

Vliv délky skladování na obsah biogenních aminů v plísňových sýrech

Radka Flasarová

Bakalářská práce
2009



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav potravinářského inženýrství

akademický rok: 2008/2009

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Radka FLASAROVÁ**

Studijní program: **B 2901 Chemie a technologie potravin**

Studijní obor: **Chemie a technologie potravin**

Téma práce: **Vliv délky skladování na obsah biogenních aminů
v plísňových sýrech**

Zásady pro vypracování:

I. Teoretická část

- Obecná charakteristika biogenních aminů (chemická struktura, vznik, účinky na lidský organismus).
- Výskyt biogenních aminů v potravinách se zaměřením na mléčné výrobky.
- Metody stanovení biogenních aminů v potravinách.
- Technologie výroby sýrů s plísní na povrchu.

II. Praktická část

- Vlastní stanovení biogenních aminů v sýrech s plísní na povrchu metodou iontově-výměnné chromatografie během dvouměsíčního skladování.

Rozsah práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

[1] Shalaby, A.R. Significance of Biogenic Amines to Food Safety and Human Health. *Food Research International*, 29, 1996, pp. 675 -- 690.

[2] Trends in Food Science and Technology, 5, 1994, pp. 42 -- 49.

[3] Velišek, J. a kol. *Chemie potravin 3, OSSIS, Tábor 1999*, ISBN 80-902391-5-3 .

[4] Roginski, H., Fuquay, J.W., Fox, P.F. *Encyclopedia of Dairy Sciences*, Academic Press, London 2002, ISBN 0-12-227235-8.

Vedoucí bakalářské práce:

Ing. Ivana Macků

Ústav potravinářského inženýrství

Datum zadání bakalářské práce:

17. února 2009

Termín odevzdání bakalářské práce:

31. května 2009

Ve Zlíně dne 31. května 2009


doc. Ing. Petr Hlaváček, CSc.
děkan




prof. Ing. Ignác Hoza, CSc.
vedoucí katedry

ABSTRAKT

Cílem této bakalářské práce bylo stanovit obsah biogenních aminů v sýrech s plísní na povrchu během dvouměsíčního skladování. Sýry s plísní na povrchu byly skladovány v lednici při teplotě 6 ± 2 °C. U všech vzorků byla provedena základní chemická analýza. Obsah biogenních aminů ve výše uvedených plísňových sýrech byl stanoven pomocí iontově-výměnné chromatografie s postkolonovou derivatizací ninhydrinem a spektrofotometrickou detekcí použitím Automatického analyzátoru aminokyselin AAA 400.

Ve zkoumaných vzorcích byly detekovány biogenní aminy spermidin, spermin, putrescin a kadaverin. Kvantitativně nejzastoupenějším biogenním aminem v analyzovaných sýrech s plísní na povrchu byl spermidin. Celkový obsah biogenních aminů byl zanedbatelný z hlediska toxicity pro člověka. Agamatin, histamin a tryptamin nebyly stanoveny ani v jednom z analyzovaných vzorků.

Klíčová slova: Biogenní aminy, plísňový sýr, iontově-výměnná chromatografie

ABSTRACT

The aim of this bachelor work was to investigate the amount of biogenic amines in mould-ripened cheeses. There were analysed three commercial brands of mould-ripened cheese that were stored in the refrigerator at 6 ± 2 °C. All samples were subjected to basic chemical analysis. The content of biogenic amines samples was determined by using ion-exchange chromatography with post-column ninhydrine derivatization and spectrophotometric detection by Amino acid analyser AAA 400.

Spermidine, spermine, putrescine and cadaverine were detected in all samples. Spermidine was quantitatively the most important of all detected biogenic amines. It was found that the total amount of biogenic amines during 8 weeks of storage was not dangerous for health of consumers. Agmatine, histamine and tryptamine were not found in any analysed samples.

Keywords: Biogenic amines, mould cheese, ion-exchange chromatography

Na tomto místě bych chtěla poděkovat Ing. Ivaně Macků za odborné vedení, cenné rady a připomínky při zpracování mé bakalářské práce.

Dále bych chtěla poděkovat doc. Ing. Františku Buňkovi, Ph.D. a Ing. Zuzaně Lazárkové, Ph.D. za pomoc při práci na praktické části této bakalářské práce.

Prohlašuji, že jsem na bakalářské práci pracovala samostatně a použitou literaturu jsem citovala. V případě publikace výsledků, je-li to uvedeno na základě licenční smlouvy, budu uvedena jako spoluautorka.

Ve Zlíně 5. 4. 2009

.....

OBSAH

ÚVOD	8
I TEORETICKÁ ČÁST	9
1 BIOGENNÍ AMINY	10
1.1 CHEMICKÁ STRUKTURA BIOGENNÍCH AMINŮ	10
1.2 VZNIK BIOGENNÍCH AMINŮ	11
1.3 VÝSKYT BIOGENNÍCH AMINŮ V POTRAVINÁCH	13
1.3.1 Nefermentované potraviny	13
1.3.2 Fermentované potraviny	14
1.4 ÚČINKY BIOGENNÍCH AMINŮ NA LIDSKÝ ORGANIZMUS	15
1.4.1 Histamin	16
1.4.2 Tyramin	17
1.5 METODY STANOVENÍ BIOGENNÍCH AMINŮ	17
1.5.1 Tenkovrstevná chromatografie (TLC)	18
1.5.2 Plynová chromatografie (GC)	18
1.5.3 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)	19
1.5.4 Kapilární elektroforéza (CE)	19
2 PLÍŠŇOVÉ SÝRY	20
2.1 ROZDĚLENÍ PLÍŠŇOVÝCH SÝRŮ	21
2.1.1 Měkké sýry s plísní na povrchu	21
2.1.2 Sýry s plísní v těstě	21
2.1.3 Dvouplíšňové sýry	22
2.2 TECHNOLOGIE VÝROBY PLÍŠŇOVÝCH SÝRŮ	23
2.3 PROCESY PROBÍHAJÍCÍ PŘI ZRÁNÍ PLÍŠŇOVÝCH SÝRŮ	26
II PRAKTICKÁ ČÁST	27
3 CÍL PRÁCE	28
4 MATERIÁL A METODIKA	29
4.1 CHARAKTERISTIKA VZORKŮ	29
4.2 ZÁKLADNÍ CHEMICKÁ ANALÝZA	30
4.3 EXTRAKCE BIOGENNÍCH AMINŮ	31
4.4 CHROMATOGRAFICKÁ ANALÝZA BIOGENNÍCH AMINŮ	31
5 VÝSLEDKY A DISKUZE	33
5.1 CHEMICKÁ ANALÝZA VZORKU	33
5.2 CHROMATOGRAFICKÁ ANALÝZA	35
ZÁVĚR	40
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	41
SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	47

SEZNAM OBRÁZKŮ	48
SEZNAM TABULEK.....	49
SEZNAM PŘÍLOH.....	50

ÚVOD

Plísňové sýry jsou stále častěji vyhledávanými výrobky na trhu. Jejich oblíbenost roste především díky jejich charakteristické výrazné vůni a jemné chuti. Plísňové sýry jsou zdrojem plnohodnotných bílkovin, a proto zauímají významné místo z hlediska výživové hodnoty. O jejich oblíbenosti vypovídá i průzkum Českého statistického úřadu, který zveřejnil spotřeby plísňových sýrů od roku 2000 do roku 2007. V roce 2000 byla spotřeba plísňových sýrů 1,1 kg na osobu za rok. V roce 2007 byla tato hodnota již 1,6 kg na osobu za rok, což činí téměř 12 % z celkové spotřeby sýrů v témže roce. [1] Mezi významné producenty plísňových sýrů patří zejména Francie. Roginski a kol. [2] uvedl, že Francie v roce 1999 vyprodukovala přibližně 310 000 t plísňových sýrů (zejména Camembert, Brie a Coulommiers). V rámci států Evropské unie výroba plísňových sýrů dosahuje 7 – 8 % produkce všech typů sýrů.

Při výrobě plísňových sýrů se používají jak primární, tak také sekundární kultury. Díky těmto použitým kulturám mohou v těchto typech sýrů vznikat biogenní aminy. Biogenní aminy mohou tvořit rovněž kontaminující mikroorganismy, např. hnilobné bakterie, a proto lze biogenní aminy využít v nefermentovaných potravinách jako indikátory mikrobiální kontaminace potravin. V nízkých koncentracích jsou biogenní aminy přirozenou složkou potravin a v organismu plní mnoho významných funkcí. Ve vyšších koncentracích však mohou mít negativní vliv na lidský organizmus, a proto je velmi důležité jejich množství v potravinách sledovat.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 BIOGENNÍ AMINY

Biogenní aminy jsou nízkomolekulární dusíkaté látky odvozené od aminokyselin. Aminokyseliny jsou přítomny ve všech živých organismech, kde tvoří základní složku proteinů a peptidů. Biogenní aminy se přirozeně vyskytují u živočichů, rostlin a mikroorganismů, kde plní významné fyziologické funkce. V organismu jsou především zdrojem dusíku pro biochemické reakce. Biogenní aminy mohou mít význam nejen jako hormony, např. adrenalin, histamin, ale může se jednat i o stavební látky, které se účastní na biosyntéze dalších hormonů, např. fenyletylamin. Hornin a gramin se řadí mezi biogenní aminy působící v organismu jako protoalkaloidy. [2-5] Ve vyšších koncentracích mohou mít však negativní vliv na lidský organizmus a bývají náznakem kažení potravin. Proto se biogenní aminy občas využívají jako indikátory jejich čerstvosti. [2-9]

1.1 Chemická struktura biogenních aminů

Biogenní aminy se podle chemické struktury dělí na alifatické, aromatické a heterocyklické. Mezi alifatické biogenní aminy se řadí putrescin, kadaverin, spermin, spermidin, agmatin. [3, 8] Všechny zmíněné alifatické biogenní aminy se řadí rovněž mezi polyaminy, tj. sloučeniny obsahující dvě a více aminoskupin v molekule. Z biogenního aminu putrescinu vzniká biochemickou syntézou spermidin a spermin, touto cestou mohou vznikat ve všech živých organizmech. [4] Podle Santose [8] jsou polyaminy nezbytnou součástí živých buněk a jsou důležité při regulaci funkcí nukleových kyselin, syntéze proteinů a pravděpodobně se podílí i na stabilizaci membrán. Mezi aromatické biogenní aminy se řadí tyramin a fenyletylamin. Zástupci heterocyklických biogenních aminů jsou histamin a tryptamin. [3, 5]

Dále se biogenní aminy mohou dělit podle počtu alkylových a arylových skupin navázaných na atom dusíku. Jde o biogenní aminy primární, sekundární či terciární. Podle počtu reaktivních aminoskupin mohou být děleny na monoaminy či polyaminy. [2]

