 90 minut za použití počátečního tlaku $8,5 \pm 2$ kPa. Po 30 minutách byl tlak navýšen na 17 ± 2 kPa a po dalších 30 minutách lisování vzrostl tlak na $25,5 \pm 2$ kPa. Sýry byly po vyjmutí ze sýrařských forem ponechány k prokysání v kysacích boxech při teplotě $21 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 16 hodin. Po uplynutí doby prokysání byly sýry soleny ponořením do 20% (w/w) solné lázně na dobu 30 minut při laboratorní teplotě $21 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Obr. 20). Po 2 hodinách byl povrch sýrů ošetřen antimykotikem ponořením do 0,5% (w/w) roztoku natamycinu (Delvocid, DSM Food Specialities, Francie) a následně takto ošetřené a okapané sýry byly baleny do polopropustných zracích fólií cryovac pomocí vakuové baličky Mini Jumbo (Henkelman, Nizozemsko). Připravené bochníky sýrů byly ponořeny do horké vodní lázně $90 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 5 s a tyto bochníky sýrů byly uloženy do zracích komor po dobu 90 dnů při teplotě $10 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$.



Obr. 20: Způsob solení a zrání modelových vzorků sýrů holandského typu pro 2. a 3. experiment.

3.3 Použité metody analýz

3.3.1 Posouzení dekarboxylázové aktivity

Decarboxylázová aktivita jednotlivých mikroorganismů byla posuzována na základě kultivace jednotlivých mikroorganismů v bujonech. Bujóny představují optimální podmínky pro růst a vývoj bakterií.

Jednotlivé bujóny byly obohaceny o prekurzory jednotlivých sledovaných biogenních aminů (histidin, ornitin, arginin, lyzin, tyrozin a fenylalanin) o koncentraci $2 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ každého z nich za účelem podpory dekarboxylázové činnosti izolovaných kmenů.

Kultivace mikroorganismů probíhala při teplotě 30 °C po dobu 48 hodin, přičemž kultivace každého sledovaného mikroorganismu byla provedena šestkrát. Bujón po kultivaci byl centrifugován (4000 g ; $22 \pm 1 \text{ °C}$; 20 minut). Vzniklý supernatant byl zředěn $1,2 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1} \text{ HClO}_4$ (Merck, USA) v poměru 1:1. Tato směs byla následně derivatizována podle postupu popsáno níže (3.3.6 Stanovení

obsahu biogenních aminů). Jako pozitivní kontrola (kmeny produkující biogenní aminy) byly vybrány mikroorganismy *Enterococcus faecalis* CCM 2665 a *Escherichia coli* CCM 3954. Jako negativní kontrola (bez schopnosti produkovat biogenní aminy) byly zvoleny mikroorganismy *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* CCM 3953 a *Pseudomonas fragi* MD 48 (Buňková et al., 2009, s. 535; Pleva et al. 2012, s. 439).

3.3.2 Analýza základních parametrů sýrů

Analýza základních parametrů sýrů byla zaměřena na stanovení obsahu sušiny, měření hodnot pH a stanovení obsahu NaCl v analyzovaných vzorcích sýrů. Sušina byla stanovována sušením při teplotě 102 ± 2 °C dle normy EN ISO 5534:2004. Hodnoty pH byly měřeny pomocí vpichového pH metru (Spear – Eutech, Nizozemsko). Obsah NaCl byl stanovován podle Mohra (Indra a Mizera, 1992, s. 189) argentometrickou titrací, kde jako činidlo byl použit dusičnan draselný a indikátorem byl dichroman draselný. Analýza základních parametrů byla vždy provedena u dvou bloků sýrů, u každého z nich třikrát (n=6). Po provedení analýzy základních parametrů byly vzorky sýrů následně lyofilizovány pomocí ALPHA 1 – 4 LCS (Christ, Německo) při teplotě - 40 °C a tlaku ~ 12 Pa a poté skladovány při teplotě - 70 °C. Takto zlyofilizované vzorky byly používány pro extrakci biogenních aminů a volných aminokyselin, viz kapitola 3.3.5. a 3.3.6.)

3.3.3 Texturní profilová analýza

Texturní profilová analýza byla měřena pomocí analyzátoru TA.XT Plus (Stable Micro Systems, VB), kde ze středu analyzovaného bloku sýra byl vykrojen válcový vzorek o průměru 40 mm a výšce 15 mm. Vzorek byl stlačen o 20 % původní výšky konstantní rychlostí $1 \text{ mm}\cdot\text{s}^{-1}$ desky o průměru 50 mm. Sledovanými parametry byla tvrdost, kohezivnost a relativní lepivost. Tvrdost (N) je definována jako maximální síla naměřená během stlačení. Texturní profilová analýza byla provedena u dvou bloků vzorků, kde každý vzorek byl měřen jedenkrát (n=6) (Buňka, Pachlová a Nenutilová, 2013a, s. 1018).

3.3.4 Mikrobiologická analýza

Mikrobiologická analýza byla zaměřena na stanovení počtů 5 skupin mikroorganismů – celkový počet mikroorganismů (tj. mezofilní aerobní a fakultativně anaerobní mikroorganismy), mléčných koků (zejména laktokoků, streptokoků a leukonostoků), laktobacilů, enterobakterií a enterokoků. Přehled kultivačních médií a podmínek kultivace pro jednotlivé skupiny mikroorganismů je uveden v Tabulce 3. Mikrobiologická analýza byla provedena podle Buňková et al. (2010). Kultivační média byla připravena dle návodu výrobce a následně autoklávována (kromě Slanetz-Bartley agaru) v autoklávu 135s Compact (Varioklav, Německo) při teplotě 121,1 °C po dobu 20 minut. SB agar byl připraven vařením ve vodní lázni při teplotě 100 ± 1 °C do rozpuštění. Takto

připravená média byla rozlita do Petriho misek, kde každá miska obsahovala 15 – 20 ml kultivačního média.

Tabulka 3 Přehled doby kultivace médií pro jednotlivé skupiny mikroorganismů (Buňková et al., 2009, s. 535; 2010, s. 881; Pleva et al. 2012, s. 439)

skupina mikroorganismů	půda	doba kultivace [hod]	teplota [°C]
celkový počet mikroorganismů	PCA – Plate Count Agar	24	37
mléčné koky (laktokoky, streptokoky a leukonostoky)	M17 agar	48	37
laktobacily	MRS - Mann, Rogosa & Sharpe agar	48	30
enterokoky	SB agar - Slanetz-Bartley agar	24	37
enterobakterie	Endo agar	48	37

Z každého bloku sýra bylo sterilně odebráno 5 g, ke kterému bylo přidáno 45 ml sterilního fyziologického roztoku. Následně byla směs homogenizována po dobu 3 minut. Ze vzniklé homogenní směsi byla připravena koncentrační řada pomocí desítkového ředění od 10^{-1} až do 10^{-7} . Mikrobiologická analýza byla provedena u vzorků zákysů i u vzorků sýrů v jednom opakování (Buňková et al., 2009, s. 536; 2010, s. 883).

3.3.5 Stanovení obsahu volných aminokyselin

Chromatografická analýza byla zaměřena na stanovení obsahu 30 volných aminokyselin a jejich derivátů (threonin, serin, asparagová kyselina, asparagin, glutamová kyselina, glutamin, prolin, glycin, alanin, citrulin, valin, methionin, cystein, cystathionin, izoleucin, leucin, tyrozin, fenylalanin, β -alanin, α -aminomáselná kyselina, β -aminomáselná kyselina, γ -aminomáselná kyselina, etanolamin, ornitin, lyzin, histidin, 1-methyl-histidin, 3-methyl-histidin, arginin, aminoadipová kyselina).

Vzorky přírodních sýrů byly nejprve zlyofilizovány pomocí ALPHA 1 – 4 LCS (Christ, Německo) při teplotě -40 °C a tlaku ~ 12 Pa (viz. 3.3.2. Analýza základních parametrů sýrů). Z připravených lyofilizátů byla provedena extrakce volných aminokyselin, přičemž extrakce byla provedena pomocí lithného pufru. Postup extrakce volných aminokyselin byl zvolen podle Pachlová et al. (2011, s. 102). Lithný pufr byl složen z kyseliny chlorovodíkové a citronanu lithného, přičemž výsledné pH lithného pufru bylo $2,2 \pm 0,2$. Připravené extrakty byly odstředěny při teplotě 4 ± 1 °C po dobu 30 minut při $15\,000\text{ ot}\cdot\text{min}^{-1}$ a filtrovány pomocí 0,45 μm nylonového filtru. Získaný filtrát byl analyzován dle

Buňková et al. (2009, s. 534) pomocí iontově-výměnné kapalinové chromatografie použitím Automatického analyzátoru aminokyselin AAA 400 (Ingos, Česká republika) s kolonou 150 x 3,7 mm a iontoměničem Polymer AAA. Teplotní a eluční program a složení jednotlivých pufrů je uvedeno v Příloze B a C. Extrakce volných aminokyselin byla provedena ze dvou bloků sýrů, a následně každý extrakt byl podroben chromatografické analýze dvakrát.

3.3.6 Stanovení obsahu biogenních aminů

Pro detekci obsahu BA tekutých vzorků odebraných na počátku výroby sýrů (mléko, dekarboxylační médium) bylo nutné vzorky zředit $1,2 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1} \text{ HClO}_4$ (Merck, USA) v poměru 1:1. Takto připravené vzorky byly dále derivatizovány (viz. níže) dle postupu Dadákové, Křížka a Pelikánové (2009, s. 366). Pro detekci obsahu BA v přírodních sýrech byly použity jejich lyofilizáty (viz 3.3.2. Analýza základních parametrů sýrů a 3.3.5 Stanovení obsahu volných aminokyselin). Před samotnou derivatizací musely být BA z lyofilizátů nejprve vyextrahovány. Byla provedena trojnásobná reextrakce biogenních aminů podle Pachlová et al. (2011, s. 102) a Buňková et al. (2009, s. 534). K 1 g lyofilizovaného vzorku bylo přidáno 10 ml $0,6 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1} \text{ HClO}_4$ (Merck, USA), homogenizováno po dobu 30 minut při pokojové teplotě a odstředěno 10 minut při $6000 \text{ ot}\cdot\text{min}^{-1}$. Supernatant byl slit do 25 ml odměrné baňky a vzniklý sediment byl dvakrát reextrahován 7 ml $0,6 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1} \text{ HClO}_4$ dle výše uvedeného postupu. Supernatanty byly slity do jedné odměrné baňky, která byla poté doplněna po rysku. Takto připravené extrakty byly zfiltrány pomocí $0,45 \mu\text{m}$ nylonového filtru a následně zderivatizovány (Buňková et al., 2009, s. 534; Pachlová et al., 2011, s. 102).

Chromatografická analýza byla zaměřena na detekci 8 biogenních aminů (tryptamin, fenylethylamin, putrescin, kadaverin, histamin, tyramin, spermidin a spermin). Zředěné tekuté vzorky či extrakty sýrů byly následně zderivatizovány dansylchloridem (Sigma-Aldrich, USA) podle Dadákové, Křížka a Pelikánové (2009, s. 366). K 1 ml extraktu (případně 1 ml zředěného tekutého vzorku) bylo přidáno $100 \mu\text{l}$ 1,7-diaminoheptanu (Sigma-Aldrich, USA) o koncentraci $500 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$, který sloužil jako vnitřní standard. Následně bylo přidáno $1,5 \text{ ml}$ uhličitanového pufru o pH 11,0 a 2 ml dansylchloridu ($5 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ acetonu; Sigma-Aldrich, USA). Takto připravená směs byla homogenizována po dobu 20 hodin ve tmě při laboratorní teplotě. Po uplynutí této doby bylo přidáno $100 \mu\text{l}$ prolinu pro zastavení reakce a dále homogenizováno po dobu 1 hodiny při laboratorní teplotě $21 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$. Následně byly přidány 3 ml heptanu a směs byla 3 minuty míchána. Po promíchání byl odpipetován 1 ml heptanové vrstvy do vialky. Heptan byl poté odpařen při $60 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ pod proudem dusíku. Takto získaný odparek byl rozpuštěn přídatkem $1,5 \text{ ml}$ acetonitrilu. Do analýzy obsahu biogenních aminů byly takto získané vzorky skladovány při $-18 \text{ }^\circ\text{C}$ a před analýzou byly přefiltrovány pomocí $0,22 \mu\text{m}$ stříkačkového nylonového filtru.

Obsah biogenních aminů byl stanoven pomocí vysoce účinné kapalinové chromatografie (Agilent Technologies, USA) za použití kolony Agilent Eclipse Plus C18 RRHD (Agilent Technologies, USA) o rozměrech 3,0 x 50,0 mm x 1,8 μm, spektrofotometrické detekci o vlnové délce 254 nm a teplotě kolony 30 ± 1 °C. Separace biogenních aminů byla provedena podle Smělá et al. (2004, s. 433-434). Průběh elučního programu pro stanovení obsahu 8 biogenních aminů v závislosti na čase je uveden v Příloze D, přičemž celková doba analýzy jednoho vzorku trvala 15,5 minuty. Jako mobilní fáze byl použit 10% roztok acetonitrilu a 100% acetonitril. Tekuté vzorky mléka a bujónů byly derivatizovány dvakrát a každá derivatizovaná směs byla dvakrát nanesena na kolonu. U vzorků sýrů bylo provedeno 12 stanovení (3 extrakce x 2 derivatizace x 2 nanesení na kolonu). V případě mikroorganismů bylo provedeno 24 stanovení (6 kultivací x 2 derivatizace x 2 nanesení na kolonu).

3.3.7 Statistické zpracování dat

Pro statistické vyhodnocení chemických, mikrobiologických, texturních profilových a chromatografických analýz se použil Kruskal-Wallis a Wilcoxonův test (Agresti, 1984, s. 212; Obtulovič, 2002, s. 47). Pro získaná data byl použit statistický software Unistat 6.5 (na hladině významnosti $\alpha=0,05$) (Unistat Ltd., Velká Británie)

4. HLAVNÍ VÝSLEDKY PRÁCE

4.1 Výsledky 1. experimentu

V rámci 1. experimentu byly sledovány vývoje obsahu biogenních aminů u přírodních sýrů, které vznikají kyselým srážením, tvarohů. Vývoj koncentrací biogenních aminů byl sledován v různých fázích technologie výroby a skladování. Izolované kmeny z fázových odběrů 1. a 2. výrobního dne byly podrobeny identifikaci (pomocí hmotnostní spektrofotometrické detekci MALDI-TOF), nicméně tato identifikace nebyla součástí této práce.

Současně byla sledována i dekarboxylázová aktivita celkem 79 izolovaných mikroorganismů (izolace kmenů z tvarohu ale nebylo předmětem tohoto experimentu, a byly obdrženy od spolupracujícího pracoviště).

Výsledky stanovení obsahu biogenních aminů

Hodnoty jednotlivých obsahů biogenních aminů v mléce, tvarohovině, tvarohovém zrnu a ve finálním tvarohu z obou výrobních dnů jsou uvedeny v Tabulce 4. V průběhu technologie výroby a 25denního zrání vzorků tvarohů nebyla analyzována přítomnost 5 biogenních aminů z 8 sledovaných. Jednalo se o histamin, fenylethylamin, tryptamin, kadaverin ani spermin. Velmi nízké koncentrace biogenního aminu byly detekovány v případě spermidinu. Jeho hodnoty nepřekročily v žádném z analyzovaných vzorků hodnotu $1,0 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ v případě tekutých vzorků, v případě pevných vzorků sýrů $1,0 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$. V pasterovaném mléce byla jeho hodnota na počátku výrobního procesu $0,11 \pm 0,02 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$. Na konci doby zrání tvarohů ve spotřebitelských obalech se hodnoty pohybovaly v rozmezí $0,36 - 0,39 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$. Současně lze konstatovat, že nebyly zaznamenány žádné významné statistické rozdíly mezi vzorky výroby č. 1 a výroby č. 2. Po celou dobu výrobního procesu koncentrace spermidinu měly mírný rostoucí trend.

Pasterované mléko obsahovalo tyramin v množství $0,15 \pm 0,01 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$. Putrescin byl v pasterovaném mléce detekován v poněkud vyšší koncentraci, a to $0,42 \pm 0,01 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$. Po celou dobu experimentu docházelo k pozvolnému nárůstu koncentrací obou biogenních aminů a ačkoli na počátku byl tyramin detekován v menším množství, na konci skladování tvarohů ve spotřebitelských obalech byly hodnoty tyraminu více než čtyřnásobně vyšší ($7,60 - 8,25 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) než koncentrace putrescinu ($1,92 - 2,11 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$).

Takto nízké hodnoty biogenních aminů bylo možné očekávat, neboť mohou být důsledkem řady faktorů, které mohly snížit dekarboxylační aktivitu přítomných mikroorganismů (1.1.1 Vznik biogenních aminů) (Buňková et al., 2010, s. 881; Dadáková, Křížek a Pelikánová, 2009, s. 366; Mayer, Fiechter a Fischer, 2010, s. 7955; Samková, Dádáková a Pelikánová, 20013, s. 310). Faktory ovlivňující vznik biogenních aminů mohou být děleny na přímé a nepřímé faktory mající vliv na vznik biogenních aminů. Mezi takové faktory patří nízká teplota skladování

vzorků (4 – 8 °C), která se řadí mezi nepřímé faktory ovlivňující vznik biogenních aminů. Někteří autoři uvádí, že optimální teplotou růstu pro značnou část dekarboxyláza pozitivních bakterií je 10 – 45 °C v závislosti na konkrétním mikrobiálním kmenu. Současně nízké pH typické pro tvarohy mohlo do jisté míry ovlivnit produkci biogenních aminů (Komprda, 2004, s. 54; Santos, 1996, s. 214). Pachlová et al. (2012, s. 2-5) se ve své studii zabývala sledováním vlivu teploty během zrání sýrů na produkci biogenních aminů. Z výsledků vyplynulo, že s nižší teplotou zrání sýrů je i snížena produkce biogenních aminů ve srovnání koncentrací biogenních aminů zrajících při vyšší teplotě. To může být důsledkem toho, že nižší zrací teplota snižuje aktivitu přítomných dekarboxyláza pozitivních kmenů (Pachlová et al., 2012, s. 5; Naila et al., 2010, s. 142). Dalším faktorem byla i v porovnání s jinými druhy sýrů i krátká doba skladování tvarohů (25 dnů). Během doby skladování mohla proběhnout pouze částečná proteolýza během které vznikají volné aminokyseliny, prekurzory vzniku biogenních aminů. Vznik volných aminokyselin spolu s dalšími patří mezi přímé faktory vzniku biogenních aminů (1.1.1 Vznik biogenních aminů) (Buňková et al., 2009, s. 534; 2011, s. 113; Fiechter, Sivec a Mayer, 2013, s. 191; Loizzo et al., 2013, s. 39; Pachlová et al., 2016, s. 2; Roginski, Fuquay a McSweeney, 2002, s. 841).

Tabulka 4 Hodnoty jednotlivých biogenních aminů ve fázových vzorcích v průběhu výroby a skladování vzorků tvarohů

Kód vzorku*	obsah biogenních aminů [mg·l ⁻¹ nebo mg·kg ⁻¹]									
	histamin	fenylethylami	tyramin	tryptamin	putrescin	kadaverin	spermidin	spermin		
1	ND	ND	0,15 ± 0,01	ND	0,42 ± 0,01	ND	0,11 ± 0,01	ND		
2	ND	ND	0,16 ± 0,01	ND	0,57 ± 0,02	ND	0,16 ± 0,01	ND		
3	ND	ND	0,17 ± 0,01	ND	0,67 ± 0,03	ND	0,17 ± 0,01	ND		
4A	ND	ND	0,27 ± 0,01	ND	0,85 ± 0,01	ND	0,17 ± 0,01	ND		
4B	ND	ND	0,30 ± 0,01	ND	0,85 ± 0,02	ND	0,17 ± 0,02	ND		
5A	ND	ND	0,56 ± 0,04	ND	1,39 ± 0,07	ND	0,22 ± 0,01	ND		
5B	ND	ND	0,65 ± 0,08	ND	1,31 ± 0,04	ND	0,24 ± 0,01	ND		
6A	ND	ND	1,63 ± 0,08	ND	1,52 ± 0,11	ND	0,25 ± 0,01	ND		
6B	ND	ND	1,66 ± 0,07	ND	1,64 ± 0,05	ND	0,28 ± 0,01	ND		
7A	ND	ND	2,56 ± 0,12	ND	1,36 ± 0,05	ND	0,32 ± 0,01	ND		
7B	ND	ND	2,33 ± 0,11	ND	1,42 ± 0,10	ND	0,34 ± 0,01	ND		
8A	ND	ND	7,60 ± 0,27	ND	1,92 ± 0,10	ND	0,36 ± 0,01	ND		
8B	ND	ND	8,25 ± 0,08	ND	2,11 ± 0,15	ND	0,39 ± 0,01	ND		

* kódování vzorků je uvedeno v Tabulce 2

ND – nedetekován během stanovení koncentrací biogenních aminů

Posouzení dekarboxylázové aktivity

Z jednotlivých fází výroby a skladování tvarohu (mléka, tvarohoviny, tvarohového zrna a finálního produktu) bylo izolováno 79 kmenů. Tabulka 5 obsahuje výsledky produkce biogenních aminů těchto kmenů. Obecně lze konstatovat, že produkce biogenního aminu histaminu a spermidinu u sledovaných izolátů byla zaznamenána velmi zřídka. Téměř u 80 % izolovaných kmenů sledovaných v tomto experimentu nebyla prokázána žádná histamin-pozitivní dekarboxylázová aktivita, neboť byly detekovány nulové koncentrace histaminu. Zbýlých 20 % kmenů vykazovalo velmi nízkou histamin-pozitivní dekarboxylázovou aktivitu. Tento fakt byl usouzen z výsledků stanovení obsahu biogenního aminu histaminu, protože jeho koncentrace nepřekročily hodnotu $10 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$. Pouze jeden ze všech sledovaných kmenů (5.B.2, identifikován jako *Leuconostoc mesenteroides*) produkoval histamin ve významném množství. Tento kmen byl izolován z tvarohoviny před krájením u výroby č. 2. Detekovaná koncentrace histaminu u tohoto kmene byla vyšší než $100 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$. Dle některých autorů jsou tyto koncentrace, které mohou vést k silným otravám a může tak být vážně ohroženo zdraví konzumenta (Anonym, 2011, s. 17; Kalač a Křížek, 2005, s. 28; Önal, 2007, s. 1476; Parente et al., 2001, s. 883). Obdobné hodnoty histaminu uvedl ve své práci i Nout (1994, s. 295), který jako maximální přípustnou koncentraci v potravinách uvedl hodnotu $50 - 100 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$. Nařízení komise (ES) č. 2073/2005 ze dne 15. listopadu 2005 o mikrobiologických kritériích pro potraviny stanovuje hodnotu obsahu histaminu v produktech rybolovu z druhů ryb spojovaných s vysokým obsahem histidinu (zejména druhy ryb čeledi *Scombridae*, *Clupeidae*, *Engraulidae*, *Coryfenidae*, *Pomatomidae*, *Scombresosidae*). U odebraných vzorků nesmí obsah histaminu překročit hranici $100 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$. Toto množství může být u dvou z devíti odebraných vzorků překročeno o 100 %, tedy obsah histaminu u dvou z devíti vzorků jedné šarže může být $200 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$.

Produkce spermidinu nebyla zaznamenána u žádného z celkových 79 sledovaných kmenů. Tryptamin-pozitivní dekarboxylázová aktivita byla ve srovnání s předchozími výsledky větší. Přibližně 25 % všech izolovaných kmenů bylo schopno dekarboxylovat aminokyseliny za vzniku tryptaminu v koncentracích do $10 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$, dalších téměř 30 % produkovalo tryptamin mnohem výrazněji, protože byly detekovány koncentrace v rozmezí $10 - 50 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$. Zbýlých 37 kmenů bylo vyhodnoceno jako tryptamin-negativní kmeny, neboť byly detekovány nulové koncentrace tryptaminu. Při posuzování dekarboxylázové aktivity pro syntézu sperminu bylo zjištěno, že všechny sledované kmeny ať už ve větší či menší míře vykazovaly pozitivní dekarboxylázovou aktivitu pro vznik sperminu. K největší produkci docházelo u 11 % ze všech 79 sledovaných kmenů (koncentrace sperminu se pohybovaly v rozmezí $50 - 100 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$). Přibližně 50 % kmenů produkovaly spermin v detekovaných koncentracích $10 - 50 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$, což lze tyto kmeny považovat za kmeny se středně spermin-pozitivní dekarboxylázovou aktivitou. Zbýlých

39 % kmenů produkovalo spermin ve velmi nízkých koncentracích, tedy do $10 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$.

Poměrně značně vysoké byly detekovány koncentrace putrescinu a kadaverinu. U 41 % (v případě putrescinu) a 58 % kmenů (u koncentrací kadaverinu) nebyla zaznamenána žádná produkce putrescinu a kadaverinu. U 1 izolátu byla detekována poměrně velká produkce kadaverinu, přičemž byla překročena několikanásobně hranice $100 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ (kmen 3.7 izolován z pasterovaného mléka ve standardizačním tanku produkoval kadaverin v hodnotě $212,0 \pm 13,6 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$). Tento kmen byl identifikován jako *Bacillus licheniformis*.

Při posuzování schopnosti dekarboxylace za vzniku putrescinu bylo zjištěno, že téměř 60 % všech sledovaných kmenů mělo putrescin-negativní dekarboxylázovou aktivitu. Nicméně 31 % izolátů bylo schopno syntetizovat putrescin v množství pouze do $10,0 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$. U 21 % izolátů (17 kmenů) byla poměrně vyšší putrescin-pozitivní dekarboxylázová aktivita, protože stanovené koncentrace putrescinu v dekarboxylačním mediu byly vyšší než $100 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$. V případě, že by tyto kmeny produkovaly takové hodnoty putrescinu i v potravinách, lze konzumace takových potravin označit za zdraví nebezpečné. A to z důvodu, že přítomnost putrescinu (ale i kadaverinu), může značně zvyšovat negativní účinky na lidský organizmus histaminu a tyraminu, které jsou popsány výše a v kapitole 1.1.2 Toxikologické účinky biogenních aminů. Mimo to může být přítomnost vysokých množství putrescinu závažná i důvodu jeho možné reakce s dusitany za vzniku karcinogenních látek – nitrosaminů (Drabik-Markiewicz et al., 2011, s. 1540; Gasarasi et al., 2001, s. 51-53; Karovičová a Kohajdová, 2005, s. 71; Wunderlichová et al., 2014, s. 269). V souvislosti se sledováním produkce putrescinu bylo zpozorováno, že kmeny s jeho vysokou produkcí byly izolovány z mléka po pasteraci, které bylo pro výrobu tvarohů použito. Z těchto údajů je možné usoudit, že proběhlá pasterace nemusí nijak významně ovlivnit přítomnost mikroorganismů schopných produkovat biogenní amin putrescin. Případně mohlo dojít i k sekundární kontaminaci po pasteračním ošetření mléka určené pro výrobu vzorků tvarohu. Další 5 kmenů (produkující putrescin ve vysokých koncentracích) bylo izolováno z tvarohoviny tvarohového zrna i finálního vzorku tvarohu (Tabulka 5).