Pro biogenní aminy se kromě systematických názvů používají i názvy triviální. V tabulce 1 jsou uvedeny triviální názvy nejdůležitějších biogenních aminů, jejich systematický název (podle IUPAC) a zařazení do skupin podle chemické struktury a podle počtu aminoskupin. [2]

Tabulka 1 - Triviální názvy nejdůležitějších biogenních aminů, jejich systematický název a zařazení do skupin [2]

Název triviální	Název systematický	Zařazení
histamin	2-(1H-imidazol-5-yl)etanamin	heterocyklické, monoaminy
tyramin	4-(2-aminoethyl)fenol	aromatické, monoaminy
fenyletylamin	2-fenyletanamin	aromatické, monoaminy
tryptamin	2-(1H-indol-3-yl)etanamin	heterocyklické, monoaminy
serotonin	3-(2-aminoethyl)-1H-indol-5-ol	heterocyklické, monoaminy
putrescin	butan-1,4-diamin	alifatické, polyaminy
kadaverin	pentan-1,5-diamin	alifatické, polyaminy
spermidin	<i>N</i> -(3-aminopropyl)butan-1,4-diamin	alifatické, polyaminy
spermin	<i>N,N'</i> -bis(3-aminopropyl)butan-1,4-diamin	alifatické, polyaminy

1.2 Vznik biogenních aminů

Biogenní aminy vznikají v potravinách převážně jako produkty metabolismu přítomných mikroorganismů. Ve fermentovaných potravinách se vyskytují zejména díky činnosti mléčných bakterií, které vykazují dekarboxylázovou aktivitu. V potravinách však mohou biogenní aminy vznikat rovněž vlivem kontaminující mikroflóry, např. hnilobných bakterií. Biogenní aminy jsou odvozeny od příslušných aminokyselin, z nichž vznikají působením dekarboxyláz. [2-4, 6, 7, 9-11] Např. dekarboxylací aminokyseliny histidin vzniká pomocí histidindekarboxylázy histamin. Z lyzinu díky lyzindekarboxyláze vzniká kadaverin. [5, 6] Biogenní aminy mohou vznikat i aminací a přeměnou příslušných aldehydů a ketonů. [8]

Pro vznik biogenních aminů jsou důležité zejména tři faktory, které ovlivňují jejich množství v daných potravinách. Mezi tyto faktory patří: [2, 3, 5, 9]

- přítomnost volných aminokyselin, ze kterých biogenní aminy vznikají
- přítomnost mikroorganismů, které mají dekarboxylační aktivitu
- vhodné okolní podmínky umožňující růst a množení výše jmenovaných mikroorganismů

V tabulce 2 je uvedeno, ze kterých volných aminokyselin vzniká daný biogenní amin a jeho biologický význam pro organismus. [5]

Tabulka 2 - Biogenní aminy, jejich prekurzory a biologický význam [5]

Biogenní amin	Původní aminokyselina	Biologický význam
histamin	histidin	lokální tkáňový hormon, vliv na krevní tlak, sekreci žaludeční šťávy, účast při anafylaktickém šoku a alergických reakcích, stabilizace makromolekul (nukleové kyseliny), rostlinný hormon
kadaverin	lyzin	stabilizace makromolekul (nukleové kyseliny), rostlinný hormon
putrescin	arginin (přes ornitin nebo citrulin)	stabilizace makromolekul (nukleové kyseliny), rostlinný hormon
fenyletylamin	fenylalanin	prekurzor tyraminu
tyramin	tyrozin	prekurzor dopaminu, lokální tkáňový hormon, vliv na krevní tlak a kontrakce hladkého svalstva
dopamin	3,4-dihydroxyfenylalanin	mediátory sympatických nervů
tryptamin	tryptofan	lokální tkáňové hormony (katecholaminy), vliv na krevní tlak, peristaltiku střev, psychické funkce

Významnými bakteriemi majícími vliv na vznik biogenních aminů jsou zejména rody *Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Bacillus*, *Citrobacter*, *Clostridium*, *Escherichia*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Leuconostoc*, *Micrococcus*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Shigella* a některé druhy mléčných bakterií, především *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*. [2-7, 12, 13] Podmínky, které ovlivňují růst a množení těchto bakterií, jsou následující:

- přítomnost volných aminokyselin a využitelných sacharidů – podle Komprdy [3] by daný substrát měl mít koncentraci glukózy v rozmezí 0,5 – 2,0 %. [7, 9, 10]
- teplota – většina výše jmenovaných rodů mikroorganismů se řadí mezi mezofilní bakterie, které rostou a množí se při teplotách v rozmezí

20 – 45 °C, ale největšího růstu a množení dosahují za optimální teploty 37 °C. [3, 7, 8, 10, 13]

- pH – pro mléčné bakterie je za optimální pH považováno slabě kyselé prostředí, pro hnilobné bakterie je optimální neutrální až slabě zásadité prostředí. [3, 7, 8, 10]
- obsah kyslíku v substrátu – jeho vliv však není jednoznačný. Musí se rozlišovat, zdali konkrétní druh mikroorganismů s dekarboxylační aktivitou aerobní, anaerobní či fakultativně anaerobní. Většina bakterií vykazující dekarboxylační aktivitu patří právě mezi fakultativně anaerobní mikroorganismy, jež mohou žít jak za přítomnosti, tak i za nepřítomnosti kyslíku. [2-5, 7, 8, 10, 13]
- doba skladování potravin – bylo dokázáno, že při dlouhodobém skladování se obsah biogenních aminů výrazně zvyšuje, a to zejména v zelenině, ovoci, houbách a fermentovaných výrobcích. [3-7]

1.3 Výskyt biogenních aminů v potravinách

Obsah biogenních aminů se významně liší ve fermentovaných a nefermentovaných potravinách.

1.3.1 Nefermentované potraviny

K nefermentovaným potravinám, které mohou obsahovat vyšší koncentrace biogenních aminů, patří např. ryby. Z hlediska vyššího obsahu biogenních aminů je nejdůležitější čeledí *Scombridae*, čili makrelovití. V čerstvém rybím mase je obsah biogenních aminů zanedbatelný. Ovšem s délkou skladování masa, nebo při jeho kažení, obsah biogenních aminů, zejména histaminu, výrazně roste a může dosáhnout hranici toxicity. Proto se otrava biogenními aminy z tohoto druhu rybích mas nazývá skombrotoxikóza, často označována také jako histaminóza. V ostatních nefermentovaných potravinách, jako např. ovoce, zelenina, houby, je množství biogenních aminů téměř zanedbatelné. [3, 5]

1.3.2 Fermentované potraviny

Z hlediska toxicity jsou důležitější potraviny fermentované. Jedná se především o sýry a masné výrobky, u kterých byla ve výrobním procesu použita fermentace. U tohoto druhu potravin se vyskytují především následující biogenní aminy: tyramin, putrescin, kadaverin a histamin. Biogenní aminy vznikají ve fermentovaných výrobcích činností mikroorganismů s dekarboxylační aktivitou. Výskytu vyššího množství biogenních aminů lze zamezit kratší dobou fermentace, kratší dobou skladování a zejména použitím těch startovacích kultur při výrobě, které vykazují nejnižší možnou dekarboxylační aktivitu. K fermentovaným potravinám se řadí i fermentované nápoje. Jedná se zejména o pivo a víno. V těchto nápojích není množství biogenních aminů příliš vysoké. Při poměrně rychlé konzumaci většího množství těchto nápojů však může dojít k otravě biogenními aminy. [3-5, 7]

Vysoká množství biogenních aminů lze nalézt zejména v mléčných produktech, především v sýrech, protože představují ideální prostředí pro tvorbu biogenních aminů. Po rybách a rybích produktech je konzumace sýrů nejpravděpodobnější možností otravy biogenními aminy. Nejčastějšími biogenními aminy, které se v mléčných výrobcích vyskytují, jsou tyramin, histamin, putrescin, kadaverin, tryptamin a fenyletylamin. Vysoká množství těchto biogenních aminů v mléčných výrobcích jsou zapříčiněna díky vzájemnému působení několika faktorů. Nejdůležitějším faktorem pro jejich vznik a hromadění v mléčných výrobcích je přítomnost a aktivita bakterií a jejich enzymů. Dalším, velmi důležitým faktorem, je dostupnost substrátu a jeho vhodné pH, úroveň proteolýzy bílkovin, aj. Neméně důležitým faktorem je teplota zrání a uskladnění mléčných výrobků. S delší dobou zrání či skladování se obsah biogenních aminů výrazně zvyšuje. [6, 10, 12, 15, 17] Při technologii výroby by měly být použity mikroorganismy pokud možno s co nejnižší dekarboxylázovou aktivitou, protože dekarboxylázová aktivita byla prokázána nejen u kontaminujících mikroorganismů, ale i u startovacích či sekundárních kultur. Při výrobě mléčných výrobků je proto velmi důležité použití vhodných mikroorganismů. [6, 7, 10, 12, 15, 17, 19, 26]

Obsah biogenních aminů není ve všech mléčných výrobcích stejný. Největší zaznamenaná množství biogenních aminů byla pozorována v mléčných produktech vyrobených ze syrového mléka. Při kontaminaci syrového mléka bakteriemi čeledi *Enterobacteriaceae*

se zvyšuje riziko vzniku biogenních aminů. Sýry s podobným složením se mohou obsahem biogenních aminů výrazně lišit. [6, 7, 17, 19, 20, 26, 27]

1.4 Účinky biogenních aminů na lidský organizmus

Biogenní aminy jsou řazeny mezi přirozené toxické látky. Zatímco v nižších koncentracích jsou pro organizmus nepostradatelné, ve vyšších koncentracích mají nepříznivý vliv na organizmus a stávají se tak toxickými. [3-7] Biogenní aminy se v organizmu mohou projevat jako:

- psychoaktivní látky – biogenní aminy, které působí na nervové přenašeče. Ve většině případů dochází k dočasným změnám vnímání, chování, aj. Mezi tyto látky se řadí např. histamin. [2, 3, 5, 6, 14]
- vasoaktivní látky – biogenní aminy mající přímý či nepřímý vliv na vaskulární systém. Tyto látky se mohou dělit na vasokontraktibilní (např. tyramin) a vasodilatační. Mezi vasoaktivní aminy se řadí i tryptamin a fenyletylamin. Mají za následek hlavně kontrakce hladkého svalstva, rozšíření cév, a tím i snížení krevního tlaku. [2, 3, 5, 6]

Horní hranice, kdy se biogenní aminy stávají toxickými pro lidský organizmus, není zcela přesně stanovena. Záleží na konkrétním jedinci, jeho zdravotním stavu a na množství konzumované potraviny, která obsahuje výrazně vyšší množství biogenních aminů. Zdravý člověk je ochráněn i proti vyššímu příjmu biogenních aminů. K detoxikaci biogenních aminů v lidském organizmu dochází pomocí střevních enzymů aminooxidáz, které jsou velmi často nazývány jako detoxifikační mechanismy. [2, 3, 6-8, 15-18] Mezi nejvýznamnější aminooxidázy jsou řazeny monoaminooxidázy a diaminooxidázy. Jejich množství se v lidském organizmu snižuje s rostoucím věkem, působením alkoholu či léků, zejména psychofarmak, protože tyto léky mohou obsahovat inhibitory aminooxidáz. [2, 3, 5, 18, 19]

Z toxikologického hlediska se mezi nejzávažnější biogenní aminy řadí histamin a tyramin. Patří k nejvíce zkoumaným biogenním aminům v dnešní době. Ve vysokých koncentracích mohou mít negativní vliv na zdraví. Jejich vysoký příjem způsobuje zdravotní potíže, které mohou vést až ke smrti konzumenta. [2-5, 7, 15, 19, 20]

Biogenní aminy jako putrescin a kadaverin nemají příliš velký vliv na organismus. Jejich přítomnost a množství v potravinách je ale důležité, protože zvyšují účinky histaminu a tyraminu. Putrescin, spermidin a spermin jsou důležité pro regulaci funkcí nukleových kyselin, syntézu bílkovin a pravděpodobně mají vliv i na stabilizaci membrán. Jejich hranice toxicity byla stanovena na 180, 83 a 19 mg na jeden kilogram tělesné váhy konzumenta. Legislativně však nejsou dány žádné hranice toxicity těchto biogenních aminů. Některé biogenní aminy, především sekundární aminy, mohou reagovat s dusitany obsaženými v potravinách za vzniku karcinogenních nitrosaminů. [2-5, 7, 15, 20] Putrescin, spermidin a spermin jsou důležité pro regulaci funkcí nukleových kyselin. Jejich hranice toxicity byla stanovena na 180, 83 a 19 mg na jeden kilogram tělesné váhy konzumenta. Legislativně však nejsou dány žádné hranice toxicity těchto biogenních aminů. [15, 20]

1.4.1 Histamin

Histamin je jedním z nejvýznamnějších biogenních aminů, jež ve vyšších koncentracích působí negativně na lidský organismus. Výskyt histaminu je zejména v rybím mase, sýrech, víně a masných produktech. [8] Kalač a Křížek [4] uvádí, že hodnota $8 - 40 \text{ mg.kg}^{-1}$ je množství, které může vyvolat projevy lehké otravy. $40 - 100 \text{ mg.kg}^{-1}$ se uvádí jako hodnoty pro středně těžkou otravu a obsah nad 100 mg.kg^{-1} histaminu je velmi silná otrava. Tato množství jsou uváděna pro pevné potraviny. Pro alkoholické nápoje je hranice toxicity 2 mg.dm^{-3} . [2, 15, 21] Zpravidla se otrava projevuje v rozmezí několika minut až hodin. Mezi nejzávažnější účinky histaminu patří anafylaktický šok, snížení tlaku, bolesti hlavy, které mohou přecházet v silné migrény. Dalšími toxickými projevy jsou kontrakce hladké svaloviny střev jako břišní křeče, zvracení, průjemy. S otravou histaminem může souviset i zarudnutí očí, kůže, potíže s dechem a třes. [3, 6] Ve vyhlášce Ministerstva zdravotnictví č. 305/2004 Sb. (v platném znění) [22] se stanovuje přípustné množství histaminu v rybách a rybích výrobcích 100 mg.kg^{-1} . Toto množství může být překročeno ve dvou z devíti odebraných vzorků z jedné šarže o 100 %, tj. ve dvou vzorcích může být tedy přítomno až 200 mg.kg^{-1} tohoto biogenního aminu. [4, 22]

1.4.2 Tyramin

Z toxikologického hlediska je tyramin spolu s histaminem jedním z nejzávažnějších biogenních aminů. Vyskytuje se zejména v mase vepřovém, hovězím a rybím. V masných výrobcích může být množství tyraminu v rozmezí 100 – 800 mg.kg⁻¹. Značné množství tyraminu bývá nalezeno i v sýrech. V rostlinných materiálech se tyramin vyskytuje zejména v banánech, kde jeho množství dosahuje až 200 – 400 mg.kg⁻¹. Ve fermentovaných výrobcích rostlinného původu je obsah tyraminu nejzávažnější zejména v kysaném zelí. [2-5, 15, 23] Bylo zjištěno, že množství 10 – 80 mg.kg⁻¹ tyraminu v potravinách může vyvolávat tvorbu otoků. Příznaky vyvolané otravou tyraminem jsou silné bolesti hlavy spolu se zvracením, zvýšení teploty a prudké zvýšení krevního tlaku. Podle Önala [24] se za toxické množství tyraminu považuje hodnota 1080 mg.kg⁻¹. Současná vyhláška Ministerstva zdravotnictví č. 305/2004 Sb. (v platném znění) bohužel jeho povolené množství v potravinách neudává. Množství tyraminu v potravinách ošetřovala pouze starší (dnes již neplatná) vyhláška Ministerstva zdravotnictví č. 298/1997 Sb., která stanovila povolené množství tyraminu ve víně 50 mg.kg⁻¹ a v sýrech tvrdých, měkkých a zrajících 200 mg.kg⁻¹. [22, 25]

1.5 Metody stanovení biogenních aminů

Biogenní aminy jsou ve vyšších koncentracích toxické pro lidský organizmus. Právě proto je jim poslední dobou věnována velká pozornost. Obsah biogenních aminů v potravinách je sledován i proto, že mohou být využity jako indikátory bakteriální kontaminace potravin. Stanovení takto důležitých látek je ovšem složitý proces.

Mezi současné metody stanovení biogenních aminů patří zejména tenkovrstevná chromatografie, plynová chromatografie, kapilární elektroforéza a kapalinová chromatografie. Podle Smělé a kol. [28] se v praxi nejčastěji používá vysoce citlivé chromatografické metody RP-HPLC (vysokoučinná chromatografie s obrácenými fázemi) s fluorescenční nebo UV detekcí. Většina metod pro stanovení biogenních aminů je časově velmi náročná a nelze je v běžném provozu použít. Další metodou pro stanovení biogenních aminů v potravinách je např. iontově-výměnná chromatografie. [6, 11, 24, 29, 30]

Před použitím konkrétní metody pro stanovení biogenních aminů v potravinách je nutná izolace těchto nízkomolekulárních dusíkatých látek ze zkoumaného potravinového vzorku. V případě nápojů sestává příprava vzorku obvykle pouze z filtrace. U ostatních potravin se pro extrakci biogenních aminů používají různá extrakční činidla. V dnešní době mezi nejpoužívanější extrakční činidla patří zejména kyselina chloristá o různých koncentracích, kyselina chlorovodíková ($0,1 \text{ mol.dm}^{-3}$), 5% [w/w] kyselina trichloroctová, metanol, petroleter. Pro extrakci z masných výrobků a ryb se nejčastěji používá metansulfonová kyselina. Po homogenizaci vzorku s vybraným činidlem je nutné odstranit vysrážené složky pomocí odstředivky a/nebo filtrace. [11, 24, 28-30]

1.5.1 Tenkovrstevná chromatografie (TLC)

Jedná se o poměrně jednoduchou, ale časově velmi náročnou metodu. V případě analýzy biogenních aminů se používá dvoufázová TLC. Tato metoda využívá systému rozpouštědel chloroform – dietyleter – triethylamin (6:4:1) a dále chloroform – triethylamin (6:1). Derivatizace biogenních aminů se provádí zejména pomocí dansylchloridu s následnou denzitometrickou detekcí při 254 nm. Výhody této metody spočívají v tom, že je možné ji použít pro větší množství vzorků. TLC se ovšem neřadí mezi zcela přesné metody. [6, 21, 24, 28, 32]

1.5.2 Plynová chromatografie (GC)

Nejčastěji se tato metoda pro stanovení biogenních aminů využívá ve spojení s hmotnostní spektrometrií (GC-MS) za použití anhydridu kyseliny heptafluoromáselné (HFBA) jako derivatizačního činidla (pro převod biogenního aminu na těkavý derivát). Metoda GC byla podle Önala [24] použita např. pro stanovení biogenních aminů v portském víně. Celkový čas této analýzy byl 18 min.

Önal [24] zveřejnil i další postup využívající plynovou chromatografii, při kterém však odpadá nutnost derivatizace analytu. Tato metoda byla využita pro stanovení obsahu histaminu v rybách a rybích produktech. Histamin byl nejprve ze vzorku extrahován alkalickým metanolem a poté injektován na chromatografickou kolonu bez derivatizace, doba analýzy činila 20 minut. [6, 21, 24, 28, 29, 33]

1.5.3 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)

HPLC je velmi často využívanou metodou. Jde o citlivou a přesnou metodu. Často používanou variantou je RP-HPLC po postkolonové derivatizaci *o*-ftalaldehydem (OPA). Lze použít rovněž merktaptoetanol (2-ME), následuje fluorimetrická detekce. Jako další derivatizační činidla se používají např. 1,2-naftochinon-4-sulfonát (spektrofotometrická detekce), 4-chloro-7-nitrobenzofurazan (spektrofotometrická detekce), aj. Pro detekci některých biogenních aminů není nutné použít derivatizační činidlo, jedná se zejména o histamin a tryptamin. U histaminu je možné použít UV/VIS DAD detektor, tj. detektor diodového pole. Kromě výše uvedených detekcí je možné použít i konduktometrický detektor. Stále častěji se používá pro stanovení biogenních aminů kombinace HPLC s hmotnostní spektrometrií (HPLC-MS). [35-39]

1.5.4 Kapilární elektroforéza (CE)

Z elektromigračních metod se při stanovení biogenních aminů uplatňuje zejména kapilární zónová elektroforéza (CZE). Stejně jako v případě chromatografických technik, také u elektromigračních metod je nutná derivatizace analyzovaných složek. Pomocí derivatizačního činidla dochází ke vzniku fluoreskujících či absorbujících produktů. Mezi nejpoužívanější derivatizační činidla patří: *o*-ftalaldehyd (OPA), fenylyzotiokyanát (FITC), 9-fluoroenylmetyloxokarbamát (FMOC), dansylchlorid, aj. Analyt může s činidlem reagovat před dělením či až po rozdělení směsi v kapiláře. Je možné využít i derivatizace vzorku přímo v kapiláře („on-column“ nebo „in-capillary“), v níž je obsažen základní elektrolyt dohromady s derivatizačním činidlem (např. OPA) [6, 11, 21, 24, 28, 29, 34]

2 PLÍŠŇOVÉ SÝRY

Sýry jsou mléčné výrobky obsahující důležité složky pro výživu člověka. Můžeme je zařadit mezi hodnotné složky potravy. Hlavní komponenty, které v sýru nalezneme, jsou mléčná bílkovina a tuk. Tyto bílkoviny jsou plnohodnotné, obsahují všechny esenciální aminokyseliny, a jejich množství v sýrech se pohybuje v rozmezí 20 – 30 %. Sýry dále obsahují vitamin A a vitaminy skupiny B, např. riboflavin. Ve velkém množství jsou zde zastoupeny i minerální látky jako železo, hořčík a vápník. [40-46]

Plísňové sýry patří do skupiny měkkých, přírodních, zrajících sýrů. Původ plísňových sýrů není zcela přesně znám. Uvádí se, že plísňové sýry vznikly náhodou, když selka jménem Marie Harellová ve francouzské vesnici Camembert roku 1790 našla domácí vyrobený sýr porostlý bílou plísní. Po ochutnání tohoto sýra zjistila, že výborně chutná. Díky této náhodě vznikla nejstarší značka plísňového sýru Camembert de Normandie, který má ochrannou známku původu. [47, 48] Později se výroba těchto sýrů rozšířila i mimo území Francie.