Fenyletylamin byl detekován v 53 % dekarboxylačních médiích inokulovaných sledovanými kmeny. 13 kmenů produkovalo fenyletylamin v množství vyšší než $100 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$. Produkce tohoto biogenního aminu probíhala u izolovaných kmenů bez rozdílu fáze výroby (syrové mléko, pasterované mléko před zakysáním, meziproduktů a vzorků tvarohů).

Stejně jako u sperminu i tyramin byl detekován ve všech dekarboxylačních médiích, které byly inokulovány sledovanými kmeny. Celkem 44 kmenů sledovaných kmenů projevily značně vysokou pozitivní dekarboxylázovou aktivitu pro vznik sperminu. Koncentrace tyraminu byly v porovnání s hodnotami sperminu významně vyšší. 60 % kmenů vykazovala značnou tyramin-pozitivní dekarboxylázovou aktivitu, protože detekované koncentrace tohoto biogenního

aminu převyšovaly hranici 200,0 mg·l⁻¹. U některých izolátů byla dokonce detekována koncentrace tyraminu vyšší než 1000,0 mg·l⁻¹. Spolu s histaminem se tyramin z hlediska jejich účinků na lidský organismus řadí mezi jedny z nejrizikovější biogenní aminy. Koncentrace tyraminu 100 – 800 mg·kg⁻¹ může mít značný toxický vliv na lidský organismus. Dle Nout (1994, s. 295) může být konzumace potraviny s koncentrací tyraminu vyšší než 1000,0 mg·kg⁻¹ toxická i pro konzumenty s funkčním detoxifikačním mechanismem (Anonym 2011, s. 19; Halász et al., 1994, s. 43; Önal, 2007, s. 1475; Santos, 1996, s. 214; Ten Brink et al., 1990, s. 75).

U všech kmenů, u nichž byla detekována schopnost produkce biogenního aminu kadaverinu, putrescinu, histaminu a tyraminu byly pomocí metody PCR amplifikovány produkty odpovídajících velikostí, které ukazují na přítomnost genů, který je kódován příslušný dekarboxylační enzym. V námi vybraných biogenních aminech jde o lyzin-dekarboxylázu, ornitin-dekarboxyláza, histidin-dekarboxyláza, tyrozin-dekarboxylázu (Buňková et al., 2011, 117; Burdychová a Komprda, 2007, s. 151; Ladero et al., 2012, s. 310).

Schopnost produkce biogenních aminů u všech sledovaných kmenů izolovaných z fázových vzorků je uvedena v Tabulce 5. Jednotlivé kmeny, jejich značení, ale i jejich MALDI-TOF MS identifikace je uvedena v Příloze E.

Tabulka 5 Produkce biogenních aminů u izolovaných kmenů z fázových vzorků

Kód vzorku *	obsah biogenních aminů [mg·ml ⁻¹]							
	HIS**	FEA**	TYM**	TRYP**	PUT**	KAD**	SPD**	SPM**
1.1	ND	ND	++	+	+	ND	ND	++
1.2	ND	ND	++	ND	ND	ND	ND	++
1.3	ND	+++	+++++	ND	+	ND	ND	+
2.1	ND	ND	+++	ND	+++++	ND	ND	++
2.2	ND	ND	+++++	ND	ND	ND	ND	++
2.3	ND	++	+++++	+	+++++	++	ND	+
2.4	+	++	+++++	+	+	+	ND	+
2.5	ND	+	+++++	++	++	+	ND	++
3.1	ND	ND	++	ND	++	ND	ND	++++
3.2	ND	ND	+++	ND	ND	ND	ND	+++
3.3	ND	ND	+++++	ND	ND	ND	ND	++++
3.4	ND	ND	+++	+	+++++	ND	ND	+++
3.5	++	ND	+++++	+	+++++	ND	ND	++

* kmeny popsány v Příloze E

** HIS – histamin, FEA – fenylethylamin, TYM – tyramin, TRYP – tryptamin, PUT – putrescin, KAD – kadaverin, SPD – spermidin a SPM spermin

ND – biogenní amin nedetekován, „+“ pod 10 mg·l⁻¹, „++“ 10 – 50 mg·l⁻¹, „+++“ 50 – 100 mg·l⁻¹, „++++“ 100 – 200 mg·l⁻¹, „+++++“ nad 200 mg·l⁻¹

Pokračování Tabulky 5

kód vzorku*	obsah biogenních aminů [mg·ml ⁻¹]									
	HIS**	FEA**	TYM**	TRYP**	PUT**	KAD**	SPD**	SPM**		
3.6	ND	ND	++	ND	ND	ND	ND	++		
3.7	ND	ND	++	ND	++	+++++	ND	++		
3.8	+	++	+++++	++	+++++	ND	ND	++		
3.9	ND	++	+++++	++	+++++	ND	ND	+		
3.10	ND	ND	+	++	ND	ND	ND	++		
3.11	ND	ND	+++++	ND	+++++	++	ND	+		
4.A.1	ND	ND	+++	ND	+++++	ND	ND	+++		
4.A.2	ND	ND	+++	ND	ND	ND	ND	+++		
4.A.3	ND	ND	+++++	ND	+++++	ND	ND	++		
4.A.4	ND	ND	++	ND	ND	ND	ND	++		
4.A.4	ND	ND	++	ND	ND	ND	ND	++		
4.A.5	+	++	+++++	+++++	+++++	++	ND	+		
4.A.6	ND	+++	+++++	ND	ND	ND	ND	+		

* kmeny popsány v Příloze E

** HIS – histamin, FEA – fenylethylamin, TYM – tyramin, TRYP – tryptamin, PUT – putrescin, KAD – kadaverin, SPD – spermidin a SPM spermin

ND – biogenní amin nedetekován, „+“ pod 10 mg·l⁻¹, „++“ 10 – 50 mg·l⁻¹, „+++“ 50 – 100 mg·l⁻¹, „++++“ 100 – 200 mg·l⁻¹, „+++++“ nad 200 mg·l⁻¹

Pokračování Tabulky 5

Kód vzorku *	obsah biogenních aminů [mg·l ⁻¹]							
	HIS**	FEA**	TYM**	TRYP**	PUT**	KAD**	SPD**	SPM**
4.A.7	+	+	++	++	+	+	ND	++
4.A.8	ND	++	+++++	+	+++++	ND	ND	+
4.B.1	ND	ND	+++++	ND	ND	ND	ND	++++
4.B.2	ND	ND	++	ND	ND	ND	ND	++++
4.B.3	ND	ND	++	ND	ND	ND	ND	++
4.B.4	ND	ND	++	ND	ND	ND	ND	++
4.B.5	+	++	+++++	++	+++++	++	ND	++
4.B.6	ND	+++++	+++++	ND	ND	ND	ND	+
4.B.7	ND	+++++	+++++	+	+	+	ND	+
4.B.8	ND	++	+++++	++	+	+	ND	+
5.A.1	ND	ND	++	ND	ND	ND	ND	++
5.A.2	ND	+++++	+++++	+	ND	ND	ND	+
5.A.3	ND	+++	+++++	+	ND	ND	ND	+

* kmeny popsány v Příloze E

** HIS – histamin, FEA – fenylethylamin, TYM – tyramin, TRYP – tryptamin, PUT – putrescin, KAD – kadaverin, SPD – spermidin a SPM spermin

ND – biogenní amin nedetekován, „+“ pod 10 mg·l⁻¹, „++“ 10 – 50 mg·l⁻¹, „+++“ 50 – 100 mg·l⁻¹, „++++“ 100 – 200 mg·l⁻¹, „+++++“ nad 200 mg·l⁻¹

Pokračování Tabulky 5

kód vzorku*	obsah biogenních aminů [mg·ml ⁻¹]									
	HIS**	FEA**	TYM**	TRYP**	PUT**	KAD**	SPD**	SPM**		
5.A.4	+	++	+++++	++	+	+	ND	++		
5.A.5	ND	+	++	++	+	++	ND	++		
5.A.6	ND	ND	++	++	+	+	ND	++		
5.A.7	ND	+	+++++	++	+	+	ND	+		
5.B.1	ND	ND	++	ND	ND	ND	ND	++		
5.B.2	++++	+++	+++++	++	++	ND	ND	+		
5.B.3	ND	+++++	+++++	ND	ND	ND	ND	+		
5.B.4	ND	++++	+++++	+	+++++	+	ND	+		
5.B.5	ND	+++++	+++++	ND	+	ND	ND	+		
5.B.6	ND	ND	++	++	+	+	ND	++		
5.B.7	ND	ND	++	++	+	+	ND	++		
6.A.1	+	++	+++++	+	+	+	ND	+		
6.A.2	ND	+++	+++++	ND	ND	ND	ND	+		

* kmeny popsány v Příloze E

** HIS – histamin, FEA – fenylethylamin, TYM – tyramin, TRYP – tryptamin, PUT – putrescin, KAD – kadaverin, SPD – spermidin a SPM spermin

ND – biogenní amin nedetekován, „+“ pod 10 mg·l⁻¹, „++“ 10 – 50 mg·l⁻¹, „+++“ 50 – 100 mg·l⁻¹, „++++“ 100 – 200 mg·l⁻¹, „+++++“ nad 200 mg·l⁻¹

Pokračování Tabulky 5

Kód vzorku *	obsah biogenních aminů [mg·ml ⁻¹]								
	HIS**	FEA**	TYM**	TRYP**	PUT**	KAD**	SPD**	SPM**	
6.A.3	+	+	++	++	+	+	ND	++	
6.A.4	+	++	+++++	++	+	+	ND	++	
6.A.5	ND	++	+++++	ND	+	+	ND	+	
6.A.6	ND	++	+++++	+	+++++	+	ND	++	
6.B.1	+	ND	+++++	+	+	+	ND	++	
6.B.2	ND	++	+++++	+	+	+	ND	+	
6.B.3	ND	+++++	+++++	+	+	+	ND	+	
6.B.4	ND	+++++	+++++	+	ND	+	ND	+	
6.B.5	ND	+++++	+++++	++	+++++	++++	ND	+	
7.A.1	ND	++	++	ND	ND	ND	ND	++	
7.A.2	+	ND	+++++	+	+	+	ND	+	
7.A.3	ND	++++	+++++	+	ND	ND	ND	+	
7.A.4	ND	++	+++++	++	+++++	+	ND	++	

* kmeny popsány v Příloze E

** HIS – histamin, FEA – fenylethylamin, TYM – tyramin, TRYP – tryptamin, PUT – putrescin, KAD – kadaverin, SPD – spermidin a SPM spermin

ND – biogenní amin nedetekován, „+“ pod 10 mg·l⁻¹, „++“ 10 – 50 mg·l⁻¹, „+++“ 50 – 100 mg·l⁻¹, „++++“ 100 – 200 mg·l⁻¹, „+++++“ nad 200 mg·l⁻¹

Pokračování Tabulky 5

kód vzorku*	obsah biogenních aminů [mg·ml ⁻¹]									
	HIS**	FEA**	TYM**	TRYP**	PUT**	KAD**	SPD**	SPM**		
7.A.5	ND	++	+++++	++	+	+	ND	++		
7.A.6	ND	++	+++++	++	+++++	++	ND	+		
7.A.7	ND	ND	+++++	++	+	++	ND	++		
7.B.1	ND	ND	++	ND	ND	ND	ND	++		
7.B.2	ND	ND	++	ND	ND	ND	ND	++		
7.B.3	ND	+++++	+++++	+	ND	ND	+	+		
7.B.4	ND	+++++	+++++	+	+	+	ND	+		
7.B.5	ND	ND	++	++	+++	+	ND	++		
8.A.1	ND	ND	++	ND	ND	ND	ND	++		
8.A.2	ND	ND	++	ND	+	ND	ND	++		
8.A.3	ND	+++++	+++++	ND	ND	ND	ND	+		
8.A.4	ND	ND	+++++	ND	ND	ND	ND	+++		
8.B.1	ND	ND	+++	ND	ND	ND	ND	++		

* kmeny popsány v Příloze E

** HIS – histamin, FEA – fenylethylamin, TYM – tyramin, TRYP – tryptamin, PUT – putrescin, KAD – kadaverin, SPD – spermidin a SPM spermin

ND – biogenní amin nedetekován, „+“ pod 10 mg·l⁻¹, „++“ 10 – 50 mg·l⁻¹, „+++“ 50 – 100 mg·l⁻¹, „++++“ 100 – 200 mg·l⁻¹, „+++++“ nad 200 mg·l⁻¹

Pokračování Tabulky 5

Kód vzorku *	obsah biogenních aminů [mg·ml ⁻¹]							
	HIS**	FEA**	TYM**	TRYP**	PUT**	KAD**	SPD**	SPM**
8.B.2	ND	+++++	+++++	ND	ND	ND	ND	+
8.B.3	ND	ND	++	ND	ND	ND	ND	++

* kmeny popsány v Příloze E

** HIS – histamin, FEA – fenylethylamin, TYM – tyramin, TRYP – tryptamin, PUT – putrescin, KAD – kadaverin, SPD – spermidin a SPM spermin

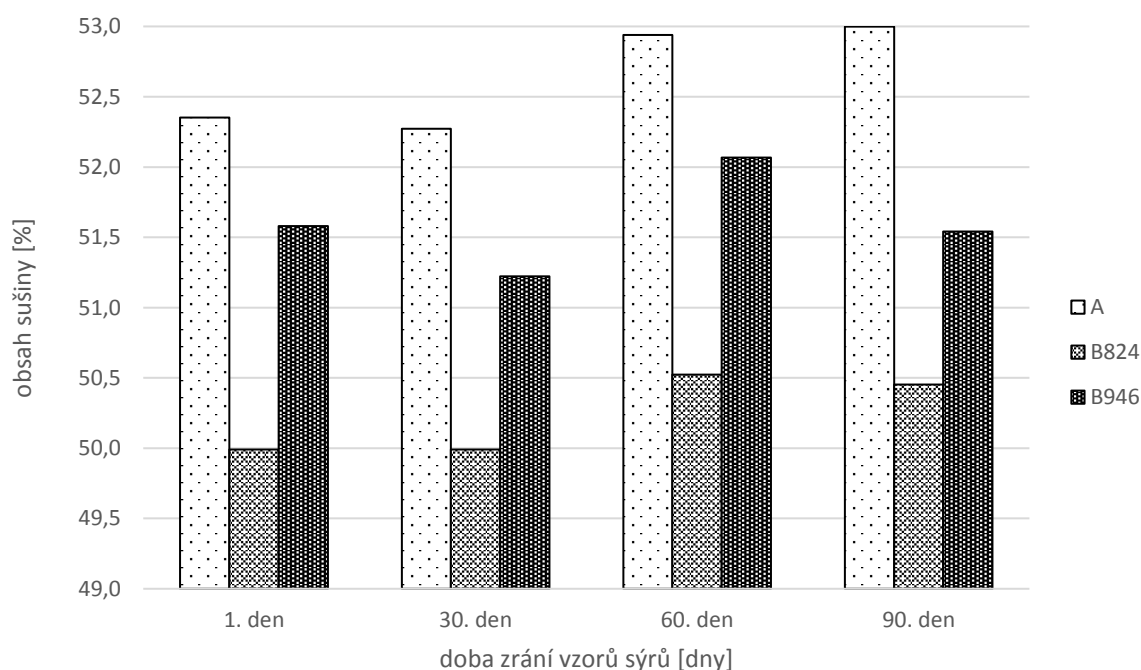
ND – biogenní amin nedetekován, „+“ pod 10 mg·l⁻¹, „++“ 10 – 50 mg·l⁻¹, „+++“ 50 – 100 mg·l⁻¹, „++++“ 100 – 200 mg·l⁻¹, „+++++“ nad 200 mg·l⁻¹

4.2 Výsledky 2. experimentu

V rámci 2. experimentu byly porovnávány dekarboxylační aktivity dvou zákysových dekarboxyláza pozitivních bakterií rodu *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*. Kmeny byly obdrženy ze Sbírký mlékařských mikroorganismů Laktoflora – CCDM 824 (označení dále B₈₂₄) a CCDM 946 (označení dále B₉₄₆). Jejich dekarboxylázová aktivita byla sledována v sýrech holandského typu po dobu 90 dnů zrání sýrů při teplotě 10 ± 1 °C. Kromě sýrů obsahující dekarboxyláza pozitivní kmeny, které byly přidány v průběhu technologie výroby sýrů, byly vyrobeny i kontrolní vzorky sýrů (označení dále A), při jejichž výrobě byla použita pouze komerční kultura složená z mezofilních mikroorganismů (Laktoflora, Milcom, a.s., Česká republika).

Analýza základních parametrů

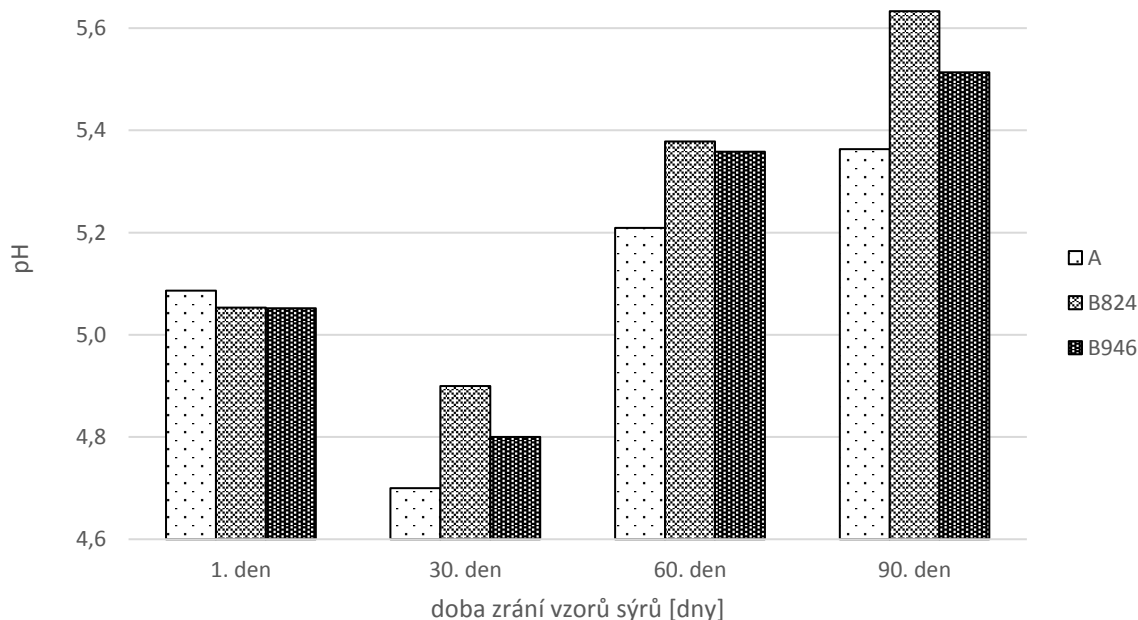
1. den zrání sýrů u všech výsledků analýzy základních parametrů nebyly upozorovány mezi všemi vzorky žádné významné rozdíly. Obsah sušiny byl 50,0 – 53,0 ± 0,2 % (w/w) (Obr. 21), pH se pohybovalo v rozmezí 5,0 – 5,1 (Obr. 21) a koncentrace NaCl byla stanovena 0,21 – 0,24 % (w/w) u všech analyzovaných vzorků A, B₈₂₄ a B₉₄₆. Koncentrace NaCl byla nízká z důvodu, že vzorky byly odebrány po procesu prokysání, ale před samotným nasolením sýrů v solné lázni. Sýry byly soleny až po odběru vzorků sloužících pro analýzy.



Obr. 21: Výsledky obsahu sušiny vzorků sýrů 2. experimentu (A bez přídavku sledovaného kmene, B₈₂₄ a B₉₄₆ s přídavkem dekarboxyláza pozitivních bakterií rodu *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 824 a CCDM 946).

U kontrolních vzorků byla po celou dobu experimentu naměřena sušina $52,6 \pm 0,4$ % (w/w). Nejnižší obsah sušiny $50,0 \pm 0,5$ % byl naměřen po celou dobu skladování a zrání sýrů u vzorku inokulovaného kmenem *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 824. Tyto mírné rozdíly v obsahu sušiny mohly být způsobeny odchylkou v působeném tlaku v průběhu technologie výroby sýrů, a to lisování. Nicméně rozdíly v obsahu sušiny jsou bez významných statistických rozdílů.

Den po výrobě sýrů před solením byly naměřené hodnoty srovnatelné. 30. den zrání sýrů byl u všech vzorků pozorován mírný pokles hodnot pH, které se pohybovaly v rozmezí 4,7 – 4,9. Od 30. dne s rostoucí dobou skladování rostly i hodnoty pH u všech analyzovaných vzorků. Na Obr. 22 je možno vidět změny hodnot pH u kontrolních vzorků A i u vzorků inokulovaných dekarboxyláza pozitivními kmeny. Lze však konstatovat, že 90. den zrání a skladování sýrů byly nejnižší hodnoty naměřeny u vzorků kontrolních, tedy A. Naopak nejvyšší hodnoty pH byly zjištěny ve vzorcích B₈₂₄. Tyto rozdíly hodnot nejsou však nijak statisticky významné (5,4 pro vzorek A a 5,6 pro vzorek B₈₂₄). Pokles hodnot pH v průběhu prvních 30ti dnů zrání sýrů může být důsledkem homofermentativního kvašení laktózy pomocí bakterií mléčného kvašení (zejména díky bakteriím *Lactococcus* spp., *Leuconostoc* spp., *Lactobacillus* spp., *Streptococcus* spp., které ji využívají jako zdroj energie pro jejich růst a množení) (McSweeney a Sousa, 2004, s. 294).



Obr. 22: Výsledky pH vzorků sýrů 2. experimentu (A bez přidavku sledovaného kmene, B₈₂₄ a B₉₄₆ s přidavkem dekarboxyláza pozitivních bakterií rodu *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 824 a CCDM 946).

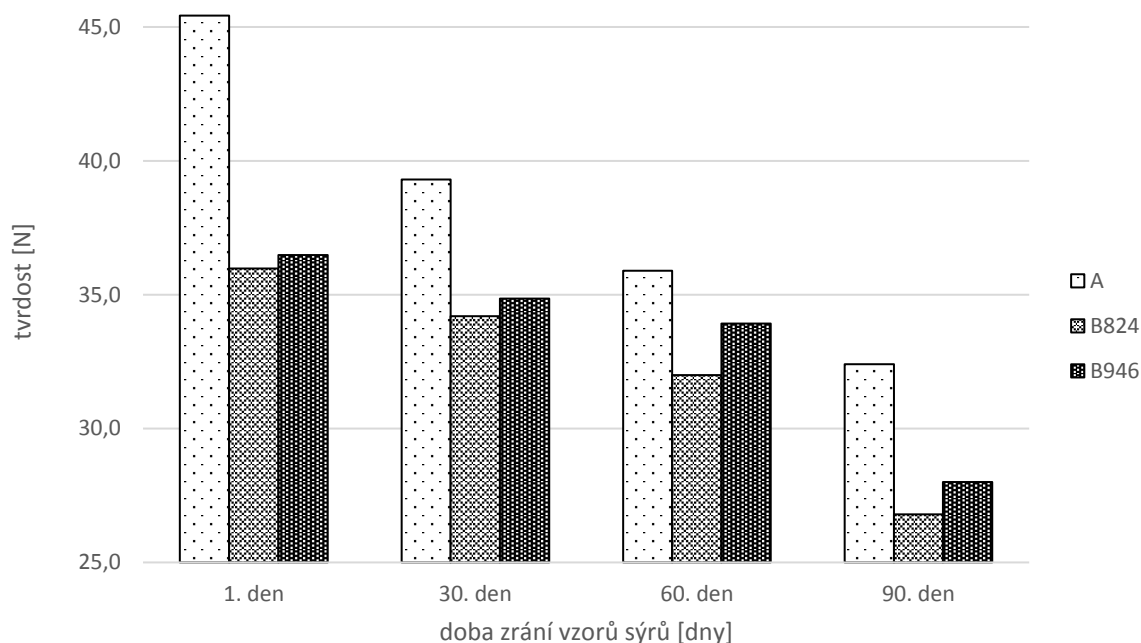
Pokles pH v počátečním stádiu zrání byl zpozorován i jinými autory (Adams a Nout, 2001, s. 156; Alewijn, 2006, s. 86; Pachlová et al., 2011, s. 106-107). Tyto nižší hodnoty pH jsou dány tím, že dochází k fermentaci laktózy, která zůstala v sýřenině. Dochází ke vzniku kyseliny mléčné jejíž přítomnost sýry okyseluje (viz. 1.2.1 Metabolismus laktózy a reakce kyseliny mléčné). Fox et al. (2000, s. 487) ve své knize uvádí, že laktóza je zcela rozložena během prvních dnů zrání sýrů. S další dobou zrání může vzniklá kyselina mléčná reagovat (racemizace, přeměna na formiát, acetát, etanol a oxid uhličitý). Tyto reakce kyseliny mléčné se projeví nárůstem pH, což tomu bylo i v našem experimentu 60. a 90. den ve všech analyzovaných vzorcích (Fox et al., 1998, s. 342; 2000, s. 387; 2004, s. 521; Grossiord et al., 1998, s. 78; McSweeney a Sousa, 2000, s. 294; Pachlová et al., 2011, s. 106-107; Roginski, Fuquay a McSweeney, 2002, s. 842). Obsah NaCl byl od 30. dne zrání sýrů 2,1 – 2,3 % (w/w) a tyto hodnoty se již do konce experimentu nijak významně statisticky nelišily.

Na základě výsledků základních parametrů sýrů lze konstatovat, že přidavek sledovaného kmene *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 824 a CCDM 946 v průběhu technologie výroby sýrů neměl žádný významný vliv na vybrané parametry (obsah sušiny, pH a obsah NaCl).