V tehdejší Československé republice bylo jednou z nejvýznamnějších firem vyrábějících sýry Mlékařské družstvo táborska (MDT), dnes známé jako Madeta. Začal se zde vyrábět sýr s plísní na povrchu pod názvem Hermelín. Tento název vznikl díky tomu, že plíseň na povrchu sýra připomínala kožešinu královského pláště, tzv. hermelín, který byl vyráběn z kůže hranostajů. Hermelín byl později vyráběn i v Sedlčanech, avšak jednalo se spíše o příležitostnou produkci v zimním období. Teprve roku 1957 se zde začaly Hermelíny vyrábět sériově, ale stále pouze v zimním období. Celoroční výroba toho sýra začala teprve roku 1960. Dnes plísňové sýry vyrábí také např. Mlékárna Otinoves s.r.o., Povltavské mlékárny a. s., Niva s. r. o. Dolní Přím, aj. [2, 46-48]

2.1 Rozdělení plísňových sýrů

V dnešní době je na světových trzích mnoho druhů plísňových sýrů. Nejčastěji jsou plísňové sýry sýrů děleny podle typu a růstu plísně. [40, 42, 44-46, 50]

2.1.1 Měkké sýry s plísní na povrchu

Tyto sýry se vyznačují měkčí, krémovitou konzistencí. Na povrchu je typická bílá kůrka. Jsou vyráběny především z kravského mléka a zrají okolo dvou až šesti týdnů. Mezi nejznámější zástupce můžeme zařadit:

- *Camembert de Normandie* – tento sýr s ochrannou známkou původu je vyráběn z nepasterovaného kravského mléka s obsahem tuku v sušině 45 %, doba zrání je alespoň 3 týdny za přítomnosti plísně *Penicillium camemberti*. Má mírně slanou chuť, bochník o průměru 10,5 – 11,0 cm o tloušťce 3 cm. [46, 48, 51, 52]
- *Brie* – oficiální druhy jsou *Brie de Melun* a *Brie de Meaux*, které jsou tvarovány do plochých bochníků o průměru 27 – 37 cm a tloušťce 2,5 – 3,0 cm.

Brie de Melun – jde o plísňový sýr mající měkké roztékající jádro a jeho povrch je porostlý nahnědlou mikroflórou. Zraje alespoň 4 týdny při teplotě 10 °C. Tento typ sýra má výrazné aroma.

Brie de Meaux – vyznačuje se slámovou barvou, pikantní nasládlou chutí s nádechem lískových oříšků. Doba zrání se pohybuje mezi 4 – 10 týdny. [47, 48, 52]

- *Coulommiers* – dříve se řadil mezi sýry typu *Brie*. Je vyráběn z kravského mléka. Z počátku je porostlý bílou plísní, ale po 5 týdnech zrání se mikroflóra mění na načervenalé hnědou. [46-48, 51, 53]
- *Hermelín* – je česká varianta francouzského sýru *Camembert*. [47, 48, 52]

2.1.2 Sýry s plísní v těstě

Jedná se o sýry, které mají plíseň prorostlou až ke středu výrobku. Mají krémovou konzistenci. Při zrání se musí tyto typy sýrů alespoň dvakrát propíchnout jehlou, aby se dovnitř dostal vzdušný kyslík potřebný pro růst a rozvoj plísní. [43, 47, 48, 53]
Do této skupiny plísňových sýrů řadíme např.:

- *Roquefort* – jde o sýr s ochrannou známkou původu. Je vyráběn ze syrového ovčího mléka. Tento sýr obsahuje nejméně 52 % tuku v sušině. Po 3 až 6 měsících zrání má výraznou ostrou vůni. Typická plíseň *Penicillium roqueforti* zraje výhradně v jeskyních Combalou nacházejících se v oblasti Roquefort (Francie), které jsou charakteristické vysokou vlhkostí vzduchu (až 90 %). [46, 48, 52, 53]
- *Niva* – nazývána také sýr s modrou plísní, jedná se o českou obdobu francouzského sýru Roquefort, má smetanovou až sýrově žlutou barvu, na řezu lze pozorovat mramorovou strukturu světlé až zelené ušlechtilé plísně. [43, 47, 53]
- *Gorgonzola* – jeden z nejznámějších italských sýrů. Obsahuje minimálně 48 % tuku v sušině. Vyznačuje se výraznou vůní i chutí; bochník mající průměr 25 – 30 cm a tloušťce 16 – 20 cm. Doba zrání je 2 až 3 měsíce. [46-48, 52, 53]
- *Fourme d'Ambert* – francouzský sýr s ochrannou známkou původu mající velmi výraznou chuť s ořechovou až houbovou vůní. Vyrábí se z kravského mléka o minimálním obsahu tuku v sušině 50 %.[48, 52]
- Dalšími typy jsou *Saint-Agur*, *Danablu*, *Stilton*, aj. [46-48, 52, 53]

2.1.3 Dvouplísňové sýry

Jde o zvláštní typy sýrů jak s plísní na povrchu, tak s plísní v těstě. Obsah tuku v sušině je výrazně vyšší než u ostatních plísňových sýrů. [48, 49, 52] Mezi zástupce dvouplísňových sýrů patří např.:

- *Cambozola* – je vyráběn v Německu. Jedná se o dvouplísňový sýr se smetanovou chutí. Nemá tak výraznou vůni jako ostatní dvouplísňové sýry. Má mírně nažloutlou barvu. Obsah tuku v sušině je 70 %.
- *Vltavín* – jedná se o dvouplísňový sýr české výroby na povrchu s bílou plísní a se zelenou plísní v těstě. Má jemnou konzistenci. S délkou zrání se zvyšuje jeho výrazná chuť, jemnost a lahodnost. [47, 48, 52, 53]

2.2 Technologie výroby plísňových sýrů

Hlavní surovinou pro výrobu plísňových sýrů je kravské mléko. Nedílnou součástí dnešní produkce plísňových sýrů jsou i sýry z ovčího či kozího mléka, které jsou poslední dobou stále častěji používanou surovinou. Při výrobě je velmi důležitý obsah bílkovin, tuků a mléčného cukru. Výroba a zrání těchto sýrů je většinou velmi složitý a zdlouhavý proces, který je specifický pro daný druh sýru. [40-43, 45, 46, 49, 54]

Technologie výroby plísňových sýrů zahrnuje většinou pasteraci mléka. Obvykle se využívá šetrná (krátkodobá) pasterace mléka při 72 – 74 °C po dobu 20 – 30 sekund. Cílem tohoto kroku je zničení vegetativních forem patogenních a technologicky nežádoucích mikroorganismů. [40, 41, 46]

Nepostradatelným technologickým krokem je odstředování mléka pomocí talířové samoodkalovací odstředivky. Získá se mléko s obsahem tuku maximálně 0,05 % a smetana. Poté následuje standardizace, jejímž účelem je úprava množství tuku na požadovanou hranici pro konkrétní typ sýru. Standardizace se provádí přidáním smetany, resp. homogenizované smetany, do pasterovaného odstředěného mléka na požadovanou hranici obsahu tuku v sušině. Tento krok je důležitý, protože podle jeho obsahu v sušině dělíme sýry do několika skupin:

1. vysokotučné – obsah tuku nad 60 %
2. plnotučné – 45 – 60 %
3. polotučné – 25 – 45 %
4. nízkotučné – 10 – 25 %
5. odtučněné – pod 10 % [55]

Dále se mléko upravuje chloridem vápenatým, který má za úkol zlepšit sýřitelnost mléka, a tím zvýšit kvalitu sýřeniny. Poté se přidávají mezofilní (smetanové) kultury, často nazývané jako startovací či primární kultury. Díky jejich působení dochází k fermentaci laktózy a tvorbě kyseliny mléčné, pomocí níž dochází ke snížení pH na hodnotu 5,0 – 4,5, což je nevhodné prostředí pro některé kontaminující mikroorganismy. Dochází i k uvolnění enzymů, které se uplatňují v průběhu zrání a mají vliv např. na organoleptické vlastnosti konečných produktů. Často využívanou mlékařskou kulturou při výrobě plísňových sýrů je *Streptococcus*, *Lactococcus* a *Lactobacillus*. Přidání mezofilních kultur se provádí

30 – 45 minut před syřením. Následně se při výrobě sýrů s plísní na povrchu přidávají sekundární kultury v podobě plísňové suspenze *Penicillium camemberti*. [2, 42, 45-47, 54]

Sýření mléka se provádí přidavkem syřidla, tzv. enzymatické či sladké srážení. Syřidla jsou proteolytické enzymy, které jsou přizpůsobeny kyselému prostředí a mají za následek srážení kaseinu, který po určité době tuhne a tím vzniká sýřenina. V dnešní době je známo několik syřidel. Nejstarším používaným syřidlem je chymosin. Jedná se o enzym, který se nachází v žaludku sajících mláďat savců (např. telat). Používá se i kombinace pepsinu s chymosinem či syřidlo s převahou pepsinu. Dnes lze využít i tzv. rekombinantní chymosin. Získává se z produkčních mikroorganismů *Apergillus niger* a *Escherichia coli* tak, že se do nich vnese gen pro tvorbu chymosinu. Stále častěji se nejen ve výrobě plísňových sýrů uplatňují mikrobiální syřidla, zejména z *Rhizomucor miehei*, *Bacillus subtilis*, aj. [2, 40, 43, 49]

Vzniklá sýřenina se krájí tzv. harfou. Vznikají zrna, která putují na síta, kde se odděluje vedlejší produkt syrovátka. Odkapávání syrovátky probíhá samovolně při teplotě 26 – 28 °C během první hodiny. Poté se teplota snižuje na 20 °C. Vznikají tak sýrová zrna o pH 4,6 – 4,7, která mají nízký obsah minerálních látek. [2, 43]

Vzniklá sýrová zrna putují do formovacího stolu, kde mohou být lisována do požadovaných tvarů nebo jsou dána do forem (tvořítek). Lisování neprobíhá u žádného typu plísňových sýrů, protože by vznikla kompaktní struktura, která by zamezila růstu sekundárních kultur. Odstranění syrovátky probíhá tedy samovolným odkapem. Poté probíhá solení. Jsou používány tři následující způsoby:

- 1) máčení v solné lázni,
- 2) solení do těsta - rozkrájená sýřenina je solena přímo do těsta,
- 3) solení na sucho – sůl je roztírána přímo po povrchu sýru.

V dnešní době je v České republice solení sýrů s plísní na povrchu realizováno nástřikem suché soli na vlhký povrch sýra. [2, 40, 42, 43, 49]

Zrání sýrů je poslední a velmi důležitý krok při výrobě plísňových sýrů. Zrání určuje jakost sýra a velmi výrazně mění jeho složení, vůni a konzistenci zejména díky činnosti sekundárních kultur. Sýry s plísní na povrchu jsou během zrání uloženy ve zracích sklepech, kde musí být udržována vhodná teplota a relativní vlhkost vzduchu. Sýry

se během zrání ve zracích sklepech obrací, aby došlo k rovnoměrnému růstu plísní na povrchu. Musí být dodrženy vhodné podmínky, aby bylo zabráněno vzniku vad sýrů. [2, 40, 47] Na zrání se dále mohou podílet také primární kultury a částečně i enzymy syřidla. [40, 50] Růstu a vývoji sekundárních kultur předchází fermentace laktózy na kyselinu mléčnou. Sekundární kultury se používají díky jejich jedinečným fyziologickým a biochemickým vlastnostem, které startovací kultuře obvykle chybí nebo jsou velmi omezené. Jedná se zejména o halotoleranci, růst v nízkém pH, využití kyseliny mléčné, tvorbu oxidu uhličitého, proteolytickou či lipolytickou aktivitu. Při výrobě plísňových sýrů se dnes využívají plísně *Penicillium camemberti* a *Penicillium roqueforti*: [40, 42, 43, 46, 49, 52, 54, 55]

Penicillium camemberti – tvoří šedobílé kolonie. Používá se např. při výrobě sýrů typu Brie, Camembert a Coulommiers. *P. camemberti* roste při teplotě 5 °C a pH v rozmezí 3,5 – 8,5. Nevhodná teplota, při které nedochází k růstu, je okolo 37 °C. Tato plíseň je schopna růstu i při vyšší koncentraci soli; maximální koncentrace soli je okolo 20 %. [40, 44, 49, 52, 53, 55]

Penicillium roqueforti – tvoří zelenomodré kolonie. Používá se při výrobě sýru s plísní uvnitř, například Danablu, Gorgonzola, Stilton či Roquefort. Optimální teplota růstu je obdobná jako u *P. camemberti*, avšak rozsah pH optimální pro růst je širší (3,0 – 10,5). Je schopen růstu při nižší hladině kyslíku a vyšší hladině oxidu uhličitého, který je přítomný v trhlínách sýrů s plísní uvnitř. Stejně jako *P. camemberti* je odolný vůči vyšším koncentracím soli. [40, 44, 49, 52, 53, 55]

Při zrání plísňových sýrů se mohou uplatňovat i další mikroorganismy, např.:

Geotrichum candidum – podle morfologických a biochemických vlastností je rozdělen do 3 druhů. První druh tvoří smetanově zbarvené kolonie mající podobný vzhled jako kvasinky. Jsou typické nízkou proteolytickou aktivitou. Třetí druh je bíle zbarvený s pravým myceliem a vysokou proteolytickou aktivitou. Mezi druhý druh jsou řazeny ty rody, které nejsou jasně klasifikovány jako druh 1 nebo 3. Optimální rozsah teplot pro jeho růst je 15 – 25 °C a pH okolo 4,5 – 7,5. Tempo růstu se výrazně snižuje při koncentraci soli větší než 5 %. [2]

Brevibacterium linens – striktně aerobní mikroorganismus, který má optimální teplotu růstu v rozmezí 20 – 30 °C při pH 6,5 – 8,5. *Brevibacterium linens* roste při koncentraci soli až 15 %. [2]

2.3 Procesy probíhající při zrání plísňových sýrů

Během zrání plísňových sýrů dochází k biochemickým změnám, které jsou důležité pro konečnou jakost sýra. Jedná se zejména o *glykolýzu*, *lipolýzu* a *proteolýzu*. K těmto biochemickým změnám u plísňových sýrů dochází více než u ostatních druhů sýrů díky bohatému enzymatickému vybavení plísni. [2, 44-46, 53-56]

Glykolýza – probíhá již od vzniku sýřeniny, kdy povrchová mikroflóra začíná využívat kyselinu mléčnou pro svůj růst. Povrchové pH se tím neustále zvyšuje a na konci zrání se blíží k hodnotě 7,0. Vzrůst pH uvnitř sýra je poněkud pomalejší a konečná hodnota pH je okolo 5,5 – 6,0. Toto zvýšení pH výrazně upravuje reologické vlastnosti a vzniká tak sýr krémovité konzistence.

Lipolýza – je důležitý proces, zejména u sýrů s plísní uvnitř, kde se ve vyztáhlém sýru pohybuje obsah volných mastných kyselin okolo 20 %. U sýrů s plísní na povrchu se jejich obsah pohybuje asi kolem 3 – 10 %. Ani tato vysoká množství však nezpůsobují žluklou chuť. Lipolýza probíhá zejména díky činnosti extracelulárních lipáz sekundárních plísňových kultur. [2, 44, 45, 53, 56]

Proteolýza – jedná se o rozklad bílkovin za současného zvyšování obsahu NH_3 a rozpustného dusíku. Obsah amoniaku, který vzniká deaminací volných aminokyselin, ve zralých sýrech dosahuje až 7% celkového dusíku. K degradaci bílkovin dochází zejména díky proteolytické aktivitě *P. camemberti*. Role kvasinek, včetně *Geotrichum candidum*, v proteolýze je zanedbatelná. [2, 45, 53, 54, 56]

Během zrání plísňových sýrů dochází rovněž k vývinu jejich aroma. U sýrů s plísní v těstě dochází během zrání k rozkladu mléčného tuku za vzniku metylketonů. Tyto látky dávají sýrům s plísní v těstě nejen typickou chuť, ale i vůni. [2, 15, 18] U sýrů s plísní na povrchu je za typickou houbovitou vůni zodpovědný okt-1-en-3-ol. Je produkován zejména díky *P. camemberti* z kyseliny linolové a linolenové. Typická květinová vůně sýrů s plísní na povrchu je příkládána alkoholům a jejím esterům, zejména fenyletanolu, který je produkována ihned na začátku zrání činností kvasinek. [2, 44, 45, 54]

PRAKTICKÁ ČÁST

3 CÍL PRÁCE

Cílem teoretické části bylo popsat chemickou strukturu biogenních aminů, jejich vznik a účinky na lidský organizmus a dále popsat metody používané ke stanovení biogenních aminů v potravinách. Dále se teoretická část věnuje plísňovým sýrům, technologii jejich výroby a procesy probíhajícími během jejich zrání a skladování, se zaměřením na sýry s plísní na povrchu.

Cílem praktické části této práce bylo sledovat množství sedmi biogenních aminů (histamin, agmatin, spermin, spermidin, kadaverin, putrescin a tyramin) v sýrech s plísní na povrchu během dvouměsíčního skladování v lednici při teplotě 6 ± 2 °C.

4 MATERIÁL A METODIKA

4.1 Charakteristika vzorků

Pro výzkum byly použity tři rozdílné druhy běžně dostupných plísňových sýrů (Sedlčanský hermelínek, Karel IV. Camembert, Stříbrňák; viz. obrázek 1). Všechny uvedené vzorky patří mezi sýry s plísní na povrchu. V tabulce 3 jsou uvedeny základní údaje výše uvedených zkoumaných sýrů s plísní na povrchu, které uvádí výrobce na obalu. Všechny sýry s plísní na povrchu byly během dvouměsíčního skladování uloženy v lednici při teplotě 6 ± 2 °C.

Obrázek 1 - Stříbrňák, Sedlčanský hermelínek, Karel IV. Camembert



Tabulka 3 - Základní charakteristika plísňových sýrů uvedená výrobcem

Sýr*	Výrobce	Typ výrobku	Složení	Obsah sušiny (% w/w)	Obsah tuku v sušině (% w/w)
H	Povltavské mlékárny, a.s., Sedlčany, Česká republika	zrající sýr s bílou plísní na povrchu	mléko, smetana, jedlá sůl, mlékařská kultura, <i>P. candidum</i>	47	53
C	Polser Sp. z.o.o., Siemiatycze, Polsko	sýr s bílou plísní na povrchu měkký	pasterované mléko, jedlá sůl, mlékařská kultura, <i>P. candidum</i>	51	60
S	MV Oberfranken-West eG, Wiesenfeld, Německo	přírodní zrající sýr s bílou plísní na povrchu	mléko, jedlá sůl, mlékařská kultura, <i>P. candidum</i>	38	30

* H – Sedlčanský hermelínek, C – Karel IV. Camembert, S – Stříbrňák

4.2 Základní chemická analýza

Chemická analýza vzorků byla provedena ihned po nákupu, tj. 0 den skladování. Poté byla provedena chemická analýza po 28 a 56 dnech skladování. Obsah sušiny byl stanoven sušením vzorků při 102 ± 2 °C podle ISO 5534:2004. [57] pH bylo měřeno pomocí pH-metru Gryf 208 L (Gryf, Havlíčkův Brod, Česká republika) se skleněnou elektrodou THETA 90 HC 113 (Gryf, Havlíčkův Brod, Česká republika). Bylo měřeno pH vodného výluhu sýrů při 20 ± 1 °C (10 g vzorku bylo rozetřeno s 30 ml destilované vody). Obsah tuku byl zjištěn acidobutyrometricky podle van Gulika. Hrubé bílkoviny byly stanoveny pomocí zjištění obsahu celkového dusíku s použitím Kjeldahlovy metody. Byl použit destilační přístroj Pro-Nitro A (JP SELECTA, Barcelona, Španělsko). Poté byl vypočítán obsah hrubých bílkovin jako obsah celkového dusíku násobený přepočítávacím faktorem 6,38.

Výsledky získané chemickým rozbořem byly statisticky zhodnoceny použitím parametrického t-testu. Výsledky se významně lišily, pokud $P < 0,05$.