Texturní profilová analýza

Vývoj tvrdosti všech sledovaných vzorků sýrů po celou dobu zrání a skladování (90 dnů při teplotě 10 ± 1 °C) znázorňuje Obr. 23. U kontrolních vzorků A (vzorků, které byly inokulovány pouze komerční mezofilní zákysovou kulturou Laktoflora, Milcom, a.s. Česká republika) byla ve všech odběrových dnech zpozorována vyšší tvrdost v porovnání se vzorky inokulovanými sledovanými kmeny. 1. den ode dne výroby byly hodnoty tvrdosti kontrolních vzorků sýrů A $45,4 \pm 0,2$ N, zatímco u vzorků B₈₂₄ a B₉₄₆ byly naměřeny hodnoty $36,0 \pm 0,2$ N a $36,5 \pm 0,3$ N. Po celou dobu skladování byl u všech vzorků zpozorován klesající trend tvrdosti až do konce doby zrání (90. den). Konečné hodnoty tvrdosti byly $32,4 \pm 0,6$ N pro kontrolní vzorky sýrů A, $26,8 \pm 0,5$ N pro vzorky B₈₂₄ (inokulované kmenem *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 824) a $28,0 \pm 0,8$ N u vzorku B₉₄₆ (inokulované kmenem *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 946).

Snižování tvrdosti v průběhu zrání sýrů, které bylo zpozorováno u všech analyzovaných vzorků, bylo popsáno i několika autory v dřívějších studiích. Tento jev je dán tím, že během zrání sýrů dochází k řadě proteolytických reakcí bílkovin pomocí působení přítomné mikroflóry. Přítomnost rozdílných mikroorganismů může být i důvodem odlišných hodnot mezi kontrolními vzorky A a vzorky B₈₂₄ a B₉₄₆ inokulované sledovanými kmeny. Proteolýza bílkovin probíhá za současného vzniku volných aminokyselin (viz. níže Analýza volných aminokyselin) (Bertolda et al., 2000, s. 208-210; Buňka et al., 2013a, s. 1018-1020; 2013b, s. 190-192; Pachlová et al., 2012, s. 1850; 2013, s. 1870; Pinho et al., 2001, s. 290).



Obr. 23: Vývoj tvrdosti vzorků sýrů 2. experimentu v průběhu 90denního zrání (A bez přídavku sledovaného kmene, B₈₂₄ a B₉₄₆ s přídavkem dekarboxyláza pozitivních bakterií rodu *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 824 a CCDM 946).

Mikrobiologická analýza

Mikrobiologické analýze byly kromě vzorky laboratorně vyráběných sýrů podrobeny i vzorky zákysů. Provedenou mikrobiologickou analýzou bylo zjištěno, že v případě zákysů inokulovaných komerční mezofilní kulturou Laktoflora, Milcom, a.s. Česká republika, byly detekovány nižší počty mléčných koků ($8,0 \pm 0,8 \log \text{KTJ} \cdot \text{ml}^{-1}$) ve srovnání se zákysy inokulovanými sledovanými dekarboxyláza pozitivními kmeny. Zákys, který byl připraven inokulací kmene *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 824 (zákys pro výrobu B₈₂₄) obsahoval počty mléčných koků $8,2 \pm 0,4 \log \text{KTJ} \cdot \text{ml}^{-1}$) a u zákysu inokulovaného kmenem *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 946 (určený pro výrobu B₉₄₆) byly detekovány počty koků $8,4 \pm 0,7 \log \text{KTJ} \cdot \text{ml}^{-1}$).

Tabulka 6 obsahuje počty jednotlivých skupin mikroorganismů, které byly detekovány u modelových vzorků sýrů v průběhu jejich zrání (90 dnů). Celkový počet mikroorganismů (zaměřený na sledování počtů mezofilních aerobních a fakultativně anaerobních mikroorganismů) u kontrolních vzorků A byl 1. den ode dne výroby nižší ($8,0 \pm 0,9 \log \text{KTJ} \cdot \text{ml}^{-1}$) než celkové počty mikroorganismů u vzorků B₈₂₄ ($8,4 \pm 0,7 \log \text{KTJ} \cdot \text{ml}^{-1}$) a B₉₄₆ ($8,2 \pm 0,4 \log \text{KTJ} \cdot \text{ml}^{-1}$). Od 60. dne zrání kontrolních vzorků A byl zaznamenán klesající trend až do konce experimentu (90. dne), kde konečné hodnoty celkových počtů mikroorganismů byly $7,3 \pm 0,5 \log \text{KTJ} \cdot \text{ml}^{-1}$.

Tabulka 6 Počty vybraných skupin mikroorganismů v průběh 90 dnů zrání kontrolních vzorků sýrů A, sýrů s přidavkem kmene *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 824 (B₈₂₄) a *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 946 (B₉₄₆).

Doba zrání [den]	Vzorek	Počty mikroorganismů vybraných skupin [log KTJ·ml ⁻¹]				
		CPM ^{a)}	BMK ^{b)}	laktobacily	enterobakterie	enterokoky
1	A	8,0 ± 0,9	8,6 ± 0,1	6,6 ± 0,5	4,7 ± 0,2	5,4 ± 0,4
	B ₈₂₄	8,4 ± 0,7	9,0 ± 0,2	7,2 ± 0,4	4,5 ± 0,5	5,0 ± 0,5
	B ₉₄₆	8,2 ± 0,4	8,6 ± 0,4	7,4 ± 0,2	4,2 ± 0,3	5,3 ± 0,3
30	A	8,0 ± 0,3	7,6 ± 0,4	7,8 ± 0,1	4,1 ± 0,3	5,8 ± 0,4
	B ₈₂₄	8,4 ± 0,3	8,6 ± 0,5	8,3 ± 0,3	3,9 ± 0,5	5,8 ± 0,5
	B ₉₄₆	8,1 ± 0,2	8,7 ± 0,1	8,1 ± 0,2	4,0 ± 0,4	5,6 ± 0,3
60	A	7,9 ± 0,1	6,2 ± 0,2	7,8 ± 0,6	3,0 ± 0,7	5,7 ± 0,2
	B ₈₂₄	7,2 ± 0,4	7,0 ± 0,4	8,4 ± 0,3	2,9 ± 0,8	5,8 ± 0,6
	B ₉₄₆	8,1 ± 0,4	7,7 ± 0,7	8,5 ± 0,4	4,0 ± 0,3	5,2 ± 0,4
90	A	7,3 ± 0,5	5,7 ± 0,5	7,8 ± 0,4	2,3 ± 0,5	5,5 ± 0,3
	B ₈₂₄	6,8 ± 0,7	6,4 ± 0,3	8,5 ± 0,2	2,3 ± 0,5	5,7 ± 0,5
	B ₉₄₆	6,7 ± 0,3	7,0 ± 0,2	8,3 ± 0,3	2,7 ± 0,4	5,0 ± 0,2

a) celkové počty mikroorganismů (zejména mezofilní a fakultativně anaerobní mikroorganismy)

b) bakterie mléčného kvašení (zahrnující bakterie rodu *Lactococcus*, *Leuconostoc* a *Streptococcus*)

A – kontrolní vzorek inokulovaný zákysem z komerční kultury Laktoflora Milcom a.s., Česká republika

B₈₂₄ a B₉₄₆ vzorky inokulované kromě komerčním zákysem i sledovaným kmenem *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 824 (B₈₂₄) a CCDM 946 (B₉₄₆)

U vzorků s přidavkem dekarboxyláza pozitivního kmenu B₈₂₄ a B₉₄₆ byly hodnoty mezi 1. a 30. dnem téměř neměnné, nicméně od 30. dne byl zaznamenán pokles počtu celkových mikroorganismů. Tento pokles byl poněkud strmější než u kontrolních vzorků, což mělo za následek, že hodnoty celkového počtu mikroorganismů u vzorků B₈₂₄ a B₉₄₆ byly po 90 dnech zrání nižší než hodnoty u kontrolních vzorků sýrů A ($6,8 \pm 0,5$ log KTJ·ml⁻¹ u vzorku B₈₂₄ a $6,7 \pm 0,3$ log KTJ·ml⁻¹ u vzorku B₉₄₆). Obdobný klesající trend byl zaznamenán i u počtů mléčných koků u všech sledovaných vzorků. Zatímco počáteční hodnoty mléčných koků byly v rozmezí 8,6 – 9,0 log KTJ·ml⁻¹ (bez významných rozdílů mezi jednotlivými vzorky), konečné hodnoty se pohybovaly 5,7 – 7,0 log KTJ·ml⁻¹. Současně bylo zpozorováno, že nejnižší počty mléčných koků se vyskytovaly u kontrolních vzorků sýrů A.

Vývoj počtu laktobacilů měl zcela odlišný trend oproti dvěma předchozím skupinám mikroorganismů. V průběhu zrání sýrů docházelo k pozvolnému nárůstu až do 90. dne. Poněkud mírně nižší počty laktobacilů byly detekovány u kontrolních vzorků sýrů A v porovnání se vzorky inokulované sledovaným mikroorganismem (vzorky B₈₂₄ a B₉₄₆).

Počty enterobakterií obdobně jako počty BMK a CPM klesaly u všech vzorků modelových sýrů po celou dobu experimentu. Počty enterobakterií během 90 dnů zrání klesly téměř na polovinu původního počtu a současně nebyly zpozorovány žádné významné rozdíly mezi jednotlivými vzorky ($2,3 - 2,7$ log KTJ·ml⁻¹). U skupiny enterokoků byly hodnoty po celou dobu zrání sýrů téměř konstantní a rovněž jako u předchozí skupiny nebyly zpozorovány žádné významné rozdíly mezi vzorky A, B₈₂₄ a B₉₄₆.

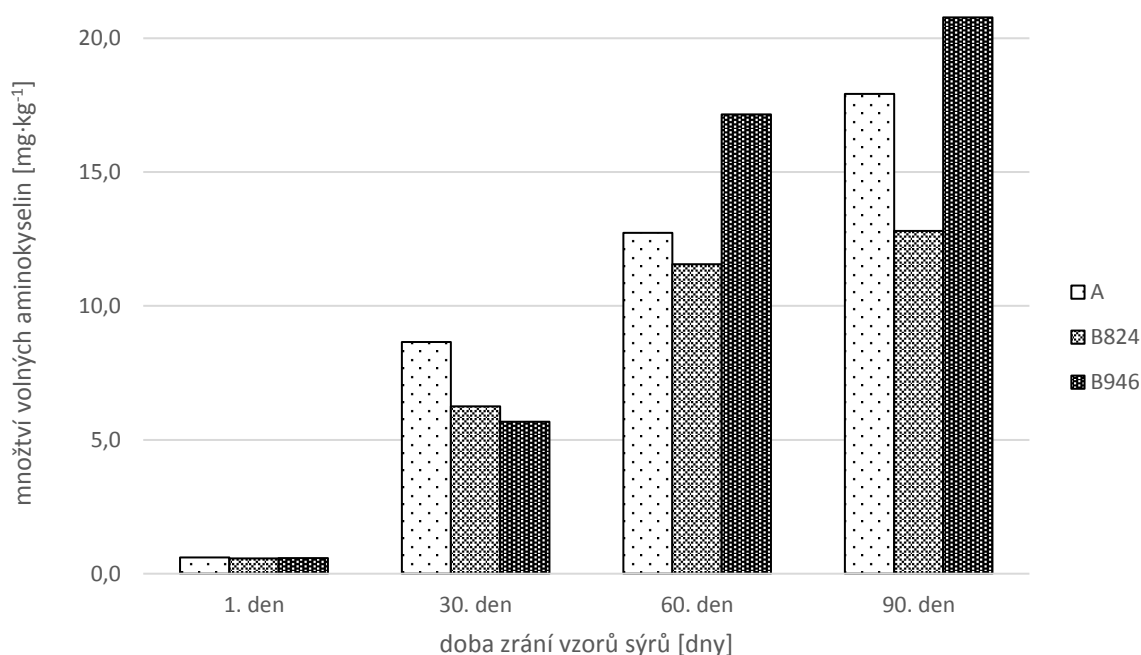
Klesající trend v průběhu zrání sýrů v počtu mléčných koků ve své publikaci uvedl i Fox et al. (2004, s. 547), který popisuje, že počáteční hodnoty zákysových bakterií v sýrech mohou dosahovat hodnot až 10⁹ KTJ·g⁻¹. Tím se zákysové bakterie řadí mezi dominující mikroflóru v sýrech. Nicméně s rostoucí dobou zrání sýrů může docházet ke snižování jejich počtů. Tento pokles snížení počtu mléčných koků může být důsledkem klesajících hodnot pH, protože dochází k plnému rozkladu laktózy, která zůstala v sýrech při technologii výroby, za vzniku kyseliny mléčné. Pokles počtu mléčných koků může být rovněž způsoben i nasolení sýrů v solných lázních a difuze NaCl skrz celou hmotu sýra v průběhu jeho zrání. Výskyt nezákysových laktobacilů v tak významných počtech u modelových vzorků sýrů byl pravděpodobně důsledkem jejich přenosu ze vstupní suroviny, pasterovaného mléka (Fox et al., 2004, s. 473; Kletter, 1977, s. 179-186; McSweeney et al., 2000, s. 299; 2004, s. 139).

Kletter (1977, s. 181) ve své publikaci uvedl, že i v případě přítomnosti malého počtu laktobacilů v mléce (1 KTJ·ml⁻¹) může dojít za optimálních podmínek k významnému nárůstu již během několika týdnů a jejich počty tak mohou dosahovat hodnot až 10⁷ KTJ·ml⁻¹. Vzhledem k tomu, že detekované počty laktobacilů byly u všech vzorků srovnatelné, lze konstatovat, že jejich přítomnost v modelových vzorcích sýrů neměla významný vliv na hodnoty sledovaných

parametrů (především obsah volných aminokyselin a biogenních aminů (Adams a Nout, 2001, s. 184; Alewijn, 2006, s. 45; McSweeney, 2004, s. 138).

Obsah volných aminokyselin

Vývoj celkového obsahu všech sledovaných volných aminokyselin v průběhu zrání modelových vzorků sýrů je znázorněn na Obr. 24. U všech analyzovaných vzorků byl zaznamenán téměř lineární nárůst koncentrace volných aminokyselin až do konce doby zrání (90. den). 1. den ode dne výroby byl celkový obsah volných aminokyselin srovnatelný ($0,58 - 0,61 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$). v průběhu 30 dnů ode dne výroby došlo k významnému navýšení obsahu volných aminokyselin, přičemž vyšší obsahy byly zaznamenány u kontrolních vzorků sýrů A ($8,65 \pm 0,04 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) ve srovnání se vzorky B₈₂₄ a B₉₄₆ ($6,25$ a $5,68 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$). V období od 30. do 60. dne byla zaznamenána vyšší úroveň proteolýzy u zejména u vzorků B₉₄₆ ($17,15 \pm 0,09 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$). Nárůst celkového počtu volných aminokyselin byl zaznamenán i u dvou dalších sledovaných modelových vzorků sýru A a B₈₂₄, ale nárůst nebyl tak významný jako u vzorku B₉₄₆.



*Obr. 24: Vývoj celkového obsahu volných aminokyselin v průběhu 90denního zrání (A bez přídavku sledovaného kmene, B₈₂₄ a B₉₄₆ s přídavkem dekarboxyláza pozitivních bakterií rodu *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 824 a CCDM 946).*

Tabulka 7 Vývoj celkového obsahu volných aminokyselin a vybraných jejich zástupců po dobu zrání kontrolních vzorků sýrů A, sýrů s přísávkem kmene *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 824 (B₈₂₄) a *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 946 (B₉₄₆).

doba zrání [dny]	vzorek	leucin [mg·kg ⁻¹]	arginin [mg·kg ⁻¹]	ornitín [mg·kg ⁻¹]	tyrozin [mg·kg ⁻¹]	glutamová kyselina [mg·kg ⁻¹]
1	A	0,03 ± 0,01	ND	0,04 ± 0,01	0,03 ± 0,01	0,11 ± 0,01
	B ₈₂₄	0,03 ± 0,01	ND	ND	0,04 ± 0,01	0,13 ± 0,01
	B ₉₄₆	0,03 ± 0,01	ND	0,06 ± 0,01	0,03 ± 0,01	0,12 ± 0,01
30	A	1,33 ± 0,05	0,05 ± 0,01	0,42 ± 0,03	0,28 ± 0,02	1,16 ± 0,05
	B ₈₂₄	1,24 ± 0,01	ND	0,12 ± 0,01	0,05 ± 0,01	0,23 ± 0,01
	B ₉₄₆	0,84 ± 0,05	0,02 ± 0,01	0,22 ± 0,01	0,04 ± 0,01	0,82 ± 0,05
60	A	2,00 ± 0,08	0,05 ± 0,01	0,60 ± 0,04	0,36 ± 0,02	1,78 ± 0,08
	B ₈₂₄	1,54 ± 0,06	0,01 ± 0,01	0,08 ± 0,01	0,05 ± 0,02	1,09 ± 0,06
	B ₉₄₆	2,88 ± 0,07	0,02 ± 0,01	0,24 ± 0,02	0,05 ± 0,01	1,13 ± 0,07
90	A	2,72 ± 0,15	0,51 ± 0,01	0,69 ± 0,01	0,39 ± 0,03	2,01 ± 0,15
	B ₈₂₄	1,83 ± 0,10	0,01 ± 0,01	0,06 ± 0,01	0,07 ± 0,01	1,61 ± 0,10
	B ₉₄₆	3,21 ± 0,13	0,21 ± 0,01	0,18 ± 0,01	0,05 ± 0,01	2,06 ± 0,13

ND – nedetekovaná volná aminokyselina během stanovení

Obecně lze konstatovat, že vývoj obsahu volných aminokyselin byl nejmírnější u vzorků inokulovaných kmenem *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 824 a nic se na tom nezměnilo ani dalších 30 dnů zrání vzorků sýrů detekované hodnoty na konci doby zrání byly v porovnání s ostatními vzorky nejnižší ($12,80 \pm 0,05 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$). U kontrolních vzorků sýrů byly naměřené hodnoty $17,93 \pm 0,11 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ a nejvyšší hodnoty celkového počtu volných aminokyselin byly stejně jako 60. den neměřeny u vzorku B₉₄₆ ($20,78 \pm 0,1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$). Tento rostoucí trend se dal předpokládat, neboť v průběhu zrání sýrů dochází k rozkladu bílkovin za vzniku volných aminokyselin. Rostoucí trend volných aminokyselin během zrání sýrů zaznamenala i řada autorů (Pachlová et al., 2011, s. 106-108; Pinho et al., 2001, s. 289).

Řada autorů považuje volnou aminokyselinu leucin za indikátorovou a reprezentativní ve srovnání s jinými volnými aminokyselinami (Fenelon a Guinee, 2000, s. 152; Pinho et al., 2001, s. 290). Ze všech 30 sledovaných volných aminokyselin dosáhl leucin nejvyšších koncentrací u analyzovaných vzorků (Tabulka 7).

V průběhu experimentu byl zaznamenán rostoucí trend koncentrace leucinu a jeho nejvyšší koncentrace byly detekovány ve vzorku B₉₄₆ ($3,21 \pm 0,13 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 90. den zrání modelových vzorků sýrů), zatímco u vzorků inokulovaných druhým sledovaným kmenem (B₈₂₄) byl nárůst nejnižší ($1,83 \pm 0,10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 90. den zrání modelových vzorků sýrů).

Neméně významnými volnými aminokyselinami z hlediska možné dekarboxylace za vzniku biogenních aminů je arginin, ornitin a tyrosin. Arginin a ornitin mohou vstupovat do reakcí, při nichž může být syntetizován biogenní amin putrescin. Putrescin může být působením grampozitivních bakterií tvořen dvěma drahami, kde jako vstupující aminokyseliny do těchto reakcí je právě ornitin a arginin. Tyrosin je pak prekurzorem pro vznik tyraminu (Fiechter, Sivec a Mayer, 2013, s. 191; Ladero et al., 2012, s. 310). Sledováním obsahu argininu bylo zjištěno, že k jeho nárůstu došlo zejména v prvních 30 dnech zrání sýrů, neboť 1. den ode dne výroby nebyl detekován v žádném z analyzovaných vzorků.

Na konci doby zrání sýrů (90. den) byly obdrženy rozdílné výsledky obsahu argininu, přičemž nejvyšších hodnot bylo dosaženo ve vzorku A ($0,51 \pm 0,01 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) a naopak nejnižší koncentrace byly detekovány u vzorky B₈₂₄, neboť se jednalo o zanedbatelné množství ($0,01 \pm 0,01 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$). Kolísavé koncentrace byly detekovány při stanovení obsahu ornitinu. 1. den bylo jeho množství ve všech vzorcích zanedbatelné ($\leq 0,06 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$). Stejně hodnoty byly u vzorky B₈₂₄ naměřeny i 90. den zrání sýrů a v průběhu experimentu jeho hodnoty kolísaly, nicméně u vzorků B₉₄₆ a A byl 90. den zaznamenán nárůst ($0,18 \pm 0,01$ a $0,69 \pm 0,01 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$). stejně jako u předchozích vybraných volných aminokyselin u vzorku A rostla koncentrace tyrozinu v průběhu skladování vzorků a konečné hodnoty se blížily k hodnotě $0,40 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$. Oproti tomu obsah tyrozinu v obou inokulovaných vzorcích (B₈₂₄ a B₉₄₆) byl v zanedbatelném

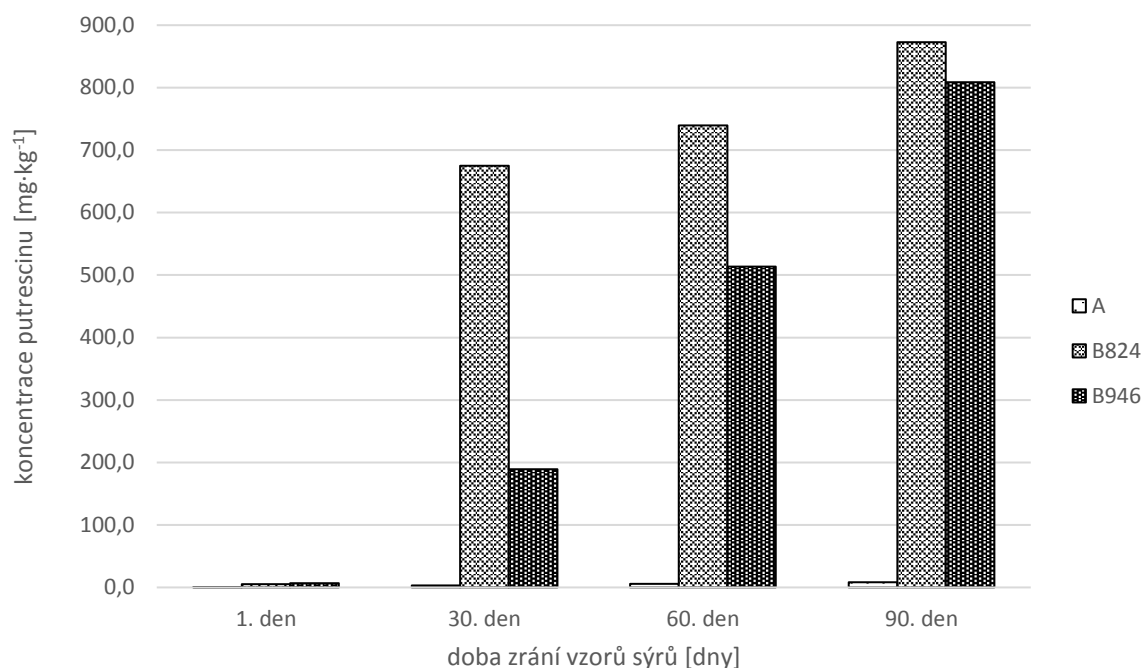
množství a v žádném z analyzovaných odběrových dnů nepřekročil hranici $0,1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ a vývoj koncentrací tyrozinu byl v obou případech téměř shodný. V neposlední řadě byl pozorován i vývoj obsahu glutamové kyseliny. Stejně jako tomu bylo u leucinu, v tomto případě došlo u všech vzorků k nárůstu hodnot po celou dobu zrání. Vyšší koncentrace v prvních 60 dnech zrání vzorků byly naměřeny u kontrolních vzorků sýrů (A), ale dalším 30denním zráním se hodnoty kyseliny glutamové mezi vzorky A a B₉₄₆ téměř vyrovnaly ($2,01 \pm 0,15$ a $2,06 \pm 0,13 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$). Vzorek B₈₂₄ se stejně jako u předešlých zařadil na poslední místo s nejnižším obsahem glutamové kyseliny ($1,61 \pm 0,10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$). Volná aminokyselina glutamová může být působením aminotransferáz či dehydrogenáz přeměněna

na α -ketoglutamovou kyselinu. Tato kyselina může dále spolu s dalšími aminokyselinami (valin, leucin, izoleucin, methionin a fenylalanin) reagovat za vzniku Streckerových aldehydů. Tyto vznikající aldehydy se v sýrech nehromadí, protože jsou přeměňovány na alkoholy nebo na příslušné kyseliny. Tyto vznikající látky jsou tak součástí složitých biochemických procesů, které probíhají v průběhu zrání sýrů a díky tomu, že do jisté míry se mohou podílet na výsledné chuti a zejména vůni sýrů, a řadí se tedy i k sensoricky významným látkám (1.2.3. Proteolýza a reakce volných aminokyselin) (Fox et al., 2000, s. 75, 2004, s. 185; McSweeney a Sousa, 2000, s. 294; Yvon a Rijnen, 2001, s. 186).

Obsah biogenních aminů

V první fázi by sledován obsah biogenních aminů u bujónu inokulovaného sledovaným kmenem. V případě inokulace kmenem *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 824 byla koncentrace biogenních aminů $1517,8 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$. Hodnoty biogenních aminů v bujónu inokulovaných kmenem *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 946 byly v porovnání s předchozím bujónem mírně nižší, a to $1138,2 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$. Rovněž bylo zpozorováno, že u obou bujónů byl v nejvyšší míře obsažen tyramin. Stejně jako bujóny byly analýze obsahu biogenních aminů podrobeny i provozní zákysy. Provozní zákys inokulován pouze komerční mezofilní kulturou Laktoflora (Milcom, a.s., Česká republika) obsahoval biogenní aminy v zanedbatelném množství ($7,7 \pm 0,8 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$). Oproti tomu zákysy připravený smícháním sterilovaného mléka a přísadkou kmenů *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 824 a CCDM 946 obsahovaly značně vyšší koncentrace biogenních aminů ($165,5 \pm 0,3 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ a $150,5 \pm 0,6 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$). Tyto významně vyšší detekované obsahy biogenních aminů v zákysích s obsahující přísadkou dekarboxyláza pozitivního kmene mohly být důsledkem dekarboxylací volných aminokyselin za současného vzniku biogenních aminů. Značné množství biogenních aminů mohlo být i přeneseno z růstového bujónu, ze kterého bylo mléko pro tento druh zákysu inokulován (Adams a Nout, 2001, s. 184; Alewijn, 2006, s. 45; Curtin a McSweeney, 2004, s. 440-448; McSweeney, 2004, s. 138).