4.3 Extrakce biogenních aminů

Pro extrakci biogenních aminů bylo použito 10 g vzorku s 25 ml 0,1 mol.dm⁻³ HCl. Vše bylo dáno do stomacheru a vzorek byl společně s extrakčním činidlem homogenizován po dobu 7 minut. Po extrakci byl homogenizovaný vzorek odstředován v 50ml zkumavkách v odstředivce Z 300 K (HERMLE Labortechnik GmbH, Wehingen, Německo) při 6500 ot.min⁻¹ při 4 °C po dobu 30 minut. Získaný supernatant byl dále zfiltrován a následně odpařen pomocí rotační vakuové odparky RVO 400 A (Ingos, Praha, Česká republika) do sirupovité konzistence. Po odpaření a zahuštění byl vzorek rozpuštěn v sodno-citrátovém pufru (o pH = 2,2) v 10ml odměrné baňce. Takto připravený roztok byl filtrován přes nylonový membránový mikrofiltr (0.45 μm) a vše bylo vloženo do dávkovacího kotouče Automatického analyzátoru aminokyselin.

4.4 Chromatografická analýza biogenních aminů

Vyextrahované biogenní aminy byly analyzovány pomocí iontově-výměnné chromatografie (kolona 55 × 3,7 mm naplněná iontoměničem OSTION Lg ANB) vybavená postkolonovou derivatizací ninhydrinem a spektrofotometrickou detekcí ($\lambda = 570$ nm). Analýza biogenních aminů byla provedena pomocí Automatického analyzátoru aminokyselin AAA 400 (Ingos, Praha, Česká republika). Použitý teplotní a eluční program při chromatografické analýze je uveden v tabulce 4. Složení použitých pufrů je popsáno v tabulce 5. Standard byl připraven smícháním 7 biogenních aminů (histamin, agmatin, spermin, spermidin, kadaverin, putrescin a tyramin) v sodno-citrátovém pufru (pH = 2,2) o koncentraci 500 mmol.cm⁻³ každého biogenního aminu. Standardy biogenních aminů byly získány ze Sigma – Aldrich (St. Louis, USA). Všechny činidla pro AAA a iontoměnič byly zakoupeny od firmy Ingos (Praha, Česká republika). Dva vzorky každého druhu sýra byly analyzovány každý týden během 8týdenního skladování. Extrakce biogenních aminů byla provedena alespoň dvakrát u každého vzorku.

Tabulka 4 - Teplotní a eluční program použitý při chromatografické analýze

Čas (min)	Teplota kolony (°C)	Číslo pufru
0	65	1
41	45	1
60	45	2
86	45	6
101	45	1
111	65	1
120	65	1

Tabulka 5 - Složení použitých pufrů na 1000 ml

Pufr	1	2	6
Hydroxid sodný (g)	–	–	8
Kyselina citronová (g)	1,55	14,0	–
Citronan sodný (g)	21,0	–	–
Chlorid sodný (g)	5,0	–	–
Chlorid draselný (g)	–	171,5	–
Bromid draselný (g)	41,65	–	–
Hydroxid draselný (g)	–	10,0	–
Isopropanol (ml)	250	–	–

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

Během 8týdenního skladování plísňových sýrů při teplotě 6 ± 2 °C byly sledovány nejen koncentrace biogenních aminů, ale také byly prováděny chemické analýzy pro zjištění obsahu sušiny, TVS, pH a obsahu hrubých bílkovin.

5.1 Chemická analýza vzorku

Po 8 týdnů byla prováděna základní chemická analýza tří komerčních druhů sýrů s plísní na povrchu. Výsledky základní chemické analýzy jsou zaznamenány v tabulce 6.

Hodnoty obsahu sušiny získané chemickou analýzou vzorků se výrazně nelišily od údajů, které uvádí výrobci na obalech analyzovaných plísňových sýrů (tabulka 3). Během 8 týdnů se obsah sušiny, tuku a hrubých bílkovin ve většině případů téměř nezměnil ($P \geq 0,05$).

Hodnoty obsahu tuku, které byly získány acidobutyrometrickou analýzou, po přepočítání na TVS téměř odpovídají údajům, které výrobci uvedli na obalech příslušných plísňových sýrů.

Rozbor však prokázal vzrůst pH u všech tří vzorků plísňových sýrů. Analýza pH, která byla provedena 0. den po nákupu ukázala, že pH plísňových sýrů bylo mírně kyselé až neutrální. Rozbor 56. den po nákupu prokázal, že se pH plísňových sýrů změnilo na neutrální až slabě zásadité. Tento jev se podle Roginskiho a kol. [2] dal očekávat, neboť během zrání a skladování plísňových sýrů dochází k tvorbě amoniaku za současného využití kyseliny mléčné povrchovou mikroflórou plísňových sýrů. Díky tvorbě a hromadění amoniaku v plísňových sýrech došlo k odkyselení plísňových sýrů.

Tabulka 6 - Chemická analýza vzorků po 0, 28, 56 dnech skladování v lednici při $6 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$

Vzorek *	Doba skladování (dny)	Obsah sušiny** (% w/w)	Obsah tuku (% w/w)	Obsah tuku v sušině** (% w/w)	pH ** (-)	Obsah hrubých bílkovin** (% w/w)
H	0	46,88 ± 1,08 ^a	23,8 ± 0,4 ^a	50,77	6,67 ± 0,08 ^a	17,98 ± 0,43 ^a
	28	46,75 ± 0,32 ^a	24,3 ± 0,4 ^a	51,98	7,85 ± 0,05 ^b	18,23 ± 0,25 ^a
	56	47,12 ± 0,94 ^a	24,3 ± 0,4 ^a	51,57	8,03 ± 0,04 ^c	18,63 ± 0,23 ^b
C	0	54,29 ± 0,79 ^a	34,0 ± 0,7 ^a	62,63	7,06 ± 0,10 ^a	18,16 ± 0,17 ^a
	28	54,71 ± 0,59 ^a	34,0 ± 0,7 ^a	62,15	7,64 ± 0,01 ^b	18,75 ± 0,15 ^b
	56	54,95 ± 1,51 ^a	34,5 ± 0,4 ^a	62,78	7,57 ± 0,02 ^c	18,15 ± 0,36 ^a
S	0	40,29 ± 1,38 ^a	13,8 ± 0,4 ^a	34,25	6,76 ± 0,04 ^a	22,60 ± 0,26 ^a
	28	40,98 ± 0,34 ^a	14,0 ± 0,0 ^a	34,16	7,74 ± 0,05 ^b	22,78 ± 0,45 ^a
	56	40,80 ± 0,82 ^a	14,8 ± 0,4 ^b	36,27	7,79 ± 0,05 ^b	22,20 ± 0,42 ^a

* H – Sedlčanský hermelínek, C – Karel IV Camembert, S – Stříbrňák

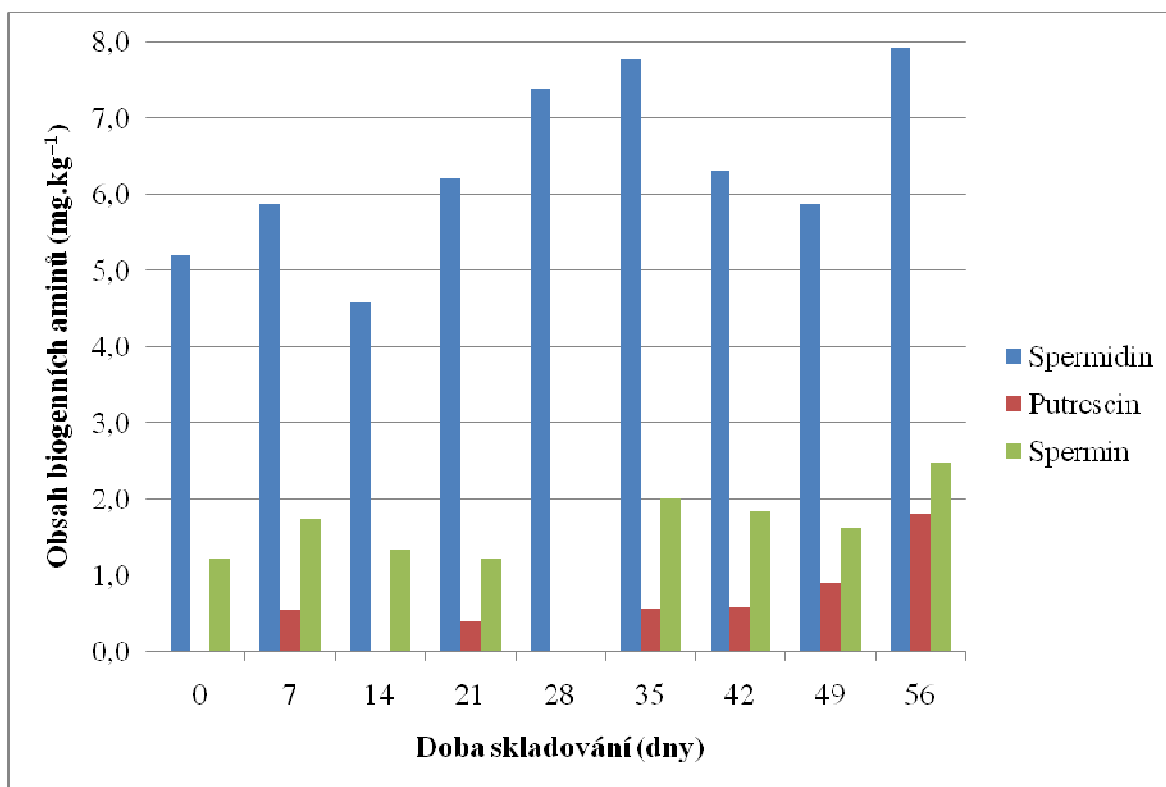
** Rozdílné horní indexy značí signifikantní rozdíl ($P < 0,05$) v obsahu sušiny, resp. pH a tuku, hrubých bílkovin určitého vzorku během skladování

5.2 Chromatografická analýza

Chromatografická analýza vzorku C

Chromatografickou analýzou sýru s plísní na povrchu Karel IV. Camembert bylo zjištěno, že převládajícím biogenním aminem po celou dobu skladování byl spermidin. 0. den skladování byly ve vzorku C detekovány biogenní aminy spermidin a spermin. Po 7 dnech skladování byla zjištěna přítomnost putrescinu. Zatímco obsah spermidinu a sperminu kolísal bez zjevného kolísajícího či rostoucího trendu, množství putrescinu ve vzorku C zpočátku kolísalo, avšak po 42 dnech skladování jeho obsah začal vzrůstat (viz. obrázek 2).