Nejvíce zastoupenými biogenními aminy u vzorků B₈₂₄ a B₉₄₆ byl putrescin a tyramin (Obr. 25 a 26).

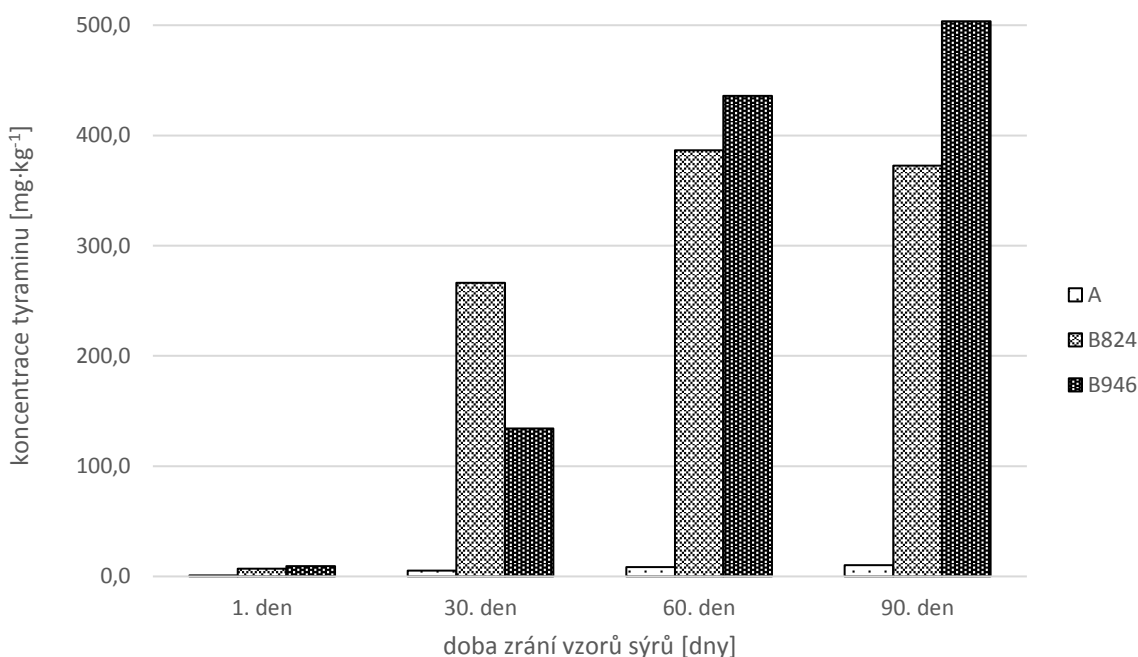


Obr. 25: Vývoj koncentrace biogenního aminu putrescinu v průběhu 90denního zrání (A bez přídavku sledovaného kmene, B₈₂₄ a B₉₄₆ s přídavkem dekarboxyláza pozitivních bakterií rodu *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 824 a CCDM 946).

První den ode dne výroby byly hodnoty obou biogenních aminů ve všech analyzovaných vzorků zcela nevýznamné, ale během 30 dnů došlo k významnému nárůstu jejich koncentrací u vzorků B s přídavky dekarboxyláza pozitivních kmenů. Obsah tyraminu a putrescinu u kontrolních vzorků byl po celou dobu zrání sýrů nevýznamný a nebyla ani v jednom případě překročena hranice 10 mg·kg⁻¹. V případě koncentrací putrescinu byl jejich vývoj mezi vzorky B₈₂₄ a B₉₄₆ zcela odlišný.

U vzorků B₉₄₆ byl zpozorován lineární nárůst hodnot putrescinu a tím se na konci doby zrání 90. den ($808,6 \pm 0,7$ mg·kg⁻¹) hodnoty téměř vyrovnaly s koncentracemi putrescinu detekovaných u vzorků B₈₂₄ ($873,0 \pm 0,5$ mg·kg⁻¹). Zatímco u vzorku B₈₂₄ koncentrace putrescinu rapidně vzrostly během 30 dnů zrání sýrů a od 30. dne až do konce experimentu tyto hodnoty rostly pozvolně. Stejně jako u předešlého biogenního aminu, koncentrace tyraminu u kontrolních vzorků sýrů nebyla překročena hranice 10 mg·kg⁻¹.

Při porovnání koncentrací tyraminu ve vzorcích B₈₂₄ a B₉₄₆ bylo zjištěno, že již během 30 dnů byla u obou vzorků překročena hranice 100,0 mg·kg⁻¹, u vzorku B₈₂₄ koncentrace tyraminu dosahovaly dokonce hodnoty $266,3 \pm 0,5$ mg·kg⁻¹.



Obr. 26: Vývoj koncentrace biogenního aminu tyraminu v průběhu 90denního zrání (A bez přídavku sledovaného kmene, B₈₂₄ a B₉₄₆ s přídavkem dekarboxyláza pozitivních bakterií rodu *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 824 a CCDM 946).

Od 60. dne byly vyšší koncentrace tyraminu detekovány u vzorků B₉₄₆ jak znázorňuje Obr. 26. konečné hodnoty tyraminu 90. den zrání modelových vzorků sýrů byly $372,6 \pm 0,7$ 5 mg·kg⁻¹ (B₈₂₄) a $503,6 \pm 0,5$ mg·kg⁻¹ (B₉₄₆). Mimo jiné bylo u vzorků B₈₂₄ ve srovnání hodnot tyraminu 60. a 90. den zpozorováno, že došlo k mírnému poklesu jeho obsahu (z $386,7 \pm 0,4$ a $372,6 \pm 0,7$ mg·kg⁻¹). Námi detekovaná koncentrace jak tyraminu, tak i putrescinu ve vzorcích B₈₂₄ a B₉₄₆ mohou být z toxikologického hlediska rizikové. Hodnoty obsahu tyraminu v od 30. dne atakovaly hranici 125,0 mg·kg⁻¹, v některých případech ji dokonce několikanásobně překročily. Konzumace potravin s takovým množstvím tyraminu by mohla negativně ovlivnit konzumentovo zdraví, a to i člověka s funkčním detoxifikačním mechanismem. Obzvláště ohrožení by mohli být ti konzumenti, kteří mimo jiné užívají inhibitory aminooxidáz. Dle některých autorů by pro takovéto konzumenty mohla být nebezpečná koncentrace tyraminu již 6,0 mg·kg⁻¹ (Anonym 2011, s. 19; Halász et al., 1994, s. 43; Önal, 2007, s. 1475; Santos, 1996, s. 214; Ten Brink et al., 1990, s. 75). Stejně tak i konzumace takových koncentrací putrescinu by mohla mít negativní účinky na lidský organizmus. Putrescin je rizikový i z hlediska, že jeho negativní účinky mohou být zvyšovány působením ostatních biogenních aminů (především histaminu a tyraminu). Mimo to může putrescin reagovat s dusitany za vzniku karcinogenních nitrosaminů (Buňková et al., 2010, s. 881; Calzada et al., 2013, s. 4817; Drabik-Markiewicz

et al., 2011, s. 1540; Gasarasi et al., 2001, s. 51-53; Karovičová a Kohajdová, 2005, s. 71; Kostyukovskii a Melamed, 1988, s. 626; Yurchenko a Mölder, 2006, s. 326).

Ostatní sledované biogenní aminy (tryptamin, fenyletylamin, kadaverin, histamin, spermidin a spermin) byly detekovány v průběhu celého experimentu, ale jejich hodnoty se pohybovaly v nevýznamných koncentracích. Jejich hodnoty nepřesáhly koncentraci $10,0 \pm 0,5 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ v průběhu 90denního monitoringu obsahu biogenních aminů u žádného ze sledovaných vzorků (A, B₈₂₄ a B₉₄₆). Tyto nízké hodnoty ostatních biogenních aminů poukazují na omezenou přítomnost dekarboxyláza pozitivních kmenů, které jsou schopny jejich produkce.

4.3 Výsledky 3. experimentu

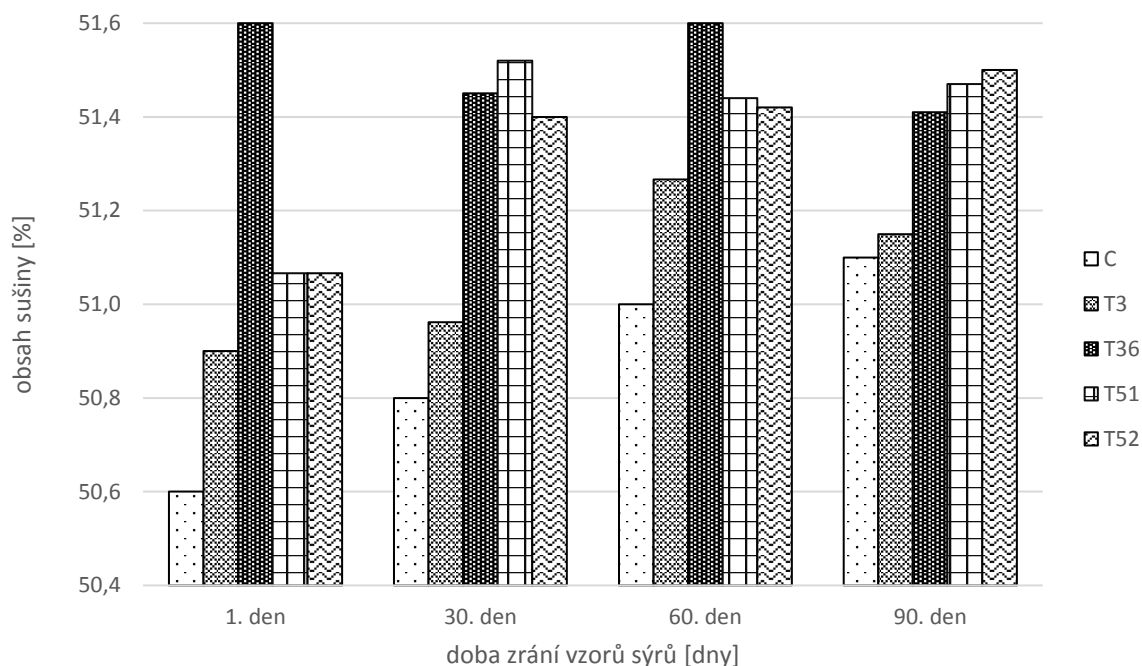
Během 3. experimentu byla pozorována schopnost dekarboxylovat volné aminokyseliny za vzniku biogenních aminů u vybraných mikroorganismů kmene *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* (DEPE T3 – označeno dále jako T₃ a DEPE T36 – označeno dále jako T₃₆) a kmene *Lactobacillus paracasei* (DEPE T51 – označeno T₅₁ a DEPE T52 – označeno T₅₂). Všechny vybrané kmeny se řadí mezi nezákysové bakterie mléčného kvašení, které se mohou v sýrech přirozeně vyskytovat, ale nejsou přidávány záměrně. Sledování vzniku a množství biogenních aminů a dalších parametrů probíhalo po dobu 90 dnů při teplotě $10 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ a všechny sledované parametry byly porovnány s kontrolními vzorky C, které byly skladovány při stejných podmínkách.

Analýza základních parametrů sýrů

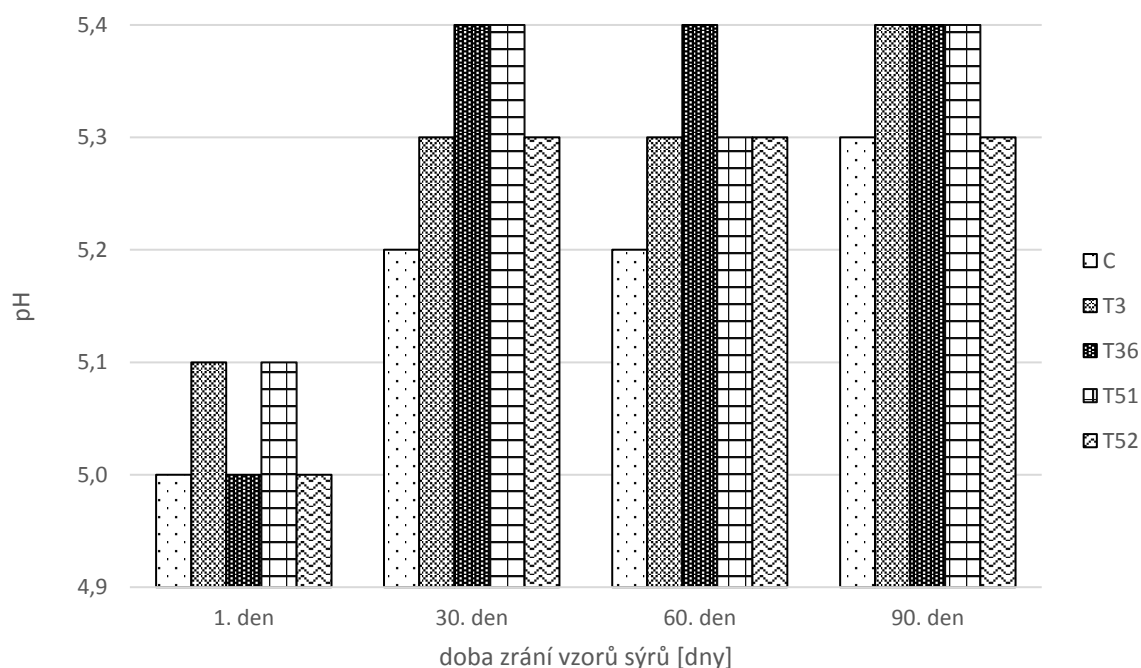
Jedním ze základních parametrů analýzy sýrů byl obsah sušiny. Z výsledků vyplývá, že po celou dobu zrání a skladování modelových vzorků sýrů byly hodnoty sušiny $51,0 \pm 0,5 \text{ } \%$ (w/w), a to bez rozdílu mezi jednotlivými vzorky inokulovanými sledovanými kmeny a kontrolním vzorkem (Obr. 27).

U hodnot pH byl zaznamenán nárůst hodnot zejména v období prvních 30 dnů zrání. S další dobou zrání (30. – 90. den) nebyl zaznamenán rostoucí trend a hodnoty se u vzorků inokulovaných dekarboxyláza-pozitivními kmeny pohybovaly v rozmezí 5,3 – 5,4. Mírně nižší hodnoty byly zaznamenány u kontrolních vzorků sýrů, které se pohybovaly v rozmezí 5,2 – 5,3 od 30. dne zrání modelových vzorků sýrů.

Tyto rozdíly ale však nejsou statisticky významné. Zvyšování hodnot pH může být důsledkem rozkladu vzniklé kyseliny mléčné za vzniku dalších produktů. Nezákysové bakterie mléčného kvašení mohou kyselinu mléčnou rozkládat na acetát a oxid uhličitý (McSweeney a Sousa, 2004, s. 294). Nižší hodnoty pH, které jsou důsledkem přeměny laktózy za vzniku kyseliny mléčné mohou představovat nevhodné podmínky pro řadu zákysových bakterií mléčného kvašení.



Obr. 27: Výsledky obsahu sušiny 3. experimentu kontrolních vzorků C a vzorků s přidavkem dekarboxyláza pozitivních bakterií rodu *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* DEPE T3 a DEPE T36 a *Lactobacillus paracasei* DEPE T51 a DEPE T52.



Obr. 28: Výsledky pH vzorků sýrů 3. experimentu kontrolních vzorků C a vzorků s přidavkem dekarboxyláza pozitivních bakterií rodu *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* DEPE T3 a DEPE T36 a *Lactobacillus paracasei* DEPE T51 a DEPE T52.

Ty mohou aktivovat mechanismy vedoucí k potlačení těchto podmínek (Lolkema, Poolman a Konings, 1995, s. 468; Zuljan et al., 2016, s. 64). Kromě rozkladu kyseliny mléčné dochází během proteolýzy ke vzniku alkalických látek, které rovněž svou přítomností mohou přispět ke zvyšování pH (Fox et al., 2000, s. 488).

První den ode dne výroby sýrů byl obsah NaCl $0,21 \pm 0,03$ % (w/w). Od 30. dne se hodnoty NaCl sýrů pohybovaly v rozmezí 1,9 – 2,1 % (w/w) a jejich hodnoty do konce doby zrání zůstaly identické. Nízký obsah NaCl na počátku zrání je z důvodu toho, že analýza byla provedena před samotným solením modelových vzorků sýrů ponořením v solné lázni.

Z naměřených výsledků analýzy základních parametrů sýrů lze usoudit, že přídavek kmenů do jednotlivých modelových vzorků sýrů neměl žádný významný vliv na obsah sušiny, pH a obsah NaCl, neboť nebyly zpozorovány žádné významné rozdíly mezi kontrolními vzorky C a vzorky inokulované kmeny *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* (DEPE T3 a DEPE T36) a kmeny *Lactobacillus paracasei* (DEPE T51 a DEPE T52).

Mikrobiologická analýza

Součástí mikrobiologické analýzy, kromě sledování počtu vybraných skupin mikroorganismů u modelových vzorků sýrů, byly sledovány i provozní zákysy, kterými byly inokulovány jednotlivé výroby. Bylo zjištěno, že počty laktobacilů byly dle očekávání vyšší ve všech zákysích inokulovaných sledovanými nezákazovými bakteriemi ($7,4 \pm 0,8$ log KTJ·ml⁻¹) než u zákysu kontrolních vzorků, který byl inokulován pouze komerční smetanovou kulturou Laktoflora (Milcom, a.s., Česká republika) $6,0 \pm 0,2$ log KTJ·ml⁻¹). Naopak v případě počtu koků byly detekovány vyšší koncentrace u zákysu připraveného pro kontrolní výrobu C ($8,3 \pm 0,3$ log KTJ·ml⁻¹) v porovnání s modelovými vzorky sýrů inokulované sledovanými kmeny ($7,2 \pm 0,2$ log KTJ·ml⁻¹). To je důsledek toho, že komerční smetanová kultura je složená z mikrobiálních druhů *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* a *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* var. *diacetylactis*.

Tabulka 8 obsahuje počty jednotlivých skupin mikroorganismů, které byly sledovány v průběhu 90denního zrání modelových vzorků sýrů.

Během 30 dnů zrání modelových vzorků sýrů nebyly zaznamenány žádné významné rozdíly mezi jednotlivými vzorky u celkových počtů mikroorganismů (zejména mezofilní a fakultativně anaerobní bakterie). Celkové počty se 1. den pohybovaly v rozmezí 6,73 – 7,98 log KTJ·g⁻¹. Od 60 dne byl zpozorován klesající trend, který byl až do 90 dne zrání vzorků sýrů. Konečné hodnoty byly 5,23 – 7,28 log KTJ·g⁻¹, přičemž nejvyšší celkové počty mikroorganismů byly u kontrolních vzorků C. Tento klesající trend byl zaznamenán i v předchozím experimentu a dalšími autory (Combarros-Fuertes et al., 2016, s. 296; Porcellato et al., 2013, s. 105) a může být důsledkem postupného odumírání zákysových bakterií. K poklesu jejich počtů může docházet s rostoucí dobou zrání díky

přeměně laktózy na kyselinu mléčnou a snižování tak okolního pH. Současně může mít na jejich přítomnost vliv i obsah NaCl a jeho difúzi skrz celou hmotu sýra (Fox et al., 2004, s. 473; Kletter, 1977, s. 179-186; McSweeney et al., 2000, s. 299; 2004, s. 139).

V případě počtu mléčných koků byl zaznamenán obdobný trend jako u celkového počtu mikroorganismů. Izolace bakterií mléčného kvašení byla zaměřena na bakterie rodu *Lactococcus*, *Leuconostoc* a *Streptococcus*. Nejvyšší počty byly detekovány u kontrolních vzorků sýrů (1. den $8,63 \pm 0,56 \log \text{KTJ}\cdot\text{g}^{-1}$) a do konce doby zrání sýrů jejich počty klesaly ($5,80 \pm 0,26 \log \text{KTJ}\cdot\text{g}^{-1}$). V případě vzorků inokulovaných dekarboxyláza-pozitivními nezákysovými bakteriemi byly hodnoty srovnatelné a první den se pohybovaly v rozmezí $7,06 - 7,98 \log \text{KTJ}\cdot\text{g}^{-1}$. I v jejich případě docházelo zejména od 60. dne ode dne výroby k pozvolnému poklesu jejich počtů až na hodnoty $6,06 - 6,96 \log \text{KTJ}\cdot\text{g}^{-1}$ a tak na konci doby zrání modelových vzorků sýrů byly vyšší počty mléčných koků u kontrolních vzorků sýrů.

Hodnoty laktobacilů měly zcela odlišný trend vývoje v průběhu zrání oproti dvěma předchozím skupinám. U laktobacilů docházelo k mírnému nárůstu jejich počtů v průběhu zrání sýrů. Rovněž bylo zjištěno, že nižší počty laktobacilů byly u kontrolních vzorků ($5,80 \pm 0,26 \log \text{KTJ}\cdot\text{g}^{-1}$). Porovnáním hodnot laktobacilů mezi jednotlivými vzorky inokulovanými kmeny *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* (DEPE T3 a DEPE T36) a kmeny *Lactobacillus paracasei* (DEPE T51 a DEPE T52) nebyly zjištěny žádné významné rozdíly. 90. den ode dne výroby počty laktobacilů byly $7,49 - 7,89 \log \text{KTJ}\cdot\text{g}^{-1}$.

Počty enterokoků v průběhu zrání kolísaly, avšak na konci doby zrání byly detekovány obdobné hodnoty ($4,57 - 5,72 \log \text{KTJ}\cdot\text{g}^{-1}$) jako počty detekované první den zrání modelových vzorků sýrů ($5,04 - 5,73 \log \text{KTJ}\cdot\text{g}^{-1}$). Současně lze konstatovat, že mezi kontrolními vzorky a vzorky inokulované dekarboxyláza-pozitivními kmeny nebyly žádné významné rozdíly. V případě enterobakterií počty po celou dobu zrání klesaly bez rozdílů mezi všemi analyzovanými vzorky ($2,26 - 3,48 \log \text{KTJ}\cdot\text{g}^{-1}$).

Ačkoli tyto bakterie mohou rovněž patřit mezi producenty biogenních aminů, na základě těchto výsledků lze konstatovat, že jejich přítomnost neměla významný vliv na výsledky obsahu biogenních aminů, neboť mezi kontrolními vzorky a vzorky inokulované sledovanými kmeny byly počty enterokoků a enterobakterií srovnatelné (Adams a Nout, 2001, s. 184; Alewijn, 2006, s. 45; McSweeney, 2004, s. 138).

Tabulka 8 Počty vybraných skupin mikroorganismů v průběh 90 dnů zrání kontrolních vzorků sýrů C, sýrů s přísadkou kmene *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* DEPE T3 a DEPE T36 (T₃ a T₃₆) a *Lactobacillus paracasei* DEPE T51 a T 52 (T₅₁ a T₅₂).

doba zrání [den]	vzorek	počty mikroorganismů vybraných skupin [log KTJ·g ⁻¹]				
		CPM ^{a)}	BMK ^{b)}	laktobacily	enterobakterie	enterokoky
1	C	7,98 ± 0,52	8,63 ± 0,56	5,63 ± 0,34	5,36 ± 0,38	4,36 ± 0,22
	T ₃	7,26 ± 0,42	7,81 ± 0,51	8,51 ± 0,43	5,73 ± 0,41	4,86 ± 0,26
	T ₃₆	6,73 ± 0,43	7,06 ± 0,43	8,44 ± 0,42	5,42 ± 0,35	4,34 ± 0,25
	T ₅₁	7,86 ± 0,31	7,98 ± 0,44	8,25 ± 0,39	5,64 ± 0,29	5,44 ± 0,35
	T ₅₂	7,02 ± 0,38	7,59 ± 0,55	7,94 ± 0,44	5,04 ± 0,22	4,04 ± 0,33
30	C	8,03 ± 0,51	7,79 ± 0,42	6,83 ± 0,40	5,82 ± 0,40	4,06 ± 0,22
	T ₃	7,49 ± 0,43	8,01 ± 0,63	8,10 ± 0,36	5,80 ± 0,19	3,28 ± 0,13
	T ₃₆	6,90 ± 0,39	7,42 ± 0,55	7,81 ± 0,48	4,93 ± 0,36	3,78 ± 0,19
	T ₅₁	7,71 ± 0,54	7,41 ± 0,55	7,97 ± 0,42	5,08 ± 0,34	4,41 ± 0,22
	T ₅₂	7,23 ± 0,53	7,91 ± 0,44	7,96 ± 0,68	5,29 ± 0,35	4,08 ± 0,21

a) celkové počty mikroorganismů (zejména mezofilní a fakultativně anaerobní mikroorganismy)

b) bakterie mléčného kvašení (zahrnující bakterie rodu *Lactococcus*, *Leuconostoc* a *Streptococcus*)

C – kontrolní vzorek inokulovaný kvašením z komerční kultury Laktoflora Milcom a.s., Česká republika

T₃, T₃₆, T₅₁ a T₅₂ – vzorky inokulované kromě komerčního kvašením i sledovanými kmeny *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* DEPE T3 a DEPE T36 a *Lactobacillus paracasei* DEPE T51 a DEPE T52.

Pokračování tabulky 8

doba zráání [den]	vzorek	počty mikroorganizmů vybraných skupin [log KTJ·g ⁻¹]					
		CPM ^{a)}	BMK ^{b)}	laktobacily	enterobakterie	enterokoky	
60	C	7,89 ± 0,44	6,76 ± 0,42	6,24 ± 0,40	5,70 ± 0,40	2,95 ± 0,20	
	T ₃	7,19 ± 0,37	7,86 ± 0,47	8,07 ± 0,29	5,78 ± 0,34	2,78 ± 0,18	
	T ₃₆	5,67 ± 0,34	7,05 ± 0,46	7,52 ± 0,38	4,98 ± 0,38	3,53 ± 0,20	
	T ₅₁	7,28 ± 0,43	6,99 ± 0,50	7,92 ± 0,60	4,80 ± 0,28	3,97 ± 0,25	
	T ₅₂	6,65 ± 0,26	6,33 ± 0,29	7,68 ± 0,53	5,06 ± 0,35	3,61 ± 0,25	
	C	7,28 ± 0,40	5,80 ± 0,26	5,72 ± 0,31	5,48 ± 0,36	2,30 ± 0,08	
90	T ₃	6,86 ± 0,40	6,89 ± 0,51	7,89 ± 0,56	5,72 ± 0,30	2,26 ± 0,14	
	T ₃₆	5,23 ± 0,29	6,96 ± 0,36	7,73 ± 0,34	4,57 ± 0,30	3,02 ± 0,16	
	T ₅₁	7,11 ± 0,50	6,82 ± 0,50	7,49 ± 0,33	4,65 ± 0,20	3,48 ± 0,17	
	T ₅₂	6,23 ± 0,38	6,06 ± 0,30	7,79 ± 0,39	5,15 ± 0,23	3,20 ± 0,21	
	C	7,28 ± 0,40	5,80 ± 0,26	5,72 ± 0,31	5,48 ± 0,36	2,30 ± 0,08	

a) celkové počty mikroorganizmů (zejména mezofilní a fakultativně anaerobní mikroorganizmy)

b) bakterie mléčného kvašení (zahrnující bakterie rodu *Lactococcus*, *Leuconostoc* a *Streptococcus*)

C – kontrolní vzorek inokulován zákysem z komerční kultury Laktoflora Milcom a.s., Česká republika

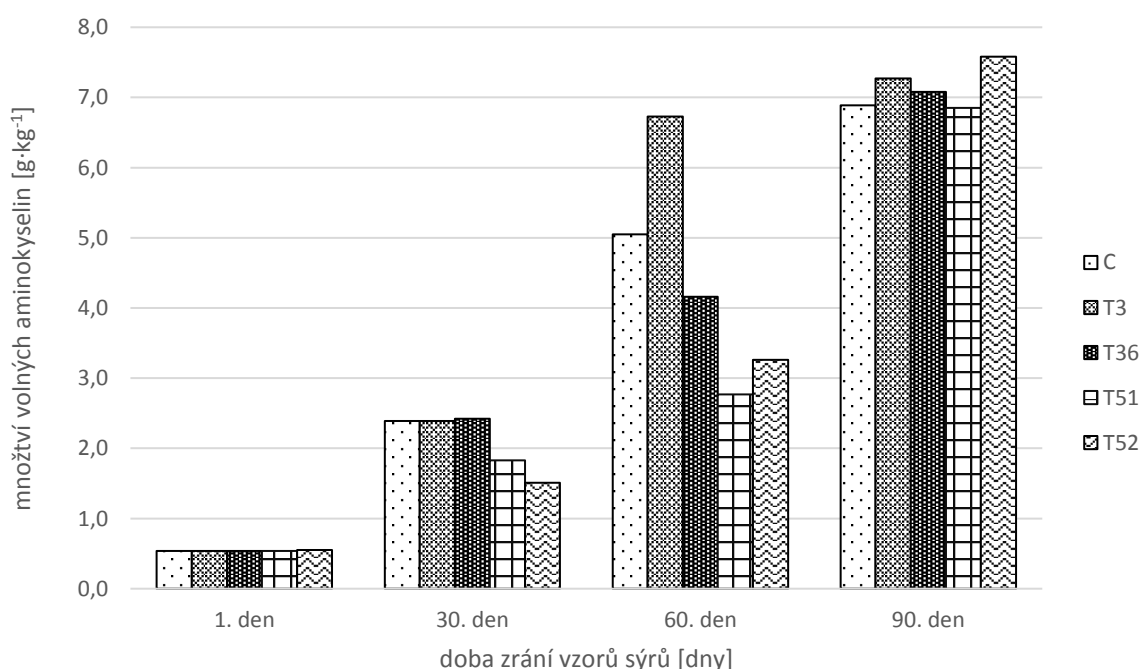
T₃, T₃₆, T₅₁ a T₅₂ – vzorky inokulované kromě komerčním zákysem i sledovanými kmeny *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* DEPE

T₃ a DEPE T₃₆ a *Lactobacillus paracasei* DEPE T₅₁ a DEPE T₅₂.

Námi zpozorovaný klesající trend mléčných koků byl popsán i Fox et al. (2004, s. 547). Na počátku zrání sýrů mohou být mléčné koky dominující mikroflórou, avšak s rostoucí dobou zrání a probíhajícími reakcemi dochází ke snižování jejich počtů (vliv pH, obsah NaCl). Přítomnost nezákysových bakterií u kontrolních vzorků sýrů mohla být důsledkem přenosu z mléka, jež byly tyto sýry vyráběny, nicméně jejich počty byly významně nižší než u vzorků inokulovaných sledovanými kmeny (Fox et al., 2004, s. 473; Kletter, 1977, s. 179-186; McSweeney et al., 2000, s. 299; 2004, s. 139).

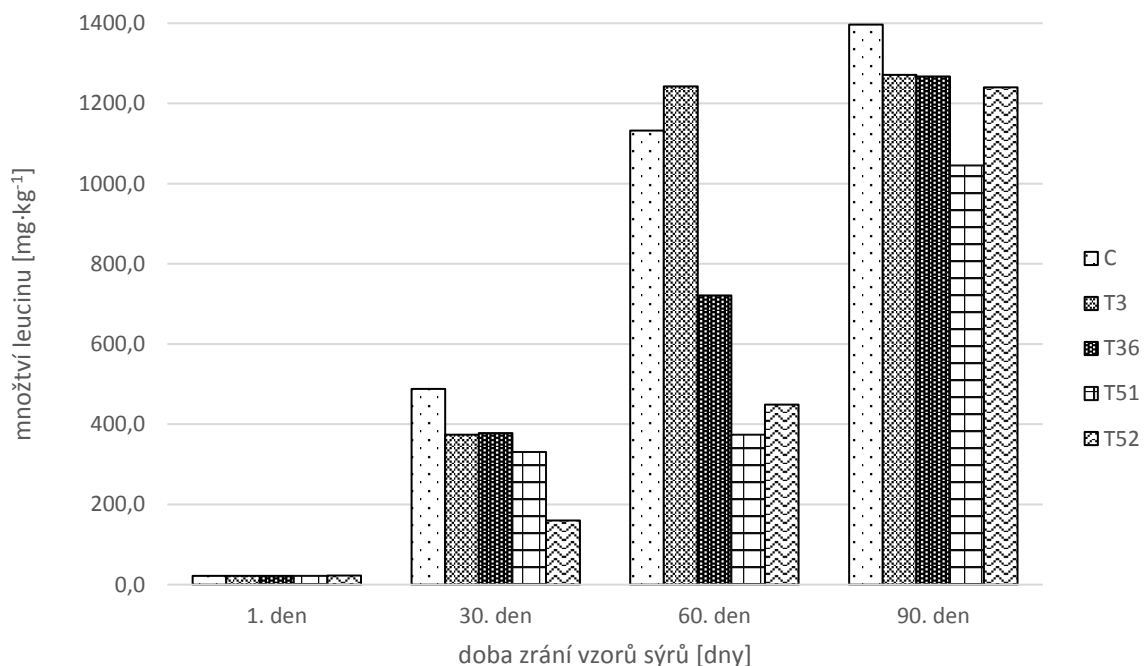
Obsah volných aminokyselin

Celkový obsah aminokyselin a jeho změn v průběhu zrání jednotlivých modelových vzorků sýrů je znázorněn na Obr. 29. V průběhu zrání všech vzorků docházelo k nárůstu celkového obsahu volných aminokyselin důsledkem probíhající proteolýzy. První den zrání sýrů byly celkové obsahy aminokyselin téměř identické bez rozdílu mezi jednotlivými vzorky ($5,45 \pm 0,05 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$). Dalších 30 dnů zrání docházelo k pozvolnému nárůstu hodnot, přičemž u vzorků kontrolních a vzorků inokulovaných kmeny *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* (T₃ a T₃₆) byla úroveň proteolýzy téměř identická ($2,39 - 2,42 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$) a současně vyšší než u dalších dvou sledovaných kmenů *Lactobacillus paracasei* (T₅₁ a T₅₂) ($1,83 \pm 0,09$ a $1,51 \pm 0,08 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$).



Obr. 29: Vývoj celkového obsahu volných aminokyselin 3. experimentu kontrolních vzorků C a vzorků s přidavkem dekarboxyláza pozitivních bakterií rodu *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* DEPE T3 a DEPE T36 a *Lactobacillus paracasei* DEPE T51 a DEPE T52

60. den zrání vzorků byl zaznamenán významný nárůst celkového obsahu volných aminokyselin zejména u vzorků T₃ (inokulovaný kmenem *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* DEPE T3 ($6,73 \pm 0,34 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$), zatímco u ostatních vzorků došlo k významnému nárůstu hodnot od 60. do 90. dne zrání modelových vzorků sýrů. Na konci doby zrání byly nejnižší hodnoty volných aminokyselin detekovány zejména u vzorků kontrolních ($6,89 \pm 0,36 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$) a vzorků inokulovaných kmenem *Lactobacillus paracasei* DEPE T51 ($6,85 \pm 0,34 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$). Nejvyšší úroveň proteolýzy byla zpozorována u vzorků inokulovaných kmenem *Lactobacillus paracasei* DEPE T52 ($7,58 \pm 0,35 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$). Rostoucí trend u všech pozorovaných vzorků se dal předpokládat, v důsledku probíhající proteolýzy, kdy dochází k rozkladu bílkovin právě za vzniku volných aminokyselin (BioCyc Database Collection, 2016; Buňková et al., 2009, s. 534; 2011, s. 113; Fiechter, Sivec a Mayer, 2013, s. 191; Loizzo et al., 2013, s. 39; Pachlová et al., 2016, s. 2; Roginski, Fuquay a McSweeney, 2002, s. 841). Růst obsahu volných aminokyselin byl popsán i Pachlovou et al. (2011, s. 106-108) a Pinho et al. (2001, s. 289). Celkový obsah volných aminokyselin koresponduje s koncentrací leucinu v jednotlivých vzorcích (Obr. 30).

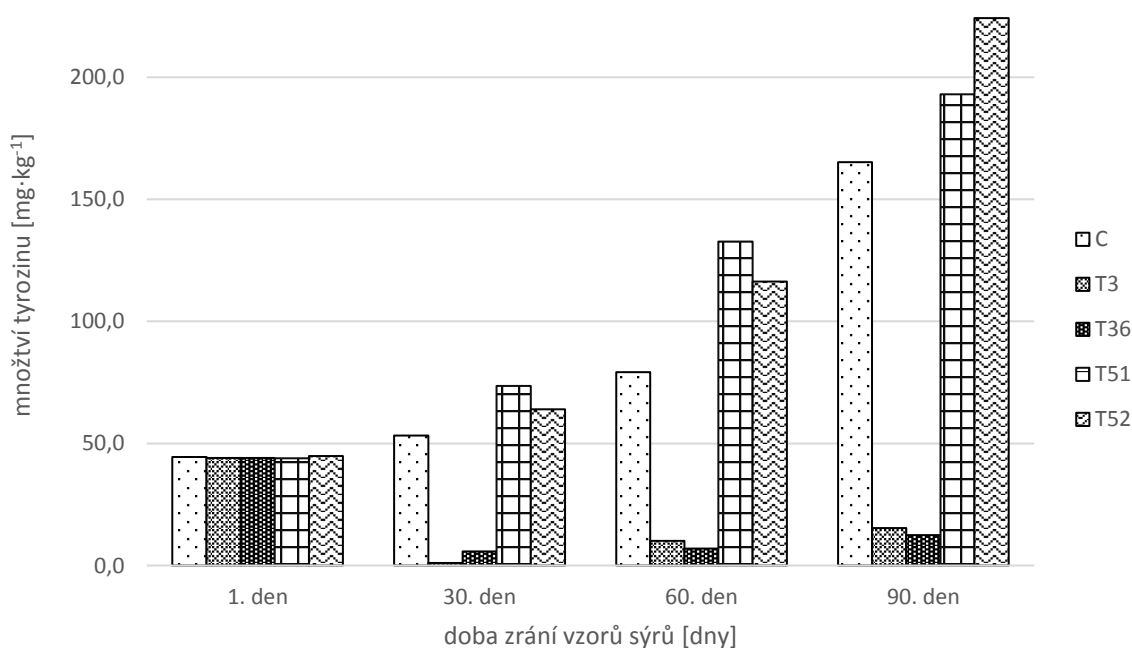


Obr. 30: Vývoj obsahu leucinu v 3. experimentu kontrolních vzorků C a vzorků s přidavkem dekarboxyláza pozitivních bakterií rodu *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* DEPE T3 a DEPE T36 a *Lactobacillus paracasei* DEPE T51 a DEPE T52

Leucin je řadou autorů považován za indikátorovou volnou aminokyselinu, která slouží pro posouzení intenzity proteolýzy během zrání sýrů. Tato úroveň proteolýzy je závislá zejména na proteolytické aktivitě enzymů přítomné mikroflóry. Po proteolýze buněk mohou být proteolytické intracelulární enzymy

uvolněny do prostředí sýra, kde mohou následně hydrolyzovat peptidové vazby (Fenelon a Guinee, 2000, s. 151-154; Sousa, Ardo a McSweeney, 2001, s. 328). Po celou dobu byl u leucinu zaznamenán rostoucí trend ve všech vzorcích. Na počátku zrání sýrů byly hodnoty leucinu bez významných rozdílů mezi jednotlivými vzorky ($22,1 - 22,5 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$). 30. den byl zpozorován nejvyšší nárůst jeho koncentrace u vzorku kontrolního (C), kde hodnoty přesahovaly hranici $400,0 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$. Vzorky inokulované kmeny *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* DEPE T3 a DEPE T36 měly srovnatelné koncentrace leucinu, které se blížily k hranici $400,0 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$. Nicméně u vzorků *Lactobacillus paracasei* DEPE T51 a DEPE T52 nebyla proteolýza prvních 30 dnů tak významná. U vzorku T₅₂ byly koncentrace leucinu 30. den více než 3 x nižší než u kontrolních vzorků ($159,7 \pm 9,2 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$). K dalšímu nárůstu docházelo i po další dobu zrání vzorků, kde konečné hodnoty 90. den přesahovaly hranici $1000,0 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$. Současně byl zpozorován větší nárůst obsahu leucinu u vzorků T₅₂ ($1240,5 \pm 59,6 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) a jeho hodnoty se vyrovnaly vzorkům T₃ ($1271,0 \pm 65,3 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) a T₃₆ ($1267,3 \pm 61,8 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$). Nejvyšší koncentrace leucinu na konci doby zrání byly detekovány u kontrolních vzorků sýrů ($1396,4 \pm 63,9 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$).

Významnou aminokyselinou z hlediska její možné dekarboxylace za vzniku biogenního aminu tyrozinu je tyrozin (Obr. 31).



Obr. 31: Vývoj obsahu tyrozinu v 3. experimentu kontrolních vzorků C a vzorků s přidávkou dekarboxyláza pozitivních bakterií rodu *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* DEPE T3 a DEPE T36 a *Lactobacillus paracasei* DEPE T51 a DEPE T52

Obsah tyrozinu na počátku zrání všech vzorků byl v rozmezí 43,9 – 44,8 mg·kg⁻¹. U tří vzorků (C, T₅₁ a T₅₂) byl po celou dobu zrání modelových vzorků sýrů byl zaznamenán rostoucí trend jeho koncentrace. Na konci doby zrání sýrů se hodnoty u těchto vzorků pohybovaly v rozmezí 165,2 – 224,3 mg·kg⁻¹. U vzorků inokulovaných kmeny *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* DEPE T3 a DEPE T36 byl 30. den zaznamenán významný pokles koncentrace tyrozinu (1,1 ± 0,1 mg·kg⁻¹ pro T₃ a 5,7 ± 0,7 mg·kg⁻¹ pro T₃₆). Do konce doby zrání u těchto vzorků v případě tyrozinu došlo k velmi malému nárůstu jeho koncentrace (12,4 – 15,3 mg·kg⁻¹). Tyto koncentrace byly ve srovnání s ostatními třemi vzorky více než desetinásobně nižší. Volná aminokyselina tyrozin může být díky biochemickým procesům v přítomnosti tyramin-pozitivního kmene dekarboxylována za vzniku biogenního aminu tyraminu (Fiechter, Sivec a Mayer, 2013, s. 191; Ladero et al., 2012, s. 310).

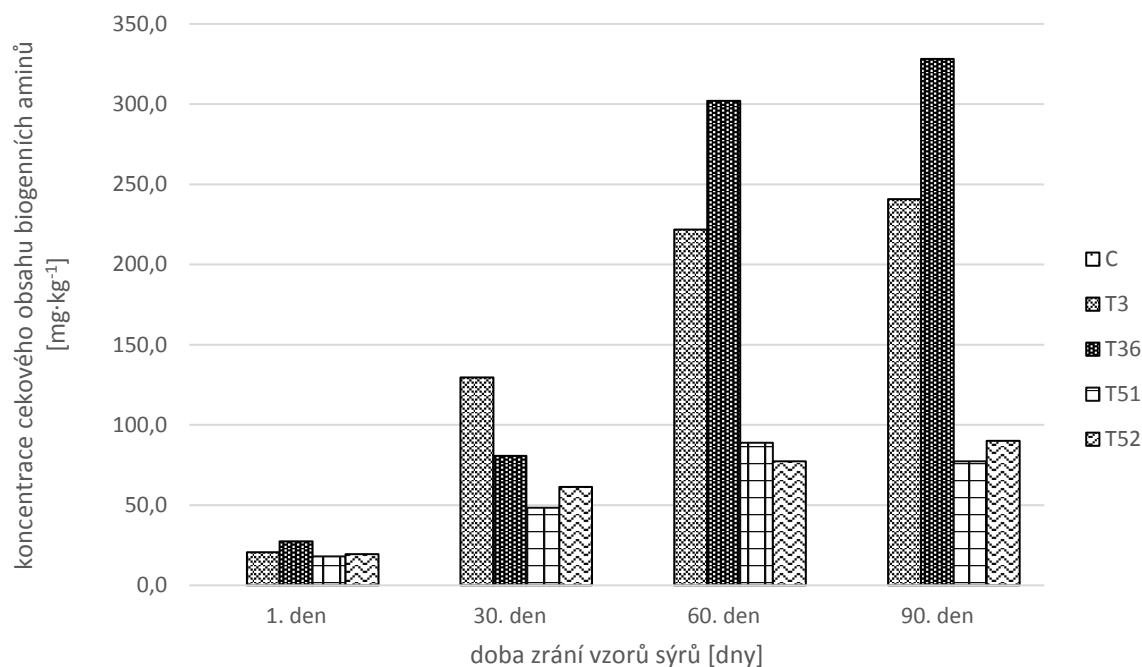
Obsah biogenních aminů

Obsah biogenních aminů byl sledován nejen ve vzorcích po 90denní skladování při teplotě 10 ± 1 °C, ale i u provozních zákysů, jež byly inokulovány příslušnými kmeny. Mléko před prokysáním, které bylo inokulováno komerční zákysovou kulturou obsahovalo pouze 2,5 ± mg·l⁻¹. Provozní zákysy, které byly přidány v průběhu výroby jednotlivých modelových vzorků sýrů, inokulované sledovanými kmeny obsahovaly biogenní aminy ve výši 99,68 ± 3,9 mg·l⁻¹ (pro výrobu vzorků T₃), 86,2 ± 3,3 mg·l⁻¹ (pro výrobu vzorků T₃₆), 14,66 ± 0,6 mg·l⁻¹ (pro výrobu vzorků T₅₁) a 14,97 ± 0,7 mg·l⁻¹ (pro výrobu vzorků T₅₂). Z těchto výsledků lze usuzovat, že vyšší dekarboxyláza-pozitivní aktivitu vykazovaly kmeny *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* DEPE T3 a DEPE T36, protože hodnoty biogenních aminů v jimi inokulovaných zákysích byly až 6 x vyšší než v zákysích inokulované kmeny *Lactobacillus paracasei* DEPE T51 a DEPE T52.

Obr. 32 znázorňuje vývoj celkového obsahu biogenních aminů v průběhu zrání všech modelových vzorků sýrů. U kontrolních vzorků C, které byly připraveny ze zákysu inokulovaného komerční zákysovou kulturou Laktoflora (Milcom, a.s., Česká republika), nebyly po celou dobu zrání sýrů detekovány žádné obsahy biogenních aminů.

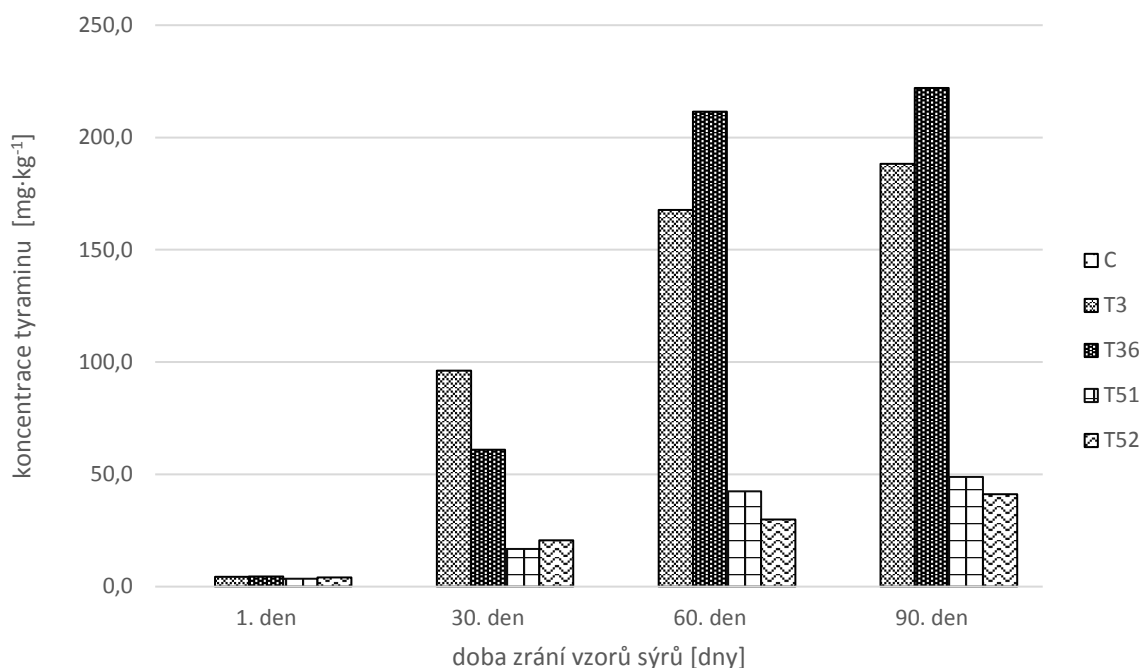
U ostatních sledovaných vzorků byl celkový obsah biogenních aminů srovnatelný bez významných rozdílů (18,1 – 27,4 mg·kg⁻¹). U všech vzorků inokulovaných nezákysovými dekarboxyláza-pozitivními kmeny byl zpozorován rostoucí trend celkového obsahu biogenních aminů. Nicméně od 30. dne byly sledovány významné rozdíly v koncentraci biogenních aminů zejména mezi kmeny *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* a kmeny *Lactobacillus paracasei*. U vzorků kmeny *Lactobacillus paracasei* DEPE T51 a DEPE T52 byly konečné koncentrace srovnatelné bez významných rozdílů (90,1 – 94,4 mg·kg⁻¹). Zatímco u vzorků inokulovaných kmeny *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* DEPE T3 a DEPE T36 byly koncentrace biogenních aminů až 3,5

x vyšší. Rovněž bylo zpozorováno, že v porovnání mezi těmito kmeny nejvyšší dekarboxylázová aktivita byla prokázána u vzorků inokulovaných kmenem *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* DEPE T36, kde hodnoty biogenních aminů jako u jediného ze všech vzorků překračovaly hranici $300,0 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$.



Obr. 32: Vývoj celkového obsahu biogenních aminů v 3. experimentu kontrolních vzorků C a vzorků s přidavkem dekarboxyláza pozitivních bakterií rodu *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* DEPE T3 a DEPE T36 a *Lactobacillus paracasei* DEPE T51 a DEPE T52

Stejně jako u celkového obsahu biogenních aminů i v případě sledování obsahu tyraminu byly u kontrolních vzorků nulové koncentrace (Obr. 33). U 4 sledovaných kmenů byly počáteční koncentrace tyraminu nízké ($3,5 - 4,5 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) bez významných rozdílů mezi jednotlivými vzorky. Obdobný trend jako byl zaznamenán u celkového obsahu biogenních aminů byl zaznamenán i u koncentrací tyraminu. V prvních 30 dnech došlo k významnému nárůstu koncentrace tyraminu zejména u vzorků inokulovaných kmeny *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* DEPE T3 a DEPE T36. S další dobou zrání došlo k největšímu růstu obsahu tyraminu zejména v případě vzorků T₃₆, kde konečné koncentrace dosáhly hodnoty $222,1 \pm 10,8 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$. Značná tyramin-pozitivní dekarboxylázová aktivita byla zaznamenána i u druhého kmene *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* (DEPE T3), protože jeho hodnoty byly $188,2 \pm 10,6 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$. Významně nižšího obsahu tyraminu bylo dosaženo u vzorků inokulovaných kmeny *Lactobacillus paracasei* DEPE T51 a DEPE T52, neboť hodnoty tyraminu 90. den nepřesáhly hranici $50,0 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$.



Obr. 33: Vývoj obsahu biogenního aminu tyraminu v 3. experimentu kontrolních vzorků C a vzorků s přidavkem dekarboxyláza pozitivních bakterií rodu *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* DEPE T3 a DEPE T36 a *Lactobacillus paracasei* DEPE T51 a DEPE T52

Z naměřených dat biogenních aminů lze usoudit, že kmen *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* vykazuje značně vyšší tyramin-pozitivní dekarboxylázovou aktivitu než kmen *Lactobacillus paracasei*. Současně lze konstatovat, že tyramin-pozitivní dekarboxylázová aktivita ve srovnání kmenů *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* DEPE T3 a DEPE T36 je vyšší u *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* DEPE T36, zatímco dekarboxylázová aktivita mezi kmeny *Lactobacillus paracasei* DEPE T51 a DEPE T52 je srovnatelná. Konzumace potravin s tak vysokým obsahem tyraminu (zejména v případě prvních dvou kmenů) může negativně ovlivňovat konzumentovo zdraví. Výrazně více by tak mohli být ohroženi zejména lidé se sníženou aktivitou detoxifikačních mechanismů nebo ty, kteří konzumují inhibitory aminooxidáz (Anonym 2011, s. 19; Halász et al., 1994, s. 43; Önal, 2007, s. 1475; Santos, 1996, s. 214; Ten Brink et al., 1990, s. 75).