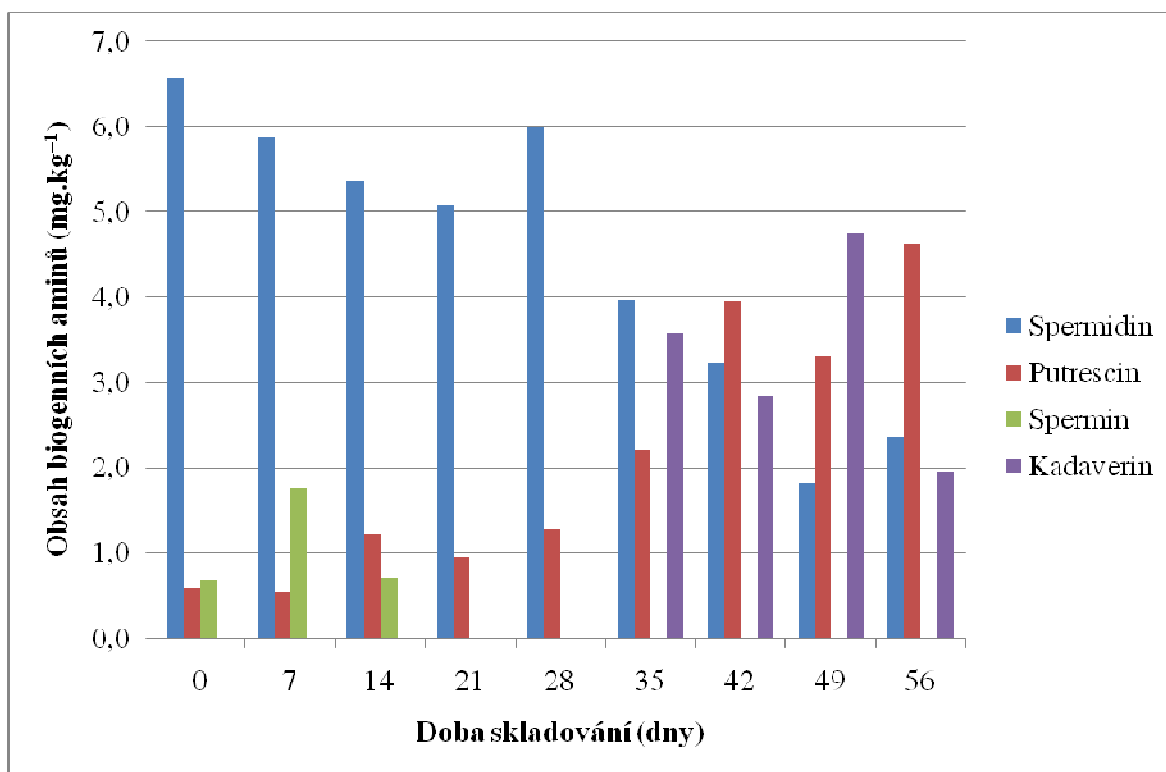
Obrázek 2 - Obsah jednotlivých biogenních aminů (mg.kg^{-1}) během skladování ve vzorku C



Chromatografická analýza vzorku S

Ve vzorku S byly 0. den skladování detekovány 3 biogenní aminy (spermidin, putrescin, spermin). Převažujícím biogenním aminem byl zpočátku spermidin. Jeho obsah se však v průběhu skladování postupně snižoval. Biogenní amin spermin byl detekován pouze v prvních 14 dnech skladování. Obsah putrescinu, stejně jako u vzorku C, zpočátku mírně kolísal, a po 21 dnech skladování jeho obsah vykazoval vzrůstající trend. Putrescin byl v druhé polovině skladování převažujícím biogenním aminem. Po 35 dnech analýzy byl ve vzorku S detekován další biogenní amin – kadaverin. Koncentrace biogenního aminu kadaverinu výrazně kolísala (viz. obrázek 3). V přílohách PI a PII jsou znázorněny chromatogramy standardu biogenních aminů a vzorku S po 14ti dnech skladování.

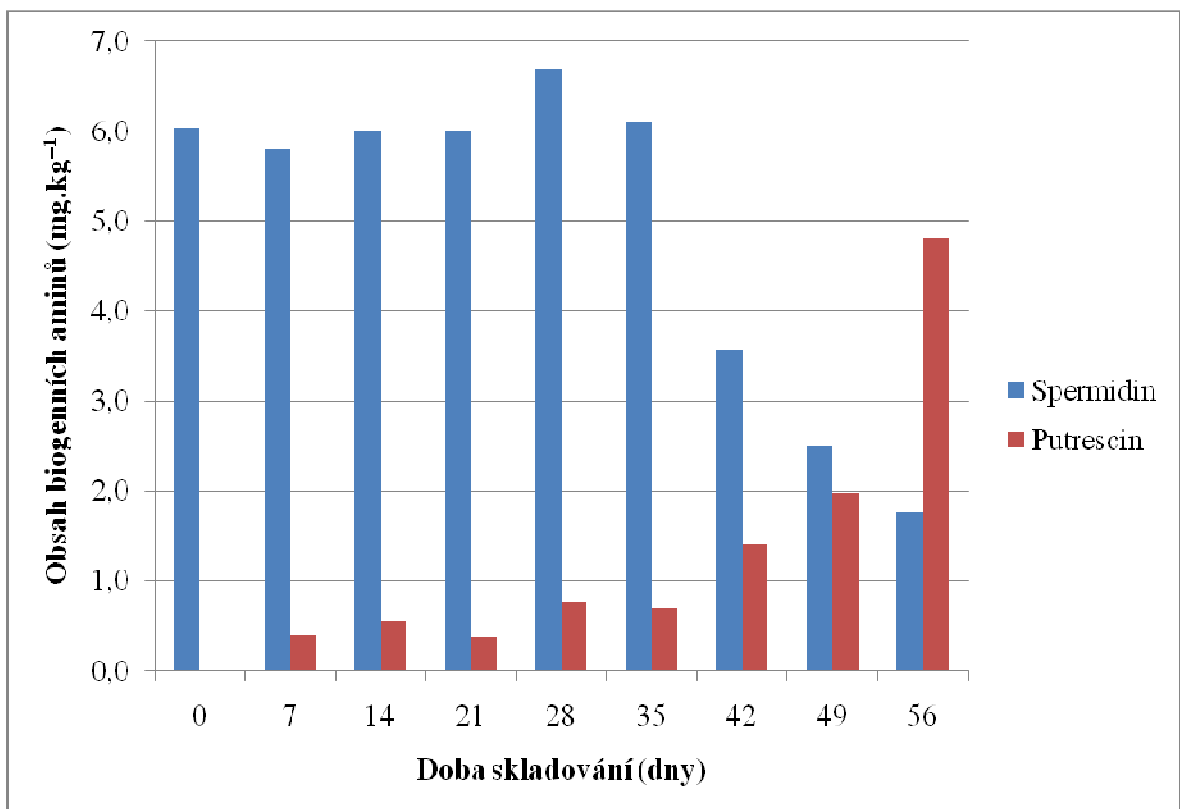
Obrázek 3 - Obsah jednotlivých biogenních aminů ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) během skladování ve vzorku S



Chromatografická analýza vzorku H

Během dvouměsíčního skladování byly ve vzorku H detekovány pouze dva biogenní aminy (spermidin a putrescin). V první polovině dvouměsíční analýzy byl převažujícím biogenním aminem spermidin, ovšem po 28 dnech skladování začal obsah tohoto biogenního aminu postupně klesat. Putrescin byl detekován ve vzorku H až 7. den skladování. Jeho koncentrace zpočátku mírně kolísala, ale po 35 dnech analýzy byl zaznamenán výrazný nárůst obsahu putrescinu. V druhé polovině skladování byl převládajícím biogenním aminem putrescin (viz. obrázek 4).

Obrázek 4 - Obsah jednotlivých biogenních aminů ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) během skladování ve vzorku H



Souhrnná diskuze

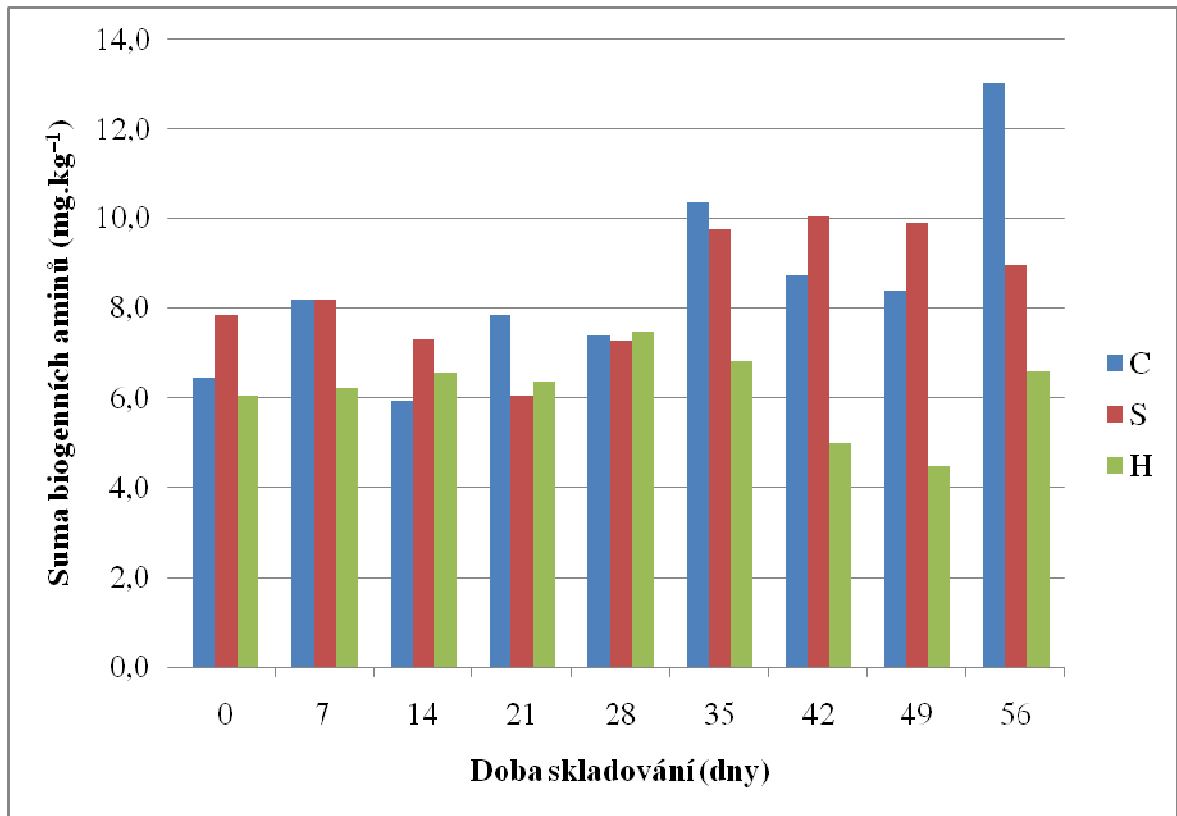
Pomocí chromatografické analýzy tedy bylo zjištěno, že všechny testované vzorky obsahovaly 0. den po nákupu biogenní amin spermidin. Tento biogenní amin byl detekován u všech plísňových sýrů pouze v zanedbatelných koncentracích. [2-5, 15, 20] Koncentrace biogenních aminů během prvních 5 týdnů mírně kolísaly u všech analyzovaných vzorků.