5. SOUHRNNÁ DISKUZE

Experimentální část této dizertační práce se zabývala sledováním dekarboxylázové aktivity u vybraných kmenů zákysových a nezákysových bakterií v reálném systému modelových vzorků přírodních sýrů. Sýry byly podrobeny chromatografické analýze pro detekci 8 biogenních aminů (tryptamin, fenylethylamin, putrescin, kadaverin, histamin, tyramin, spermidin, spermin) pro kvantifikaci a vývoj jejich koncentrace v průběhu 90denního zrání. Mikroorganismy s pozitivní dekarboxylázovou aktivitou, které byly vybrány pro inokulaci modelových vzorků sýrů, byly vybrány na základě dřívějších studií produkce biogenních aminů za optimálních podmínek v dekarboxylačním médiu.

Posouzení dekarboxylázové aktivity vybraných kmenů inokulovaných v dekarboxylačním médiu bylo součástí 1. experimentu. Z rozsáhlých výsledků bylo zjištěno, že téměř žádný z izolovaných kmenů neprokazoval spermidin-pozitivní dekarboxylázovou aktivitu, neboť koncentrace tohoto biogenního aminu byla nalezena pouze u 4 ze 79 sledovaných kmenů. Obdobných výsledků bylo dosaženo i v případě schopnosti dekarboxylace histidinu za vzniku biogenního aminu histaminu. Pouze u kmene 5.B.2, identifikován jako *Leuconostoc mesenteroides* byla zaznamenána významná histamin-pozitivní dekarboxylázová aktivita. Schopnost produkovat histamin pomocí tohoto druhu popsalo ve svých studiích řada autorů (Hsu et al., 2009, s. 933; Kim et al., 2003, s. 452; Tsai et al., 2005, s. 462). Hsu et al. (2009, s. 933) posuzoval histamin-pozitivní dekarboxylázovou aktivitu u toho kmene, jenž byl izolován ze sušených vzorků ryby *Chanos stříbřitý*.

Významných výsledků z hlediska pozitivní dekarboxylázové aktivity bylo dosaženo vzhledem ke schopnosti produkovat biogenní amin putrescin a kadaverin. 1 izolovaný kmen (identifikovaný jako *Bacillus licheniformis*) prokázal významně kadaverin-pozitivní dekarboxylázovou aktivitu, neboť koncentrace kadaverinu v dekarboxylačním médiu dosahovala hodnot, které by mohly mít vliv na lidský organizmus v případě konzumace takových potravin (Gasarasi et al., 2001, s. 51-53; Karovičová a Kohajdová, 2005).

Přítomnost putrescinu v potravinách by samo o sobě nemělo žádný významný negativní vliv na lidský organizmus. Největším rizikem konzumace vyšších dávek putrescinu ve stravě je fakt, že dokáže zesilovat negativní účinky dalších biogenních aminů, a to histaminu a tyraminu. U 17 kmenů byla zpozorována vyšší putrescin-pozitivní dekarboxylázová aktivita. Tyto kmeny byly identifikovány například jako *Bacillus licheniformis*, *Pseudomonas jessenii*, *Acinetobacter johnsonii*, *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus plantarum*, *Enterobacter cloacae*, *Lactobacillus paracasei* a *Lactococcus lactis*. V případě bakterií rodu *Lactococcus lactis* byla pozitivní dekarboxylázová aktivita pro vznik putrescinu popsána i v jiných studiích (Fiechter, Sivec a Mayer, 2013, s. 191; Innocente et al., 2007, s. 1285; Santos et al. 2003, s. 597-606). Obdobné výsledky byly dosaženy i ve 2. experimentu, kde u vzorků inokulovaných kmenem *Lactococcus*

lactis subsp. *cremoris* došlo k produkci putrescinu v komplexních podmínkách modelových vzorků sýrů.

Nejčastěji produkovaných biogenním aminem a v nejvyšších koncentracích byl tyramin. Celých 60 % ze všech 79 izolovaných kmenů produkovalo tyramin v koncentracích vyšších než 200,0 mg·l⁻¹. U některých izolátů byla dokonce detekována koncentrace tyraminu vyšší než 1000,0 mg·l⁻¹. Tyramin je spolu s histamin svými účinky jeden z nejvíce problematičtějších, neboť konzumace vysokých koncentrací tyraminu může mít značné negativní účinky na lidský organizmus (Anonym 2011, s. 19; Halász et al., 1994, s. 43; Önal, 2007, s. 1475; Santos, 1996, s. 214; Ten Brink et al., 1990, s. 75). Významná tyramin-pozitivní dekarboxylázová aktivita byla detekována například u *Enterococcus faecalis*, *Serratia fonticola*, *Bacillus licheniformis*, *Pseudomonas jessenii*, ale také u bakterií rodu *Lactococcus* spp. Shodných výsledků bylo dosaženo i v následujícím experimentu. Bylo zjištěno, že ve vzorcích s přidavkem *Lactococcus* spp. docházelo k významné produkci biogenního aminu tyraminu. Dekarboxylázovou aktivitou těchto bakterií v podmínkách *in vitro*, tedy stejně jako v našem 1. experimentu (dekarboxylační médium představující optimální podmínky pro růst daných mikroorganismů, se zabývala ve své studii Buňková et al. (2009, s. 537; 2010, s. 884). Výsledkem experimentů Buňková et al. (2009, s. 537; 2010, s. 884) bylo potvrzení, že u kmenů *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* byla potvrzena značná tyramin-pozitivní dekarboxylázová aktivita, což se potvrdilo i našimi výsledky v 1. experimentu (Buňková et al., 2009, s. 536; Ladero et al., 2012, s. 310).

Z výsledků sledování dekarboxylázové aktivity ve 2. experimentu plyne, že testované kmeny *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 824 a *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 946 produkovaly ve významných koncentracích biogenní aminy tyramin a putrescin, čímž potvrdily předpokládanou tyramin-pozitivní dekarboxylázovou aktivitu. Ta byla již dříve popsány ve studii Buňkové et al. (2009, s. 535; 2010, s. 884; 2011, s. 115). V těchto publikacích byla prokázána tyramin-pozitivní dekarboxylázová aktivita v dekarboxylačním médiu, které představuje optimální podmínky, které vybraný kmen vyžaduje. Buňková et al. (2009, s. 536) avšak uvádí vyšší schopnost dekarboxylovat tyrozin za současného vzniku tyraminu kmenem *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 824. Nicméně na základě výsledků stanovení obsahu biogenního aminu tyraminu v prostředí komplexního systému sýra byl upozorován opačný jev, a to že vyšší tyramin-pozitivní dekarboxylázovou aktivitu v porovnání kmenů *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 824 a CCDM 946 projevil kmen *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 946. To koresponduje i s výsledky stanovení obsahu tyrozinu, prekurzor vzniku tyraminu. Nižší hodnoty tyrozinu byly detekovány právě u kmene *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 946. Nižší detekované hodnoty tyrozinu u vzorků B₉₄₆ mohou být důsledkem vyšší tyramin-pozitivní dekarboxylázové aktivity a schopnosti tak dekarboxylovat tyrozin za vzniku tyraminu ve vyšší míře než druhý sledovaný

kmen *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 824. Vyšší produkce biogenního aminu tyraminu může být i důsledkem přítomnosti vyššího počtu mléčných koků u vzorků B₉₄₆. Vyšší počty bakterií mléčného kvašení byly zpočátku shodné mezi jednotlivými vzorky, ale od 30. dne ode dne výroby sýrů se začaly počty mléčných koků více zvyšovat u vzorků B₉₄₆.

Zpozorovaná putrescin-dekarboxylázová aktivita v modelových vzorcích sýrů přírodního typu, které byly inokulovány kmeny *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 824 a *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 946 byla v souladu s výsledky, které publikoval Santos et al. (2003, s. 597-606). Ten ve své studii publikoval schopnost produkce putrescinu působením poddruhu *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*. V našem experimentu byly detekovány koncentrace putrescinu, které na konci doby zrání modelových vzorků sýrů překračovaly hranici 800 mg·kg⁻¹. V souladu s těmito detekovanými vysokými koncentracemi putrescinu korespondují i koncentrace volných aminokyselin argininu a ornitinu, protože jejich hodnoty byly výrazně nižší než u vzorků B₈₂₄ a B₉₄₆ v porovnání s koncentracemi získaných ze vzorků kontrolních sýrů. Tyto nízké detekované koncentrace argininu a ornitinu mohly být důsledkem působením dekarboxyláza-pozitivních kmenů, díky nimž k dekarboxylaci ornitinu a argininu za vzniku právě tak významných koncentrací putrescinu. Současně byla během tohoto experimentu prokázána vyšší putrescin-pozitivní dekarboxylázová aktivita u kmene *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 824.

Vznik vysokých koncentrací putrescinu u vzorků inokulovaných sledovaným kmenem by mohly být rovněž i důsledkem přítomnosti vyššího počtu mléčných koků u obou vzorků v porovnání s kontrolními vzorky A (Fiechter, Sivec a Mayer, 2013, s. 191; Innocente et al., 2007, s. 1285).

Buňková et al. (2009, s. 537; 2010, s. 884) ve svých dřívějších publikacích popsala značnou tyramin-pozitivní dekarboxylázovou aktivitu u námi sledovaných kmenů v podmínkách *in vitro*. Tyto podmínky představují optimální prostředí (zpravidla dekarboxylační médium) pro optimální růst sledovaného kmene. Současně však uvedla, že putrescin byl v těchto optimálních podmínkách tvořen v nevýznamných koncentracích, a tudíž putrescin-pozitivní dekarboxylázová aktivita sledovaných kmenů byla považována za velmi nízkou. Nicméně v komplexním prostředí vzorků sýrů z našich výsledků vyplynulo, že oba sledované kmeny mají značnou putrescin-pozitivní dekarboxylázovou aktivitu, protože docházelo k tvorbě vysokých koncentrací putrescinu. A tyto hodnoty byly naměřeny jak u kmene *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 824, tak i kmene *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 946. K odlišným výsledkům mezi publikací a naším experimentem mohlo dojít díky rozdílné schopnosti dekarboxylovat příslušné volné aminokyseliny za vzniku daného biogenního aminu v sýrech oproti dekarboxylační aktivitě *in vitro* (v kultivačním médiu). Z tohoto důvodu je nutné kmeny testovat nejen v optimálních podmínkách kultivačních médií, ale především i v komplexních systémech potravin, kde schopnost produkce biogenních aminů může být značně rozdílná

(Buňková et al., 2009, s. 537; 2010, s. 882; McSweeney, 2004, s. 129-135; Křížek et al., 2014, s. 466-467; Ten Brink et al., 1990, s. 74; Linares et al., 2012, s. 2-3; Shalaby, 1996, s. 676).

Dekarboxyláza-pozitivní aktivita byla zpozorována i u všech sledovaných kmenů nezákysových bakterií, které byly zvoleny v rámci 3. experimentu (*Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* DEPE T3 a DEPE T36, *Lactobacillus paracasei* DEPE T51 a DEPE T52). V průběhu 90denního zrání modelových vzorků sýrů při teplotě 10 ± 1 °C byly produkovány biogenní aminy u všech vzorků inokulovaných nezákysovémi bakteriemi, zatímco u vzorků kontrolních biogenní aminy nebyly detekovány vůbec. Současně bylo zpozorováno, že k významnější produkci biogenních aminů docházelo u vzorků inokulovaných kmeny *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus*, zejména pak u kmenu *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* DEPE T36. Tento fakt koreluje i s výsledky koncentrace biogenního aminu tyraminu, kde nejvyšší koncentrace byly neměřeny u vzorků inokulovaných kmenem *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* DEPE T36. Koncentrace biogenního aminu tyraminu tak tvořila až 66 % z celkové koncentrace všech 8 sledovaných biogenních aminů. Mikrobiologickou analýzou bylo zjištěno, že docházelo k poklesu počtů zákysových bakterií, zatímco počty nezákysových bakterií se s rostoucí dobou zrání sýrů zvyšovaly. Tento trend je shodný i s tvrzením, které uvedl ve své knize Roginski et al. (2002, s. 640). Hodnoty počtu mléčných koků klesají vlivem okolních podmínek (zejména pH a koncentrace NaCl), zatímco nezákysové bakterie jsou vůči těmto okolním podmínkám odolnější, a naopak může docházet k jejich růstu během zrání. Tento jev byl zpozorován i v našem experimentu. Zatímco počty mléčných koků klesaly, počty nezákysových bakterií (laktobacilů) rostly zejména v prvních 30 dnech zrání sýrů. Vzhledem k tomu, že počty laktobacilů byly u vzorků inokulovaných sledovanými kmeny téměř identické, lze z toho konstatovat, že za přítomnosti stejného počtu laktobacilů došlo k významnější produkci biogenního aminu u kmenů *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* DEPE T3 a DEPE T36. To potvrzují i výsledky obsahu volné aminokyseliny tyrozinu. Zatímco u kontrolních vzorků A a vzorků inokulovaných kmeny *Lactobacillus paracasei* DEPE T51 a DEPE T52 docházelo k nárůstu hodnot tyrozinu po celou dobu zrání vzorků, u vzorků sýrů inokulovaných kmeny *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* DEPE T3 a DEPE T36 došlo k významnému poklesu hodnot tyrozinu již 30. den zrání sýrů. A do konce doby zrání modelových vzorků sýrů byly koncentrace tyrozinu v tomto případě velmi nízké (více než desetinásobně). To může být důsledkem toho, že díky vysoké tyramin-pozitivní dekarboxylázové aktivitě u vzorků T₃ a T₃₆ docházelo ke značné dekarboxylaci aminokyseliny tyrozinu za vzniku biogenního aminu tyraminu. Na pozitivní tyramin-pozitivní dekarboxylázovou aktivitu poukázal ve své studii Bover Sid et al. (2008, s. 271), která potvrdila pozitivní dekarboxylázovou aktivitu u *Lactobacillus curvatus* CTC273. pozitivní dekarboxylázová aktivita je uváděna v publikaci Pereira, Barreto-Crespo a San Romãno (2001, s. 211).

6. PŘÍNOS PRÁCE PRO VĚDU A PRAXI

Z provedené literární rešerše, a především ze získaných výsledků, lze vysledovat následující přínosy pro vědní obor:

- byla stanovena dekarboxylázová aktivita početných kmenů, které se v různých fázích výroby a skladování nachází v tvarozích, což je informace, která nebyla v literatuře dostupná;
- byl popsán vývoj obsahu biogenních aminů dekarboxyláza pozitivními kmeny vybraných zákysových a nezákysových bakterií mléčného kvašení v reálných podmínkách přírodních sýrů;
- bylo zjištěno, že některé zákysové bakterie (*Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 824 a *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 946) významným způsobem produkují biogenní aminy ve zrajících přírodních sýrech;
- bylo zjištěno, že rovněž vybrané nezákysové bakterie mléčného kvašení (*Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* DEPE T3, *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* DEPE T36, *Lactobacillus paracasei* DEPE T51 a *Lactobacillus paracasei* DEPE T52) významnou měrou přispívají k výskytu biogenních aminů v reálných systémech přírodních sýrů;
- v reálném komplexním systému přírodních sýrů byl srovnán vývoj obsahu biogenních aminů výše uvedenými zákysovými i nezákysovými bakteriemi mléčného kvašení.

Z provedené literární rešerše, a především ze získaných výsledků, lze vysledovat následující přínosy pro praxi:

- v tvarozích samotných se sice nacházely malé koncentrace biogenních aminů, ale přítomná mikroflóra má velký potenciál produkovat biogenní aminy. Toto je zásadní pro zdravotní nezávadnost produktů, kam se tvaroh využívá jako surovina, a evokuje to potřebu preventivně sledovat tyto procesy v praxi;
- bylo zjištěno, že v praxi využívané zákysové kultury mohou významně produkovat biogenní aminy. Tímto zjištěním lze opět podpořit potřebu aktivního sledování dekarboxylázové aktivity mikroorganismů, které se do potravin z technologických důvodů přidávají;
- výrobním podnikům lze rovněž doporučit, aby sledovaly obsahy biogenních aminů ve svých produktech;
- zachycené kmeny nezákysových bakterií (pokud podniky taková sledování provádí) by měly být mimo jiné vyšetřovány na dekarboxylázovou aktivitu, aby mohl být odhadnut jejich příspěvek k obsahu biogenních aminů konkrétního výrobku u konkrétního producenta.

7. ZÁVĚR

Přírodní sýry patří mezi fermentované potraviny, které mohou zrát od několika dnů po několik měsíců, v některých případech i let. Sýry představují komplexní systém, v němž díky zrání dochází k řadě biochemickým reakcím. V průběhu těchto reakcí dochází k formování finální textury sýrů, které je pro danou skupinu typická. Při složitých biochemických reakcích dochází ke vzniku velkého množství sensoricky aktivních látek, které se následně podílejí na finální chuti a vůni sýra. Tyto biochemické reakce jsou důsledkem přítomnosti zákysových a nezákysových mikroorganismů v sýrech. Zákysové bakterie jsou ty, které se přidávají v průběhu technologie výroby sýrů, zatímco nezákysové bakterie se do sýrů dostaly v průběhu technologického procesu, ale významnou měrou se podílí na biochemických procesech v průběhu zrání sýrů a na charakteristických vlastnostech daného sýra. U těchto bakterií (ať už zákysových nebo nezákysových) může být ve vyšší míře pozorovaná pozitivní dekarboxylázová aktivita a ve finálních výrobcích, sýrech, může být kumulován vysoký obsah biogenních aminů. Značné koncentrace biogenních aminů mohou být nositelem rizika vzniku otrav a nežádoucích vlivů na lidský organizmus.

Na základě výsledků experimentální části této dizertační práce lze učinit následující závěry:

- tvarohy (v jednotlivých fázích výroby i u finálních produktů) vytváří prostředí pro výskyt dekarboxyláza pozitivních mikroorganismů;
- nejvíce produkovaným biogenním aminem u kmenů izolovaných ze vzorků tvarohů byl tyramin. K jeho produkci docházelo u 42 % všech izolovaných kmenů;
- tyramin-pozitivní dekarboxylázová aktivita v podmínkách *in vitro* byla zpozorována u kmenů *Enterococcus faecalis*, *Serratia fonticola*, *Bacillus licheniformis*, *Pseudomonas jessenii*, ale také u bakterií rodu *Lactococcus*;
- u 19 kmenů z celkem 79 izolovaných (v rámci jednotlivých fází výrobního procesu i u finálních produktů) byla zjištěna také značná produkce putrescinu a kadaverinu. K významným producentům výše uvedených biogenních aminů patří například kmeny *Bacillus licheniformis*, *Pseudomonas jessenii*, *Acinetobacter johnsonii*, *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus plantarum*, *Enterobacter cloacae*, *Lactobacillus paracasei* a *Lactococcus lactis*);
- na základě předchozích studií bylo selektováno 6 kmenů (*Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 824 a *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 946, *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* DEPE T3 a DEPE T36, *Lactobacillus paracasei* DEPE T51 a DEPE T52) zákysových i nezákysových bakterií mléčného kvašení, které jsou dekarboxyláza pozitivní. S těmito kmeny byly realizovány výroby modelových vzorků přírodních sýrů holandského typu;

- v kontrolních vzorcích (bez přídavku dekarboxyláza pozitivních mikroorganismů) byly detekovány v průběhu 90denního zrání při teplotě 10 ± 1 °C zanedbatelná množství biogenních aminů;
- v modelových vzorcích přírodních sýrů holandského typu dekarboxylovaly kyselobakterie mléčného kvašení (konkrétně dekarboxyláza pozitivní kmeny *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 824 a *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 946) volné aminokyseliny za vzniku významných koncentrací biogenních aminů (zejména tyramin a putrescin), a to v průběhu 90denního zrání při teplotě 10 ± 1 °C;
- byla prokázána vyšší tyramin-dekarboxylázová aktivita u *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 946 než u kmene *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 824 za stejných podmínek;
- rovněž sledované nezákysové bakterie mléčného kvašení (konkrétně dekarboxyláza pozitivní kmeny *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* DEPE T3 a DEPE T36, *Lactobacillus paracasei* DEPE T51 a DEPE T52) produkovaly v reálných vzorcích přírodních sýrů významná množství biogenních aminů v průběhu 90denního zrání při teplotě 10 ± 1 °C;
- nezákysové bakterie mléčného kvašení (vybrané dekarboxyláza pozitivní kmeny *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* DEPE T3 a DEPE T36, *Lactobacillus paracasei* DEPE T51 a DEPE T52) dekarboxylovaly volné aminokyseliny za vzniku významně vysokých koncentrací biogenních aminů v průběhu celého 90denního zrání sýrů (dekarboxylace především tyraminu);
- vyšší tyramin-dekarboxylázová aktivita za stejných podmínek byla prokázána u dvou bakterií rodu *Lactobacillus paracasei* DEPE T51 a DEPE T52 než u bakterií rodu *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* DEPE T3 a DEPE T36.

Z výše uvedeného plyne jednoznačný význam sledování obsahu biogenních aminů v přírodních sýrech i u bakterií, které se do sýrů přidávají prostřednictvím čistých mlékařských kultur. Zjištění obsahů biogenních aminů u konkrétního výrobce a identifikace původce pak může přispět k redukci těchto látek ve finálních produktech a v konečném důsledku ke zvýšení bezpečnosti přírodních sýrů.

8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

ADAMS, Martin a Robert NOUT, 2001. *Fermentation and food safety*, Gaithersburg: Aspen Publishers, 290 s., ISBN 0-8342-1843-7.

AGRESTI, Alan, 1984. *Analysis of ordinal categorical data*, New York: John Wiley & Sons, 287 s., ISBN 978-0470082898.

ALEWIJN, Martin, 2006. *The Formation of Fat-derived Flavour Compounds during the Ripening of Gouda-type Cheese*, Wageningen: Wageningen University, 136 s. ISBN 90-8504-381-6.

ANCÍN-AZPILICUETA, Carmen, Ana GONZÁLES-MARCO a Nerea JIMÉNEZ-MORENO, 2008. Current knowledge about the presence of amines in wine. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 48 (3), s. 257-275. ISSN: 0975-8402.

ANONYM, 2011. Scientific Opinion on risk based control of biogenic amine formation in fermented foods. *EFSA Journal*. 9 (10) 1-93. ISSN 1831 – 4732.

BÁČOVÁ, Petra. *Spotřeba potravin roste*. In: Český statistický úřad. [online] 8. prosinec 2016, [cit. 29. březem 2018]. Dostupné z: <https://www.czso.cz/csu/czso/spotreba-potravin-roste>

BERTOLA, Nora, Alicia CALIFANO, Alicia BEVILACQUA a Noemi ZARITZKY, 2000. Effects of ripening conditions on the texture of Gouda cheese. *International Journal of Food Science and Technology*. 35 (2), 207-214. ISSN 1365-2621.

BioCyc Database Collection: *The Pathway Tools Software* [online], In: BioCyc. Poslední aktualizace 2016 [cit. 1. dubna 2018]. Dostupné z <http://biocyc.org>.

BOVER CID, Sara, M. Jesús MIGUÉLEZ-ARRIZADO, Biserka BECKER, Wilhelm H. HOLZAPPEL a M. Carmen VIDAL-CAROU, 2008. Amino acid decarboxylation by *Lactobacillus curvatus* CTC273 affected by the pH and glucose availability. *Food Microbiology*, 25 (2), 269-277. ISSN: 0740-0020.

BROWN, Ritchie E., David R. STEVENS a Helmut L. HAAS, 2001. The physiology of brain histamine. *Progress in Neurobiology*, 63 (6). 637 – 672- ISSN: 0301-0082.

BUŇKA František, Vendula PACHLOVÁ a Lenka NENUŤILOVÁ, 2013a. Texture properties of Dutch-Type cheese as a function of its location and ripening. *International Journal of Food properties*, 16 (5), 1016-1027. ISSN: 1094-2912.

BUŇKA František, Vendula PACHLOVÁ, Lenka PERNICKÁ, Iva BUREŠOVÁ, Stanislav KRÁČMAR a Tomáš LOŠÁK, 2013b. The dependence of Peleg's coefficients on selected conditions of a relaxation test in model samples of Edam cheese. *Journal of Texture Studies*. 44 (3), 187-195. ISSN: 0022-4901.

BUŇKOVÁ, Leona, František BUŇKA, Michaela HLOBILOVÁ, Zuzana VAŇÁTKOVÁ, Dana NOVÁKOVÁ a Vladimír DRÁB, 2009. Tyramine Production of Technological Important Strains of *Lactobacillus*, *Lactococcus* and *Streptococcus*. *European Food Research and Technology*. 229 (3), 533-538. ISSN 1438-2377.

BUŇKOVÁ, Leona, František BUŇKA, Gabriela MANTLOVÁ, Andrea ČABLOVÁ, Ivo SEDLÁČEK, Pavel ŠVEC, Vendula PACHLOVÁ a Stanislav KRÁČMAR, 2010. The Effect of Ripening and Storage Conditions on the Distribution of Tyramine, Putrescine and Cadaverine in Edam-cheese. *Food Microbiology*. 27 (7), 880-888. ISSN 0740-0020.

BUŇKOVÁ, Leona, František BUŇKA, Eva POLLAKOVÁ, Tereza PODEŠVOVÁ a Vladimír DRÁB, 2011. The Effect of Lactose, NaCl and an Aero/anaerobic Environment on the Tyrosine Decarboxylase Activity of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* and *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. *International Journal of Food Microbiology*, 147 (2), 112-119. ISSN 0168-1605.

BUŇKOVÁ, Leona, Gabriela ADAMCOVÁ, Kateřina HUDCOVÁ, Helena VELICHOVÁ, Vendula PACHLOVÁ, Eva LORENCOVÁ a František BUŇKA, 2013. Monitoring of Biogenic Amines in Cheeses Manufactured at Small-scale Farms and in Fermented Dairy Products in the Czech Republic. *Food Chemistry*. 141 (1), 548-551. ISSN 0308-8146.

BURDYCHOVÁ, Radka a Tomáš KOMPRDA, 2007. Biogenic Amine-forming Microbial Communities in Cheese. *Federation of European Microbiological Societies*. 276 (2), 149-155. ISSN1574-6976.

BYLUND, Gosta M., 2003. *Dairy Processing Handbook*, 2nded., Lund: Tetra Pak Processing systems AB, 452 s. ISBN 978-9-1631-3427-2.

CALZADA, Javier, Ana Del OLMO, Antonia PICON, Pila GAYA a Manuel NUÑEZ, 2013. Proteolysis and Biogenic Amine Buildup in High-pressure Treated Ovine Milk Blue-veined Cheese. *Journal of Dairy Science*. 96 (8), 4816-4829. ISSN 1525-3198.

CHURCH, Susan, Robert A. McCANCE a Elsie M. WIDDOWSON, 2002. *The Composition of Foods*, 6thed. London: Royal Society of Chemistry. 538 s. ISBN 978-0-85404-428-3.

COMBARROS-FUERTES, Patricia, Domingo FERNÁNDEZ, Ricardo ARENAS, Isabel DIEZHANDINO, Maria TORNADIJO a José Mária FRESNO, 2016. Biogenic amines in Zamorao cheese: factors involved in their accumulation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 96 (1), 295-305. ISSN 1097-0010

CUNIN, Raymond, Nicolas GLANSDORFF, André PIERARD a Victor STALON, 1986. Biosynthesis and Metabolism of Arginine in Bacteria. *Microbial reviews*. 50 (3), 314-352. ISSN 1098-5557.

CURTIN, A a Paul McSWEENEY, 2004. Catabolism of amino acids in cheese during ripening. In P. F. Fox, P. L. H. McSweeney, T.M. Cogan & T. P. Guinee (Eds.), *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, 3rd ed. (pp. 435-454). London: Elsevier Academic Press. ISBN 978-0122-636-530.

DADÁKOVÁ, Eva, Martin KŘÍŽEK a Tamara PELIKÁNOVÁ, 2009. Determination of Biogenic Amines in Foods using Ultra-performance Liquid Chromatography (UPLC). *Food Chemistry*. 116 (1), 365-370. ISSN 0308-8146.

DALGAARD, Paw, 1995. Qualitative and Quantitative Characterization of Spoilage Bacteria from Packed Fish. *International Journal of Food Microbiology*. 26 (3), 319–333. ISSN 0168-1605.

DANG, Andy, Joseph J. PESEK a Maria T. MATYSKA, 2013. The use of Aqueous Normal Phase Chromatography as an Analytical Tool for Food Analysis: Determination of Histamine as a Model System. *Food Chemistry*. 141 (4), 4226-4230. ISSN 0308-8146.

DRABIK-MARKIEWICZ, Gabriela, Bieke DEJAEGHER, Eveline De MEY, Teresa KOWALSKA, Hubert PAELINCK a Yvan V. HEYDEN, 2011. Influence of Putrescine, Cadaverine, Spermidine or Spermine on the Formation of *N*-nitrosamine in Heated Cured Pork Meat. *Food Chemistry*. 126 (4), 1539-1545. ISSN 0308-8146.

EL-ZAHAR Kahled, Ahmed M. A. EL-ZAGER a Mohamed F. RAMADAN, 2014. Levels of Biogenic Amines in Cheeses and Their Impact on Biochemical and Histological Parameters in Rats. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*. 57 (1), 73-81. ISSN 2234-344X.

EN ISO 5534:2004. Cheese and processed cheese - Determination of the Total Solids Content (Reference method). Praha: Český normalizační institut, 2005.

EMBORG, Jette a Paw DALGAARD, 2008. Modelling the Effect of Temperature, Carbon Dioxide, Water Activity and pH on Growth and Histamine Formation on *Morganella psychrotolerans*. *International Journal of Food Microbiology*. 128 (2), 226-233. ISSN 0168-1605.

FENELON, Mark a Timothy GUINEE, 2000. Primary proteolysis and textural changes during ripening in Cheddar cheeses manufactured to different fat contents. *International Dairy Journal*. 10 (3), 151-158. ISSN 0958-6946.

FIECHTER, Gregor, Gerald SIVÉC a Helmut K. MAYER, 2013. Application of UHPLC for the Simultaneous Analysis of Free Amino Acids and Biogenic Amines in Ripened Acid-curd Cheeses. *Journal of Chromatography B*. 927 (1), 191-200. ISSN 1570-0232.

FOX, Patrick F., 1993. *Cheese - Chemistry, Physics and Microbiology*, volume 1. 2nded., London: Chapman & Hall. 601 s. ISBN 978-1-4613-6138-1.

FOX, Patrick F. a Paul L. H. McSWEENEY, 1998. *Dairy chemistry and biochemistry*. 1st ed., Berlin: Springer Science & Business Media. 478 s. ISBN 978-0-4127-2000-0.

FOX, Patrick F., Timothy P. GUINEE, Timothy COGAN a Paul L. H. McSWEENEY, 2000. *Fundamentals of Cheese Science*. Gauthersburg: Aspen Publication. 638 s. ISBN 0-8342-1260-9.

FOX, Patrick F., Paul L. H. McSWEENEY, Timothy M. COGAN a Timothy P. GUINEE, 2004. *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, volume 1. 3rded., Amsterdam: Elsevier Applied Science. 617 s. ISBN 978-0-1226-3652-3.

FRÖHLICH-WYDER, Marie T., Dominik GUGGISBERG, René BADERTSCHER, Daniel WECHSLER, Annerös WITTER a Stefan IRMLER, 2013. The Effect of *Lactobacillus Buchneri* and *Lactobacillus Parabuchneri* On the Eye Formation of Semi-hard Cheese. *International Dairy Journal*. 33 (2), 120-128. ISSN 0958-6946.

GARDINI, Fausto, Franca ROSSI, Lucia RIZZOTTI, Sandra TORRIANI, Luigi GRAZIA, Cristiana CHIAVARI, Fabio COLORETTI a Giulia TABANELLI, 2012. Role of *Streptococcus Thermophilus* PRI60 in Histamine Accumulation in Cheese. *International Dairy Journal*. 27 (1-2), 71-76. ISSN 0958-6946.

GASARASI, Ghislaine, De P. TROY, Willem DEBEUCKELAERE, Els DELVAUX a Guy DERDELINCKX, 2001. Les *N*-nitrosamines volatiles dans l'alimentation: La viande. *Journal de Pharmacie de Belgique*. 56 (2), 51-53. ISSN 0047-2166.

GenomeNet: *KEGG - Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* [online]. In: Japan - NPO Bioinformatics Japan. Poslední aktualizace 1. března 2018 [cit. 29. března 2018]. Dostupné z: <http://www.genome.jp/>

GENOVESE, Federica, Jean D. COÏSSON, Avishek MAJUMDER, Alessandro PESSIONE, Birte SVENSSON, Susanne JACOBSEN a Enrica PESSIONE, 2013. An exoproteome Approach to Monitor Safety of a Cheese-isolated *Lactococcus Lactis*. *Food Research International*. 154 (1), 1072-1079. ISSN 0963-9969.

GREIF, Gabriel, Mária GREIFOVÁ a Jolana KAROVIČOVÁ, 2006. Effects of NaCl concentration and initial pH value on biogenic amine formation dynamics by *Enterobacter* spp. bacteria in model 149 conditions. *Journal of Food and Nutrition Research*, 45 (1), 21-29. ISSN: 0963-9969

GROSSIORD, Benoit, Elaine E. VAUGHAN, Evert LUESINK a Willem M. VOS, 1998. Genetics of Galactose Utilisation via the Leloir Pathway in Lactic Acid Bacteria. *Le Lait*. 78 (1), 77-84. ISSN 1297-9694.

- HALÁSZ, Anna, Ágnes BARÁTH, Livia SIMON-SARKADI a Wilhelm HOLZAPFEL, 1994. Biogenic Amines and their Production by Microorganisms in Food. *Trends Food Science and Technology*. 5 (2), 42-48. ISSN 0924-2244.
- HERNÁNDEZ-JOVER, Teresa, Mária L. IZQUIERDO-PULIDO, Mária T. VECIANA-NOGUÉS a Mária C. VIDAL-CAROU, 1996. Biogenic Amine Sources in Cooked Cured Shoulder Pork. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 44 (10), 3097-3101. ISSN 0021-8561.
- HSU, Hsiu-Hua, Tin-Chen CHUANG, Hng-Chou LIN, Yu-Ru HUANG, Chia-Min LIN, Hsien-Feng KUNG a Young-Hsiang TSAI, 2009. Histamine content and histamine-forming bacteria in dried milkfish (*Chanos chanos*) products. *Food Chemistry*. 114 (1), 933-938. ISSN 0308-8146.
- INDRA, Z., MIZERA, J., 1992. *Chemické kontrolní metody pro obor zpracování mléka*. Učebnice pro střední průmyslové školy potravinářské.
- INNOCENTE, Nadia, Marialuisa BIASUTTI, Maria PADOVESE a Sabrina MORET, 2007. Determination of Biogenic Amines in Cheese using HPLC Technique and Direct Derivatization of Acid Extract. *Food Chemistry*. 101 (3), 1285-1289. ISSN 0308-8146.
- JØRGENSEN, William L., Hans H. HUSS a Paw DALGAARD, 2000. The Effect of Biogenic Amine Production by Single Bacterial Cultures and Metabiosis on Cold-smoked Salmon. *Journal of Applied Microbiology*. 89 (6), 920-934. ISSN 1365-2672.
- KALÁČ, Pavel a Martin KŘÍŽEK, 2005. Biogenní aminy a polyaminy v potravinách a jejich vliv na lidské zdraví. *Potravinářská Revue*. 2 (1), 40-42. ISSN 1801-9102.
- KALÁČ, Pavel, 2014. Health Effects and Occurrence of Dietary Polyamines: A Review for the Period 2005–Mid 2013. *Food Chemistry*. 161 (1), 27-39. ISSN 0308-8146.
- KAROVÍČOVÁ, Jolana a Zlatica KOHAJDOVÁ, 2005. Biogenic amines in food. *Chemical Papers*, 59 (1), 70-79. ISSN 1336-9075.
- KIM, Shin-Hee, Jorge BARROS-VELÁZQUEZ, Begona BEN-GIGEREY, Jong-Bang EUN, Sang Ho JUN, Cheng-I WEI a Haujung AN, 2003. Identification of the main bacteria contributing to histamine formation in seafood to ensure product safety. *Food Science and Biotechnology*. 12 (4), 451-460. ISSN 1226-7708.
- KIM, Min-Ju a Keun-Sung KIM, 2014. Tyramine production among lactic acid bacteria and other species isolated from kimchi. *Food Science and Technology*. 56 (2), 406-413. ISSN 0023-6438.
- KLETTER, Gerrie, 1977. The Ripening of Gouda cheese made under strictly aseptic conditions. The comparison of activity of different starters and the

influence of certain *Lactobacillus* strains. *Netherlands Milk Dairy*. 31 (1), 177 - 187. ISSN 0028-209X.

KOMPRDA, Tomáš, Jana NEZNALOVÁ, Stanislav STANDARA a Sara BOVER-CID, 2001. Effect of starter culture and storage temperature on the content of biogenic amines in dry fermented sausage poličan. *Meat science*, 59 (3), s. 267-276. ISSN: 0309-1740.

KOMPRDA, Tomáš, 2004. *Obecná hygiena potravin*. Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně. ISBN 80-7157-757-X.

KOMPRDA, Tomáš, Radka BURDYCHOVÁ, Vlastimil DOHNAL, Olga CWIKOVÁ, Pavla SLÁDKOVÁ a Hana DVOŘÁČKOVÁ, 2008. Tyramine production in Dutch-type semi-hard cheese from two different producers. *Food Microbiology*, 25, s. 219-227. ISSN: 0740-0020.

KORKEALA, Hannu, Timo ALANKO a Tino TIUSANEN, 1992. Effect of Sodium Nitrite and Sodium Chloride on Growth of Lactic Acid Bacteria. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 33 (1), 27-32. ISSN: 1751-0147.

KOSTYUKOVSKII, Ya L. a D MELAMED, 1988. Carcinogenic N-nitrosamines, Formation, Properties, and Analysis. *Russian Chemical Reviews*, 1988, 57 (4), 625-655. ISSN 1468-4837.

KŘÍŽEK, Martin, Kateřina MATĚJKOVÁ, František VÁCH a Eva DADÁKOVÁ, 2014. Biogenic Amines Formation in High-pressure Processed Pike Flesh (*Esox lucius*) during Storage. *Food Chemistry*. 151 (1), 466-471. ISSN 0308-8146.

LADERO, Victor, María FERNÁNDEZ, Isabel CUESTA a Miguel A. ALVAREZ, 2010. Quantitative Detection and Identification of Tyramine-producing Enterococci and Lactobacilli in Cheese by Multiplex qPCR. *Food Microbiology*. 27 (7), 933-939. ISSN 0740-0020.

LADERO, Victor, Monika COTON, Maria FERNANDEZ, Noclas BURON, Martin M. CRUZ, Huges GUICHARD, Emmanuel COTON a Miguel A. ALVAREZ, 2011. BiogenicAminesContent in Spanish and French Natural Ciders: Application of qPCR for Quantitative Detection of BiogenicAmine-producers. *Food Microbiology*. 28 (3), 554-561. ISSN 0740-0020.

LADERO, Victor, Elena CAÑEDO, Marta PÉREZ, María C. MARTÍN, María FERNÁNDEZ a Miguel A. ALVAREZ, 2012. Multiplex qPCR for the Detection and Quantification of Putrescine-producing Lactic Acid Bacteria in Dairy Products. *Food Control*. 27 (2), 307-313. ISSN 0956-7135.

LAZÁRO, César Aquiles, Carlos Adam CONTE-JÚNIOR, Anna Carolina CANTO, Maria Lucia Guerra MONTEIRO, Bruno COSTA-LIMA, Adriano Gomes de CRUZ, Eliane Teixeira MÁRSICO a Robson Maia FRANCO, 2015.

Biogenic Amines as Bacterial Quality Indicators in Different Poultry Meat Species. *Food Science nad Technology*. 60 (1), 15-21. ISSN 0023-6438

LEUSCHNER, Renata, Rima KURIHARA a Walter P. HAMMES, 1999. Formation of Biogenic Amines by Proteolytic Enterococci during Cheese Ripening. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 79 (8), 1141-1144. ISSN 1097-0010

LI, Guoliang, Lihua DONG, Aihong WANG, Wenli WANG, Na HU a Jinmao YOU, 2014. Simultaneous Determination of Biogenic Amines and Estrogens in Foodstuff by an Improved HPLC Method Combining with Fluorescence Labeling. *LWT – Food Science and Technology*. 55 (1), 355-361. ISSN 0023-6438

LINARES, Daniel M., Beatriz Del RIO, Victor LADERO, Noelie MARTÍNEZ, Mária FERNÁNDEZ, Cruz M. MARTÍN a Miguel A. ÁLVAREZ, 2012. Factors influencing biogenic amines accumulation in dairy product. *Frontiers in Microbiology*, 180, 1-10 [2014-2-12]. ISSN: 1664-302X

LOIZZO, Monica, R., Francesco MENICHINI, Nevio PICCI, Francesco PUOCI, Umile G. SPIZZIRRI a Donatella RESTUCCIA, 2013. Technological Aspects and Analytical Determination of Biogenic Amines in Cheese. *Trends in Food Science and Technology*. 30 (1), 38-55. ISSN 0924-2244

LOLKEMA, Juke, Bert POOLMAN a Win KONINGS, 1995. Role of scalar protons in metabolic energy generation in lactic acid bacteria. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*. 27 (4), 467-473. ISSN 0145-479X

MACROBAL, Angela, Blanca de las RIVAS, Victoria M. MORENO-ARRIBAS a Rosario MUÑOS, 2004. Identification of the Ornithine Decarboxylase gene in the Putrescine-producer *Oenococcus oeni* BIFI-83. *FEMS Microbiological letter*. 239 (2), 213-220. ISSN 1574-6968.

MACROBAL, Angela, Blanca de las RIVAS, Victoria M. MORENO-ARRIBAS a Rosario MUÑOS, 2006. Evidence for Horizontal Gene Transfer Origin of Putrescine Production in *Oenococcus oeni* RM83. *Applied and Environmental Microbiology*. 72 (12), 7954-7958. ISSN 1098-5336

MASSON, Florent, Régine TALON a Marie C. MONTEL, 1996. Histamine and tyramine production by bacteria from meat products. *International Journal of Food Microbiology*, 32, 199-207. ISSN 0168-1605

MAYER, Helmut K., Gregor FIECHTER a Ernest FISCHER, 2010. A New Ultra-pressure Liquid Chromatography Method for the Determination of Biogenic Amines in Cheese. *Journal of Chromatography A*. 1217 (19), 3251-3257. ISSN 0021-9673.

McSWEENEY, Paul L. H. a Maria J. SOUSA, 2000. Biochemical Pathway for the Production of Flavour Compounds in Cheese during Ripening. *Le Lait*. 80 (1), 293-324. ISSN 1297-9694.

McSWEENEY, Paul L. H., 2004. Biochemistry of Cheese Ripening. *International Journal of Dairy Technology*. 57(2-3), 127-144. ISSN 1471-0307.

MORENO-ARRIBAS, Victoria M. a Carmen M. POLO, 2009. *Wine chemistry and biochemistry*. New York: Springer. 429 s. ISBN 978-0-387-74116-1.

NAILA, Aishat, Steve H. FLINT, Graham C. FLETCHER, Phill BREMER a Gerrit MEERDINK, 2010. Control of Biogenic Amines in Food-Existing and Emerging Approaches. *Journal of Food Science*, 75 (7), 139-150

Nařízení komise (ES) č. 2073/2005 ze dne 15. listopadu 2005 o mikrobiologických kritériích (v platném znění). In: Úřední věstník Evropské unie, 22.12.2005, L 338, s. 1, [online]. [cit. 1. dubna 2018]. Dostupné z: <http://eur-lex.europa.eu/eli/reg/2005/2073/oj/ces>

NOUT Martinus J. R., 1994. Fermented Foods and Food Safety. *Food Research International*. 27 (3), 291–298. ISSN 0963-9969.

NOVELLA-RODRÍGUEZ, Sonia, M. Teresa VECIANA-NOGUÉS, Artur ROIG-SAGUÉS, Antonio TRUJILLO-MESA a M. Carmen VIDAL-CAROU, 2004. Evaluation of biogenic amines and microbial counts throughout the ripening of goat cheeses from pasteurized and raw milk. *Journal of Dairy Research*, 71, 245-252. ISSN: 1469-7629.

OBTULOVIČ, Peter, 2002. *Bioštatistika*. Nitra: Slovenská poľnohospodárska univerzita. 131 s. ISBN 978-8-08-069104-2.

ÖNAL, Armağan, 2007. A Review: Current Analytical Methods for the Determination. *Food Chemistry*. 103 (4), 1475-1486. ISSN 0308-8146.

ÖNAL, Armağan, Serife E. K. TEKKELI a Cem ÖNAL, 2013. A Review of the Liquid Chromatographic Methods for the Determination of Biogenic Amines in Foods. *Food Chemistry*. 138 (1), 509-515. ISSN 0308-8146.

PACHLOVÁ, Vendula, František BUŇKA, Leona BUŇKOVÁ, Eva WEISEROVÁ, Pavel BUDINSKÝ, Milan ŽALUDEK a Stanislav KRÁČMAR, 2011. 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*. 46 (1), 101-108. ISSN 1471-0307.

PACHLOVÁ, Vendula, František BUŇKA, Radka FLASAROVÁ, Petra VÁLKOVÁ a Leona BUŇKOVÁ, 2012. The Effect of Elevated Temperature on Ripening of Dutch-type cheese. *Food Chemistry*, 132 (4), 1846-1854. ISSN 0307-8146.

PACHLOVÁ, Vendula, František BUŇKA, Sabina PURKRTOVÁ, Šárka HAVLÍKOVÁ a Irena NĚMEČKOVÁ, 2016. Biogenic amines and their producers in Akawi white cheese. *International Journal of Dairy Technology*, 69 (3), 1-7. ISSN 1471-0307.

PARENTE, Eugenio, Maria MATUSCELLI, Fausto GARDINI, Simona GRIECO, Maria A. CRUDELE a Giovanna SUZZI, 2001. Evolution of Microbial Populations and Biogenic Amines Production in Dry Sausages Produced in Southern Italy. *Journal of Applied Microbiology*. 90 (6), 882-891. ISSN 1364-5072.

PEREIRA, Cristina, Maria BARRETO CRESPO a Maria SAN ROMAO, 2001. Evidence for proteolytic activity and biogenic amines production in *Lactobacillus curvatus* and *L.homohiochii*. *International Journal of Food Microbiology*. 68 (3), 211-216. ISSN 0168-1605

PINHO Olívia, Isabel FERREIRA, Eulália MENDES, Bruno OLIVIERA a Margarida FERREIRA, 2001. Effect of temperature on evolution of free amino acid and biogenic amine contents during storage of Azeitao cheese. *Food Chemistry*, 75 (3), 287–291. ISSN: 0308-8146.

PLEVA, Pavel, Leona BUŇKOVÁ, Andrea LAUKOVÁ, Eva LORENCOVÁ, Vlastimil KUBÁŇ a František BUŇKA, 2012. Decarboxylatio Activity of Enterococci Isolated from Rabbit Meat and Staphylococci Isolated from Trout Intestines. *Veterinary Microbiology*. 159 (3-4), 438-442. ISSN 0378-1135.

PORCELLATO, Davide, Hilde ØSTLIE, Mona BREDE, Aleksandra MARTINOVIC a Siv SKEIE, 2013. Dynamics of starter, adjunct non-starter lactic acid bacteria and propionic acid bacteria in low-fat and full-fat Dutch-type cheese. *International Dairy Journal*. 33 (2), 104-111. ISSN 0958-6946

QURESHI, Tahir Mahmood, Cees VERMEER, Gerd E. VEGARUS, Roger K. ABRAHAMSEN a Siv SKEIE, 2013. Formation of Biogenic Amines and Vitamin K Contents in the Norwegian Autochthonous Cheese Gamalost during Ripening. *Dairy Science and Technology*. 93 (3), 303-314. ISSN 1958-5594.

REDRUELLO, Begoña, Victor LADERO, Isabel CUESTA, Jorge R. ÁLVAREZ-BUYLLA, María C. MARTÍN, María FERNÁNDEZ a Miguel A. ALVAREZ, 2013. A Fast, Reliable, Ultra High Performance Liquid Chromatography Method for the Simultaneous Determination of Amino Acids, Biogenic Amines and Ammonium Ions in Cheese, using Diethyl Ethoxymethylenemalonate as a Derivatizing Agent. *Food Chemistry*. 139 (1-4), 1029-1035. ISSN 0308-8146.

ROGINSKI, Hubert, John W. FUQUAY a Patrick F. FOX, 2002. *Encyclopedia of Dairy Sciences*. London: Academic Press. 2799 s. ISBN 0-12-227235-8.

SAMKOVÁ, Eva, Eva DADÁKOVÁ A Tamara PELIKÁNOVÁ, 2013. Changes in Biogenic Amine and Polyamine Contents in Smear-ripened Cheeses During

Storage. *European Food Research and Technology*. 237 (3), 309-314. ISSN1438-2385.

SANTOS, Silla M. H., 1996. Biogenic Amines: Their Importance in Foods. *International Journal of Food Microbiology*. 29 (2-3), 213-231. ISSN 0168-1605.

SANTOS, Wandilma, Marcelo SOUZA, Mônica CERQUEIRA a Maria Beatriz GLORIA, 2003. Bioactive amines formation in milk by *Lactococcus* in the presence or not of rennet and NaCl at 20 and 32 °C. *Food Chemistry*, 81 (4), 595-606. ISSN 0308-8146.

SCHIRONE, Maria, Rosanna TOFALO, Giuseppe FASOLI, Giorgia PERPETUINI, Aldo CORSETTI, Anna C. MANETTA, Aurora CIARROCCHI a Giovanna SUZZI, 2013. High Content of Biogenic Amines in Pecorino Cheeses. *Food Microbiology*. 34 (1), 137-144. ISSN 0740-0020.

SHALABY, Ali R., 1996. Significance of biogenic amines to food safety and human health. *Food Research International*. 29 (1), 675-690. ISSN 0963-9969.

SMĚLÁ, Dana, Pavla PECHOVÁ, Tomáš KOMPRDA, Bořivoj KLEJDUS a Vlastimil KUBÁŇ, 2004. Chromatographic Determination of Biogenic Amines in Dry Salami During the Fermentation and Storage (in Czech). *Chemical Papers*. 98 (1), 432-437. ISSN 1336-9075.

SOUZA, Maria, Ylva ARDO a Paul L. H. McSweeney, 2001. Advances in the study of proteolysis during cheese ripening. *International Dairy Journal*. 11 (4-7), 327-345. ISSN 0958-6946

SPIZZIRRI, Gianfranco U., Donatella RESTUCCIA, Manuela CURCIO, Ortensia I. PARISI, Francesca IEMMA a Nevio PICCI, 2013. Determination of Biogenic Amines in Different Cheese Samples by LC with Evaporative Light Scattering Detector. *Journal of Food Composition and Analysis*. 29 (1), 43-51. ISSN 0889-1575.

TEN BRINK, Bart, Christopher DAMINK, Han M. L. JOOSTEN a Jos H. J. TVELD, 1990. Occurrence and Formation of Biologically Active Amines in Foods. *International Journal of Food Microbiology*. 11 (1), 73-84. ISSN 0168-1605.

TSAI, Yung-Hsiang, Chueh-Yueh LIN, Shiou-Chung CHANG, Hwi-Chang CHEN, Hsien-Feng KUNG, Chenkg-I WEI a Deng-Fwu HWANG, 2005. Occurrence of histamine and histamine-forming bacteria in salted mackerel in Taiwan. *Food Microbiology*. 22 (5), 461-467. ISSN 0740-0020

VODIČKOVÁ, Renata. *Spotřeba potravin - 2015*. In: Český statistický úřad [online], [cit. 29. března 2018]. Dostupné z: <https://www.czso.cz/csu/czso/spotreba-potravin-2015#>

Vyhláška č. 397/2016 Sb. ze dne 2.12.2016 o požadavcích na mléko a mléčné výrobky, mražené krémy a jedlé tuky a oleje. In: *Sbírka zákonů*, částka 162. ISSN

1211-1244. [online], [cit. 28. března 2018]. Dostupné z https://www.epravo.cz/_dataPublic/sbirky/2016/sb0162-2016.pdf

WUNDERLICOVÁ, Leona, Leona BUŇKOVÁ, Marek KOUTNÝ, Tomáš VALENTA a František BUŇKA, 2013. Novel touchdown-PCR method for the detection of putrescine producing Gram-negative bacteria in food products. *Food Microbiology*. 34 (2), 268-276. ISSN: 0740-0020.

WILLIAMS, Alan a Jean BANKS, 1997. Proteolytic and other hydrolytic enzyme activities in non-starter lactic acid bacteria (NSLAB) isolated from cheddar cheese manufactured in the United Kingdom. *International Dairy Journal*. 7 (12), 763-774. ISSN 0958-6946.

WUNDERLICOVÁ, Leona, Leona BUŇKOVÁ, Marek KOUTNÝ, Petra JANČOVÁ a František BUŇKA, 2014. Formation, Degradation, and Detoxification of Putrescine by Foodborne Bacteria: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 13 (5), 1012-1030. ISSN 1541-4337.

YURCHENKO, Sergei a Uldo MÖLDER, 2006. Volatile N-nitrosamines in various fish products. *Food chemistry*, 96 (2), 325-333. ISSN 0308-8146.

YVON, Mireille a Liesbeth RIJNEN, 2001. Cheese Flavour Formation by Amino Acid Catabolism. *International Dairy Journal*. 11 (4-7), 185-201. ISSN 0958-6946.

ZULJAN, Frederico Alberto, Pablo MORTERA, Sergio Hugo ALARCÓN, Victor Sebastián BLANCATO, Martin ESPARIZ A Christian MAGNI, 2016. Lactic acid bacteria decarboxylation reactions in cheese. *International Dairy Journal*. 62 (1), 53–62. ISSN 0958-6946

ZWIETERING, Marcel H., Ida JONGENBURGER, Wolf M. ROMBOBUTS a Klaas van't RIET, 1990. Modeling of the bacterial growth curve. *Applied and Environmental Microbiology*. 56 (6), 1875-1881. ISSN 0099-2240.

9. SEZNAM ILUSTRACÍ

<i>Obr. 1: Obecné reakční schéma vzniku biogenních aminů (upraveno podle BioCyc Database Collection, 2016).</i>	9
<i>Obr. 2: Vznik spermidinu a sperminu (upraveno podle BioCyc Database Collection, 2016).</i>	10
<i>Obr. 3: Ornitin dekarboxylázová dráha (upraveno podle BioCyc Database Collection, 2016).</i>	11
<i>Obr. 4: Agmatin deiminázová dráha (upraveno podle BioCyc Database Collection, 2016).</i>	11
<i>Obr. 5: Arginin dekarboxylázová dráha působením enterobakterií (upraveno podle BioCyc Database Collection, 2016).</i>	12
<i>Obr. 6: Arginin dekarboxylázová dráha působením bakterií rodu Pseudomonas (upraveno podle BioCyc Database Collection, 2016).</i>	13
<i>Obr. 7: Vznik N-nitrosopyrrolidinu z putrescinu (upraveno podle Wunderlichová et al., 2014, s. 1014).</i>	17
<i>Obr. 8: Obecné reakční schéma oxidativní deaminace biogenních aminů (upraveno podle BioCyc Database Collection, 2016).</i>	18
<i>Obr. 9: Reakce glukózy přes glukóza-6-fosfát na glycerinaldehyd-3-fosfát (upraveno podle Grossiord et al., 1998, s. 79).</i>	22
<i>Obr. 10: Tagatóza-6-fosfát dráha utilizace laktózy (upraveno podle Grossiord et al., 1998, s. 79).</i>	24
<i>Obr. 11: Leloirova dráha utilizace laktózy (upraveno podle Grossiord et al., 1998, s. 79).</i>	25
<i>Obr. 12: Emden-Meyerhofova dráha (upraveno podle McSweeney a Sousa, 2000, s. 294).</i>	26
<i>Obr. 13: Metabolismus citrátu (upraveno podle McSweeney, 2004, s. 128).</i>	27
<i>Obr. 14: Hydrolýza kaseinů a jejich derivátů peptidů pomocí enzymů bakterií rodu Lactococcus (upraveno podle McSweeney, 2004).</i>	30
<i>Obr. 15: Obecný reakční mechanismus aminokyselin (upraveno podle Fox et al., 2000, s. 73).</i>	31
<i>Obr. 16: Rozdělení dizertační práce, popis jednotlivých experimentů a jejich cílů.</i>	38
<i>Obr. 17: Postup přípravy provozního zákysu pro kontrolní výroby vzorků A a C bez přídavku sledovaného kmene.</i>	41
<i>Obr. 18: Postup přípravy provozních zákysů pro výrobu sýrů označení B a T – zákys s běžnou komerční kulturou a zákys obsahující sledovaný kmen.</i>	42
<i>Obr. 19: Technologie výroby modelových vzorků sýrů.</i>	43
<i>Obr. 20: Způsob solení a zrání modelových vzorků sýrů holandského typu pro 2. a 3. experiment.</i>	45
<i>Obr. 21: Výsledky obsahu sušiny vzorků sýrů 2. experimentu (A bez přídavku sledovaného kmene, B₈₂₄ a B₉₄₆ s přídavkem dekarboxyláza pozitivních bakterií rodu Lactococcus lactis subsp. cremoris CCDM 824 a CCDM 946).</i>	63

Obr. 22: Výsledky pH vzorků sýrů 2. experimentu (A bez přídavku sledovaného kmene, B ₈₂₄ a B ₉₄₆ s přídavkem dekarboxyláza pozitivních bakterií rodu <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> CCDM 824 a CCDM 946.....	64
Obr. 23: Vývoj tvrdosti vzorků sýrů 2. experimentu v průběhu 90denního zrání (A bez přídavku sledovaného kmene, B ₈₂₄ a B ₉₄₆ s přídavkem dekarboxyláza pozitivních bakterií rodu <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> CCDM 824 a CCDM 946.	66
Obr. 24: Vývoj celkového obsahu volných aminokyselin v průběhu 90denního zrání (A bez přídavku sledovaného kmene, B ₈₂₄ a B ₉₄₆ s přídavkem dekarboxyláza pozitivních bakterií rodu <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> CCDM 824 a CCDM 946).	69
Obr. 25: Vývoj koncentrace biogenního aminu putrescinu v průběhu 90denního zrání (A bez přídavku sledovaného kmene, B ₈₂₄ a B ₉₄₆ s přídavkem dekarboxyláza pozitivních bakterií rodu <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> CCDM 824 a CCDM 946).	73
Obr. 26: Vývoj koncentrace biogenního aminu tyraminu v průběhu 90denního zrání (A bez přídavku sledovaného kmene, B ₈₂₄ a B ₉₄₆ s přídavkem dekarboxyláza pozitivních bakterií rodu <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> CCDM 824 a CCDM 946).	74
Obr. 27: Výsledky obsahu sušiny 3. experimentu kontrolních vzorků C a vzorků s přídavkem dekarboxyláza pozitivních bakterií rodu <i>Lactobacillus curvatus</i> subsp. <i>curvatus</i> DEPE T3 a DEPE T36 a <i>Lactobacillus paracasei</i> DEPE T51 a DEPE T52.	76
Obr. 28: Výsledky pH vzorků sýrů 3. experimentu kontrolních vzorků C a vzorků s přídavkem dekarboxyláza pozitivních bakterií rodu <i>Lactobacillus curvatus</i> subsp. <i>curvatus</i> DEPE T3 a DEPE T36 a <i>Lactobacillus paracasei</i> DEPE T51 a DEPE T52.	76
Obr. 29: Vývoj celkového obsahu volných aminokyselin 3. experimentu kontrolních vzorků C a vzorků s přídavkem dekarboxyláza pozitivních bakterií rodu <i>Lactobacillus curvatus</i> subsp. <i>curvatus</i> DEPE T3 a DEPE T36 a <i>Lactobacillus paracasei</i> DEPE T51 a DEPE T52.....	81
Obr. 30: Vývoj obsahu leucinu v 3. experimentu kontrolních vzorků C a vzorků s přídavkem dekarboxyláza pozitivních bakterií rodu <i>Lactobacillus curvatus</i> subsp. <i>curvatus</i> DEPE T3 a DEPE T36 a <i>Lactobacillus paracasei</i> DEPE T51 a DEPE T52.....	82
Obr. 31: Vývoj obsahu tyrozinu v 3. experimentu kontrolních vzorků C a vzorků s přídavkem dekarboxyláza pozitivních bakterií rodu <i>Lactobacillus curvatus</i> subsp. <i>curvatus</i> DEPE T3 a DEPE T36 a <i>Lactobacillus paracasei</i> DEPE T51 a DEPE T52.....	83
Obr. 32: Vývoj celkového obsahu biogenních aminů v 3. experimentu kontrolních vzorků C a vzorků s přídavkem dekarboxyláza pozitivních bakterií rodu <i>Lactobacillus curvatus</i> subsp. <i>curvatus</i> DEPE T3 a DEPE T36 a <i>Lactobacillus paracasei</i> DEPE T51 a DEPE T52	85

Obr. 33: Vývoj obsahu biogenního aminu tyraminu v 3. experimentu kontrolních vzorků C a vzorků s přidavkem dekarboxyláza pozitivních bakterií rodu Lactobacillus curvatus subsp. curvatus DEPE T3 a DEPE T36 a Lactobacillus paracasei DEPE T51 a DEPE T52 86

10. SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 Vznik biogenních aminů z příslušných aminokyselin (upraveno podle Komprda, T., 2004, s. 58; 2008, s. 30; GenomeNet, 2018)	9
Tabulka 2 Kódování vzorků odebrané v průběhu výroby a skladování tvarohů	39
Tabulka 3 Přehled doby kultivace médií pro jednotlivé skupiny mikroorganismů (Buňková et al., 2009, s. 535; 2010, s. 881; Pleva et al. 2012, s. 439)	47
Tabulka 4 Hodnoty jednotlivých biogenních aminů ve fázových vzorcích v průběhu výroby a skladování vzorků tvarohů	52
Tabulka 5 Produkce biogenních aminů u izolovaných kmenů z fázových vzorků	56
Tabulka 6 Počty vybraných skupin mikroorganismů v průběh 90 dnů zrání kontrolních vzorků sýrů A, sýrů s přidavkem kmene <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> CCDM 824 (B ₈₂₄) a <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> CCDM 946 (B ₉₄₆).	67
Tabulka 7 Vývoj celkového obsahu volných aminokyselin a vybraných jejich zástupců po dobu zrání kontrolních vzorků sýrů A, sýrů s přidavkem kmene <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> CCDM 824 (B ₈₂₄) a <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> CCDM 946 (B ₉₄₆).	70
Tabulka 8 Počty vybraných skupin mikroorganismů v průběh 90 dnů zrání kontrolních vzorků sýrů C, sýrů s přidavkem kmene <i>Lactobacillus curvatus</i> subsp. <i>curvatus</i> DEPE T3 a DEPE T36 (T ₃ a T ₃₆) a <i>Lactobacillus paracasei</i> DEPE T51 a T 52 (T ₅₁ a T ₅₂).	79

11. SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

AgDI	Agmatin deiminázová dráha
AMK	Aminokyseliny
BA	Biogenní aminy
BAI	„Biogenic Amine Index“ ukazatel kažení potravin
BMK	Bakterie mléčného kvašení
CCDM	Sbírka mlékařských mikroorganismů Laktoflora
CPM	Celkový počet mikroorganismů
KTJ	Kolonie tvořících jednotek
MO	Mikroorganismus
MRS agar	Mann, Rogosa & Sharpe agar
ODC	Ornitin dekarboxylázová dráha
PCA	Plate count agar
PCR	„Polymerase Chain Reaction“ Polymerázová řetězová reakce
SB agar	Slanetz-Bartley agar

12. PŘÍLOHY

Příloha A: Dělení sýrů a nejčastější složení startérových kultur (Fox et al., 2000, s. 29; 2004, s. 87)

skupiny sýrů	podskupiny sýrů	časté složení zákysových kultur
sýry s plísní	v těstě	<ul style="list-style-type: none"> - <i>Streptococcus thermophilus</i> - <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> - <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> - <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> var. <i>diacetylactis</i> - <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> - <i>Penicillium roqueforti</i>
	na povrchu	<ul style="list-style-type: none"> - <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> - <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> - <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> var. <i>diacetylactis</i> - <i>Penicillium camemberti</i>
sýry zrající na povrchu	-	<ul style="list-style-type: none"> - bakterie rodu <i>Lactococcus</i> - <i>Streptococcus thermophilus</i> - <i>Brevibacterium linens</i>
sýry zrající uvnitř hmoty	extra tvrdé	<ul style="list-style-type: none"> - <i>Streptococcus thermophilus</i> - <i>Lactobacillus helveticus</i> - <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> - <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i>
	tvrdé	<p>sýry švýcarského typu</p> <ul style="list-style-type: none"> - <i>Streptococcus thermophilus</i> - <i>Lactobacillus helveticus</i> - <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> - <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> - <i>Propionibacterium spp.</i>
	polotvrdé	<p>sýry holandského typu</p> <ul style="list-style-type: none"> - <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> - <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> - <i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i> - <i>Leuconostoc lactis</i> - <i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i> - <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar. <i>diacetylactis</i>
	pasta filata	<ul style="list-style-type: none"> - <i>Streptococcus salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i> - <i>Lactobacillus helveticus</i> - <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>

Příloha B: Teplotní a eluční program použitý pro stanovení koncentrace volných aminokyselin (Buňková et al., 2009, s. 534)

čas [min]	čínidlo	teplota kolony [°C]
0 – 2	pufř A	40
2 – 46	pufř B	
46 – 83	pufř C	65
83 – 101	pufř D	70
101 – 162	pufř E	
162 – 180	0,2 ml.l ⁻¹ LiOH	
180 – 213	pufř A	40

Příloha C: Složení pufřů pro chromatografickou analýzu volných aminokyselin na 1000 ml (Buňková et al., 2009, s. 534)

čínidlo	pufr				
	A	B	C	D	E
monohydrát kyseliny citronové [g]	9,56	10,19	10,05	9,50	8,96
citrát litný [g]	2,08	3,24	6,25	15,45	50,02
chlorid lithný [g]	6,68	7,01	12,01	7,01	28,32
azid sodný [g]	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10
thiodiglykol [ml]	2,5	2,5	-	-	-

Příloha D: Eluční program pro separaci 8 biogenních aminů v závislosti na čase

čas [min]	mobilní fáze A* [%]	mobilní fáze B** [%]
0,0	39	61
0,1	39	61
1,4	30	70
3,5	17	83
4,0	0	100
9,5	0	100
11,5	39	61
15,5	39	61

kde * mobilní fáze složená z 10% acetonitrilu

** mobilní fáze složená ze 100% acetonitrilu

Příloha E: Seznam izolovaných kmenů, jejich značení a identifikace pomocí hmotnostní spektrofotometrické detekce Maldi-Tof z 1. experimentu

kód vzorku	výskyt	Maldi-Tof MS identifikace
1.1	syrové mléko	<i>Lactococcus piscium</i>
1.2		<i>Pseudomonas fragi</i>
1.3		<i>Enterococcus faecalis</i>
2.1	pasterované pasterované mléko odstředěné – za pasterem	<i>Bacillus licheniformis</i>
2.2		<i>Lactobacillus</i> sp.
2.3		<i>Serratia fonticola</i>
2.4		<i>Bacillus licheniformis</i>
2.5		<i>Bacillus licheniformis</i>
3.1	mléko odstředěné – za pasterem	<i>Pseudomonas brenneri</i>
3.2		<i>Bacillus subtilis</i>
3.3		<i>Klebsiella oxytoca</i>
3.4		<i>Pseudomonas brenneri</i>
3.5		<i>Bacillus licheniformis</i>
3.6		<i>Pseudomonas jessenii</i>
3.7		<i>Bacillus licheniformis</i>
3.8		<i>Staphylococcus</i> spp.
3.9		<i>Bacillus licheniformis</i>
3.10		<i>Acinetobacter johnsonii</i>
3.11		<i>Bacillus subtilis</i>
4.A.1	mléko před zakysáním – výroba č. 1	<i>Acinetobacter johnsonii</i>
4.A.2		<i>Acinetobacter johnsonii</i>
4.A.3		<i>Acinetobacter johnsonii</i>
4.A.4		<i>Pseudomonas brenneri</i>
4.A.5		<i>Enterococcus faecium</i>
4.A.6		<i>Enterococcus faecium</i>
4.A.7		<i>Bacillus licheniformis</i>
4.A.8		<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
4.B.1	mléko před zakysáním – výroba č. 2	<i>Pseudomonas brenneri</i>
4.B.2		neidentifikován
4.B.3		neidentifikován
4.B.4		<i>Pseudomonas brenneri</i>
4.B.5		<i>Escherichia hermannii</i>
4.B.6		<i>Enterococcus faecalis</i>
4.B.7		<i>Enterococcus faecalis</i>
4.B.8		<i>Bacillus licheniformis</i>
5.A.1		neidentifikován

5.A.2	tvarohovina před krájením – výroba č. 1	<i>Citrobacter freundii</i>
5.A.3		<i>Enterococcus faecium</i>
5.A.4		<i>Enterococcus faecium</i>
5.A.5		<i>Bacillus subtilis</i>
5.A.6		<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
5.A.7		<i>Bacillus licheniformis</i>
5.B.1		tvarohovina před krájením – výroba č. 2
5.B.2	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	
5.B.3	<i>Enterococcus faecalis</i>	
5.B.4	<i>Enterococcus faecalis</i>	
5.B.5	<i>Bacillus licheniformis</i>	
5.B.6	<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>	
5.B.7	<i>Bacillus subtilis</i>	
6.A.1	tvarohové zrno – výroba č. 1	<i>Enterococcus faecium</i>
6.A.2		<i>Lactobacillus fructivorans</i>
6.A.3		<i>Bacillus pumilus</i>
6.A.4		<i>Bacillus licheniformis</i>
6.A.5		neidentifikován
6.A.6		<i>Lactobacillus fructivorans</i>
6.B.1	tvarohové zrno – výroba č. 2	<i>Enterococcus faecium</i>
6.B.2		<i>Enterococcus faecalis</i>
6.B.3		<i>Enterococcus faecalis</i>
6.B.4		<i>Enterococcus faecalis</i>
6.B.5		<i>Bacillus licheniformis</i>
7.A.1	tvaroh jemný ve spotřebitelském balení – výroba č. 1 – 1. den skladování	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i>
7.A.2		<i>Enterococcus faecium</i>
7.A.3		<i>Enterococcus faecium</i>
7.A.4		<i>Enterococcus faecium</i>
7.A.5		<i>Bacillus sonorensis/licheniformis</i>
7.A.6		<i>Lactobacillus plantarum</i>
7.A.7		<i>Bacillus licheniformis</i>
7.B.1	tvaroh jemný ve spotřebitelském balení – výroba č. 2 – 1. den skladování	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i>
7.B.2		neidentifikován
7.B.3		<i>Enterococcus faecalis</i>
7.B.4		<i>Enterococcus faecalis</i>
7.B.5		<i>Lactococcus lactis</i>
8.A.1	tvaroh jemný ve spotřebitelském balení – výroba č. 1 – 25. den skladování	<i>Streptococcus thermophilus</i>
8.A.2		<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>
8.A.3		<i>Lactobacillus paracasei</i>
8.A.4		<i>Enterococcus italicus</i>
8.B.1		<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>

8.B.2	tvaroh jemný ve spotřebitelském balení – výroba č. 2 – 25. den skladování	<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>
8.B.3		neidentifikován

13. SEZNAM PUBLIKACÍ AUTORA

Příspěvky v impaktovaných časopisech

PACHLOVÁ, Vendula, František BUŇKA, **Radka FLASAROVÁ**, Petra VÁLKOVÁ a Leona BUŇKOVÁ, 2012. The Effect of Elevated Temperature on Ripening of Dutch Type Cheese. *Food Chemistry*. 132 (4), 1846-1854. ISSN 0308-8146.

BUŇKA, František, Pavel BUDINSKÝ, Blanka, ZIMÁKOVÁ, Marek MERHAUT, **Radka FLASAROVÁ**, Vendula PACHLOVÁ, Vlastimil KUBÁŇ a Leona BUŇKOVÁ, 2013. Biogenic Amines Occurrence in Fish Meat Sampled from Restaurants in Region of Czech Republic. *Food Control*. 31 (1), 49-52. ISSN 0956-7135.

FLASAROVÁ Radka, Vendula PACHLOVÁ, V., Leona BUŇKOVÁ, Anna MENŠÍKOVÁ, Nikola GEORGOVÁ, Vladimír DRÁB V. a František, BUŇKA, 2016. Decarboxylase activity of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* strains in the model system of Dutch-type cheese. *Food Chemistry*. 194 (1), 68-75. ISSN: 0308-8146.

Příspěvky v recenzovaných časopisech

BUDINSKÝ, Pavel, František BUŇKA, Blanka ZIMÁKOVÁ, Marek MERHAUT, Karel VALOUCH, Kateřina ŠRÁMKOVÁ, **Radka FLASAROVÁ**, Vendula PACHLOVÁ a Leona BUŇKOVÁ, 2012. Výskyt biogenních aminů v rybím mase v restauracích. *Výživa a potraviny*. 4 (1), 88-91. ISSN 1211-846X.

Příspěvky v zahraničních recenzovaných časopisech

BUŇKA, František, Barbora IVIČIČOVÁ, Leona BUŇKOVÁ, **Radka FLASAROVÁ** a Stanislav KRÁČMAR, 2012. Biogenic Amines Content in Selected Wines during Winemaking. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Science*. 1 (4), 785-793. ISSN 1338-5178.

BUŇKA, František, Ludmila ZÁLEŠÁKOVÁ, **Radka FLASAROVÁ**, Vendula PACHLOVÁ, Pavel BUDINSKÝ a Leona BUŇKOVÁ, 2012. Biogenic Amines Content in Selected Commercial Fermented Products of Animal Origin. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Science*. 2 (1), 209-218. ISSN 1338-5178.

Příspěvky ve sbornících z konferencí

PACHLOVÁ, Vendula, **Radka FLASAROVÁ**, František BUŇKA a Leona BUŇKOVÁ, 2012. Vývoj vybraných parametrů sýrů holandského typu v průběhu jeho zrání za zvýšené teploty. In *Konference Mléko a Sýry*. Praha: VŠCHT.

FLASAROVÁ Radka, František BUŇKA, Vendula PACHLOVÁ, Anna MENŠÍKOVÁ, Nikola GEORGOVÁ a Leona BUŇKOVÁ, 2014. Dekarboxylázová aktivita vybraných zákysových bakterií mléčného kvašení v modelovém přírodním sýru. In *Konference Mléko a Sýry*. Praha: VŠCHT.

14. CURRICULUM VITAE

OSOBNÍ ÚDAJE

Jméno a příjmení: Ing. Radka Flasarová
Datum narození: 6. 12. 1986
Adresa: Korytná 358, Korytná, 687 52
E-mail: flasarova1@seznam.cz

VZDĚLÁNÍ

2002 – 2006 **Gymnázium J. A. Komenského, Uherský Brod**

2006 – 2009 **UTB ve Zlíně, Fakulta technologická**
bakalářské studium; obor Chemie a technologie potravin

2009 – 2011 **UTB ve Zlíně, Fakulta technologická**
navazující magisterské studium; obor Chemie potravin a bioaktivních látek

2011 – doposud **UTB ve Zlíně, Fakulta technologická**
doktorské studium; obor Technologie potravin

ZAMĚSTNÁNÍ

2011 – 2015 **UTB ve Zlíně, Fakulta technologická**
Výzkumná a organizační činnost v rámci projektu Národní agentury zemědělského výzkumu „Systém jištění kvality a bezpečnosti mlékárenských výrobků vhodnými metodami aplikovatelnými v praxi“ QJ1210300

2015 – 2016 **UTB ve Zlíně, Fakulta technologická**
technickohospodářský pracovník pro laboratoře živočišného původu

2016 – doposud **FRUJO, a.s.**
vedoucí vývojového oddělení společnosti Frujo, a.s.

ŘEŠENÉ PROJEKTY

2011 – IGA/18/FT/11/D (člen řešitelského týmu) -

2012 – 2016 – Projekt Národní agentury zemědělského výzkumu „Systém jištění kvality a bezpečnosti mlékárenských výrobků vhodnými metodami aplikovatelnými v praxi“ QJ1210300 ve funkci výzkumná a organizační činnost

2012 – IGA/FT/2012/026 (člen řešitelského týmu) – Vliv aplikace směsí fosforečnanových solí na texturní vlastnosti vybraných produktů živočišného původu

2013 – IGA/FT/2013/010 (člen řešitelského týmu) – Ternární směsi fosforečnanových a citronanových solí při výrobě tavených sýrů

2014 – IGA/FT/2014/001 (hlavní řešitel) – Aplikace fosforečnanu a hydrokoloidů do vybraných potravin

2015 – IGA/FT/2015/004 (člen řešitelského týmu) –

ÚČAST NA KONFERENCÍCH

- 1/2012 Konference Mléko a sýry, Praha, VŠCHT
2/2012 Konference Biotechnology and Quality of Raw Materials and Foodstuffs, Mojmírovce
3/2014 Konference Mléko a sýry, Praha, VŠCHT

ZAHRANIČNÍ STÁŽE

- 3-6/2013 Zahraniční pracovní stáž v UCC College Cork pod vedením prof. Paul L. H. McSweeney Ph.D. DSc.

JAZYKOVÉ ZNALOSTI

- Anglický jazyk Pokročilá znalost – aktivně
Německý jazyk Středně pokročilá znalost

OSTATNÍ DOVEDNOSTI

- Práce s PC OS Windows, MS Office, TextureLite, Clarity CDS (Chromatography data station), LC solution software, ACDLABS/ChemSketch, OpenOffice Draw
Práce s přístroji TA.XT Plus (Stable Micro Systems, UK) (2011 – 2016), HPLC Agilent Technologies s UV a FLD detekcí (USA) (2011 – 2016), HPLC Shimadzu s UV detekcí (USA) (2013-2016), od prosince 2014 rozšířený o RI detektor

Ing. Radka Flasarová

Biogenní aminy ve vybraných skupinách přírodních sýrů

Biogenic amines in selected cheese groups

Dizertační práce

Vydala Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně,
nám. T. G. Masaryka 5555, 760 01 Zlín.

Publikace neprošla jazykovou ani redakční úpravou.

Rok vydání 2018