Agmatin, tyramin a histamin nebyly nalezeny ani v jednom ze tří plísňových sýrů během 8 týdenní analýzy. Tyto výsledky se shodují s Karovičovou a kol. [58], kteří během analýzy sýru nezjistili přítomnost biogenního aminu histaminu. Roig-Sagués a kol. [26] zjistili výrazně vyšší koncentrace biogenních aminů ve 44 vzorcích různých typů španělských sýrů. Tyto rozdílné koncentrace biogenních aminů v odlišných typech sýrů mohou být důsledkem především rozdílné doby zrání, technologií výroby, či použitím mlékařských kultur při výrobě sýrů. [3-6]

Celkové koncentrace sledovaných biogenních aminů během skladování jsou zaznamenány na obrázku 5. Obsah biogenních aminů v analyzovaných sýrech po celou dobu skladování mírně kolísal. Na konci analýzy, tj. 56. den skladování, byly koncentrace biogenních aminů v plísňových sýrech téměř zanedbatelné ve srovnání s toxickými hranicemi, které jsou udávány v běžně dostupné literatuře. [2, 3, 4, 10, 11]

Výsledné nízké koncentrace biogenních aminů mohly být díky přítomnosti mikroorganismů s nízkou dekarboxylační aktivitou. Dekarboxylační účinky přítomné mikroflóry sýrů s plísní na povrchu mohly být inhibovány nevhodným prostředím, zejména vyššími pH (viz. tabulka 6). Podle Halász a kol. [15] je pro tvorbu biogenních aminů vhodnější spíše kyselé prostředí. Zásadité prostředí na konci skladování všech tří typů plísňových sýrů spolu s nízkou skladovací teplotou mohlo mít inhibiční účinky na tvorbu biogenních aminů. Omezená tvorba biogenních aminů v analyzovaných plísňových sýrech může být i důsledkem toho, že výrobci dodrželi vhodné hygienické podmínky při samotné výrobě sýrů s plísní na povrchu.

Obrázek 5 - Závislost množství biogenních aminů ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) v sýrech s plísní na povrchu na době skladování; C – Camembert, S – Stříbrňák, H – Hermelínek



ZÁVĚR

Chemickou analýzou bylo zjištěno, že obsah sušiny, tuku, TVS a hrubých bílkovin se ve většině případů výrazně nelišil. Během skladování však došlo k výraznému zvýšení pH testovaných vzorků.

V analyzovaných sýrech byly chromatografickou analýzou detekovány biogenní aminy spermidin, spermin, putrescin a kadaverin. Ani v jednom ze tří sýrů s plísní na povrchu nebyla zjištěna přítomnost histaminu, agmatinu a tyraminu. Ve většině případů byl spermidin kvantitativně nejdůležitějším biogenním aminem. Spermidin byl přítomen ihned po nákupu, ostatní biogenní aminy se tvořily většinou až v průběhu skladování. Obsah putrescinu se v průběhu skladování začal zvyšovat, zatímco obsah spermidinu ve většině případů postupně klesal. I po datu spotřeby, které bylo uvedeno na obalu každého plísňového sýra, byly koncentrace biogenních aminů zanedbatelné. Výsledné koncentrace biogenních aminů ve všech analyzovaných vzorcích sýrů s plísní na povrchu tedy nepředstavovaly toxické riziko pro zdraví lidí, a proto výše uvedené plísňové sýry nejsou z hlediska možné otravy biogenními aminy nebezpečné.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] *Spotřeba potravin a nealkoholických nápojů na 1 obyvatele v ČR v letech 2000 – 2007* [online]. [cit. 20. března 2009]. Dostupné z: [http://www.czso.cz/csu/2008edicniplan.nsf/41fed56aacfa8529c1256f5100518b03/09db7f66bc984114c125750e004008ea/\\$FILE/30040801.pdf](http://www.czso.cz/csu/2008edicniplan.nsf/41fed56aacfa8529c1256f5100518b03/09db7f66bc984114c125750e004008ea/$FILE/30040801.pdf).
- [2] ROGINSKI, H.; FUQUAY, J.W.; FOX, P.F. *Encyclopedia of dairy sciences*. London: Academic press, 2002. ISBN 0-12-227235-8.
- [3] KOMPRDA, T. *Obecná hygiena potravin*. Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, 2004. ISBN 80-7157-757-X.
- [4] KALAČ, P.; KRÍŽEK, M. Biogenní aminy a polyaminy v potravinách a jejich vliv na lidské zdraví. *Potravinářská Revue*, 2005, 2, 40-42.
- [5] VELÍŠEK, J. *Chemie potravin 3*. Tábor: Osis, 1996. ISBN 80-902391-5-3.
- [6] SHALABY, A.R. Significance of biogenic amines to food safety and human health. *Food Research International*, 1996, 29 (7), 675-690.
- [7] VALSAMAKI, K.; MICHAELIDOU, A.; POLYCHRONIEADOU, A. Biogenic amine production in Feta cheese. *Food Chemistry*, 2000, 71 (2), 259-266.
- [8] SANTOS, M.H.S. Biogenic amines: their importance in foods. *Journal of Food Microbiology*, 1996, 29 (2-3), 213-231.
- [9] NOUT, M.J.R. Fermented foods and food safety. *Food Research International*, 1994, 27 (3), 291-298.
- [10] EDWARDS, S.T.; SANDINE, W.E. Symposium: Microbial metabolites of importance in dairy products. *Journal of Dairy Science*, 1981, 64 (12), 2341-2438.
- [11] LANGE, J.; THOMAS, K.; WITTMANN CH. Comparison of a capillary electrophoresis method with high-performance liquid chromatography for the determination of biogenic amines in various food samples. *Journal of Chromatography B*, 2002, 779 (2), 229-239.

- [12] DIČÁKOVÁ, Z.; DUDRIKOVÁ, E.; CABADAJ, R. Biogenic amines in ewe's milk lump cheese and bryndza. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy*, 2004, 27 (1), 53-57.
- [13] ROSYPAL, S., et al. *Nový přehled biologie*. Scientia, 2003. ISBN 80-7183-268-5.
- [14] KALAČ, P.; HLAVATÁ, V.; KRÍŽEK, M. Concentrations of five biogenic amines in Czech beers and factors affecting their formation. *Food Chemistry*, 1997, 58 (3), 209-214.
- [15] HALÁSZ, A.; BARÁTH, Á.; SIMON-SARKADI, L.; HOLZAPFEL, W. Biogenic amines and their production by microorganism in food. *Trends in Food Science & Technology*, 1994, 5 (2), 42-49.
- [16] KOMPRDA, T.; SMĚLÁ, D.; NOVICKÁ, K.; KALHOTKA, L.; ŠUSTOVÁ, K.; PECHOVÁ, P. Content and distribution of biogenic amines in Dutch-type hard cheese. *Food Chemistry*, 2007, 102 (1), 129-137.
- [17] NOVELLA-ROGRÍGUEZ, S.; VECIANA-NOGUÉS, T.; VIDAL-CAROU, C. Biogenic amines and polyamines in milks and cheeses by ion-pair high performance liquid chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2000, 48 (11), 5117-5123.
- [18] BODMER, S.; IMARK, C.; KNEUBÜHL, M. Biogenic amines in foods: Histamine and food processing. *Inflammation Research*, 1999, 48 (6), 296-300.
- [19] GALGANO, F.; SUZZI, G.; FAVATI, F.; CARUSO, M.; MARTUSCELLI, M.; GARDINI, F.; SALZANO, G. Biogenic amines during ripening in 'Semitocco Caprino' cheese: role of enterococci. *International Journal of Food Science & Technology*, 2001, 36 (2), 153-160.
- [20] KALAČ, P.; KRAUSOVÁ, P. A review of dietary polyamines: formation, implications for growth and health and occurrence in food. *Food Chemistry*, 2005, 90 (1-2), 219-230.
- [21] KOMPRDA, T.; NEZNALOVÁ, J.; STANDARDA, S.; BOVER-CID, S. Effect of starter culture and storage on the content of biogenic amines in dry fermented sausage poličan. *Meat Science*, 2001, 59 (3), 267-276.

- [22] Vyhláška Ministerstva zdravotnictví 305/2004 Sb. (platné znění) ze dne 6. května 2004, kterou se stanoví druhy kontaminujících a toxikologicky významných látek a jejich přípustné množství v potravinách. In *Sbírka zákonů České republiky*. 2004, částka 100, s. 6398-6406.
- [23] STANDARDA, S.; VESELÁ, M.; DRDÁK, M. Determination of biogenic amines in cheese by ion exchange chromatography. *Nahrung/Food*, 2000, 44 (1), 28-31.
- [24] ÖNAL, A. A review: current analytical methods for the determination of biogenic amines in foods. *Food Chemistry*, 2007, 103 (4), 1475-148.
- [25] Vyhláška Ministerstva zdravotnictví č. 298/1997 Sb. (zrušena od 1. 3. 2002) ze dne 28. listopadu 1997, kterou se stanoví chemické požadavky na zdravotní nezávadnost jednotlivých druhů potravin a potravinových surovin, podmínky jejich použití, jejich označování na obalech, požadavky na čistotu a identitu přídatných látek a potravních doplňků a mikrobiologické požadavky na potravní doplňky a látky přídatné. In *Sbírka zákonů České republiky*. 1997, částka 99, s. 5474-5799.
- [26] ROIG-SAGUÉS, A.X.; MOLINA, A.P.; HERNÁNDEZ-HERRERO, M.M. Histamine and tyramine-forming microorganisms in Spanish traditional cheeses. *European Food Research & Technology*, 2002, 215 (2), 96-100.
- [27] KOMPRDA, T.; NOVICKÁ, K.; KALHOTKA, L., SMĚLÁ, D. Biogenic amine content in sterilised and pasteurised long-term stored processed cheese. *Czech Journal of Food Science*, 2005, 23 (5), 209-216.
- [28] SMĚLÁ, D.; PECHOVÁ, P.; KOMPRDA, T.; KLEJDUS, B.; KUBÁŇ, V. Chromatografické stanovení biogenních aminů v trvanlivých salámech během fermentace a skladování. *Chemické Listy*, 2004, 98, 432-437.
- [29] OGURI, S. Electromigration methods for amino acids, biogenic amines and aromatic amines. *Journal of Chromatography B*, 2000, 747 (1-2), 1-19.
- [30] LEUSCHNER, R.G.K.; KURIHARA, R.; HAMMES, W.P. Effect of enhanced proteolysis on formation of biogenic amines by lactobacilli du-

- ring Gouda cheese ripening. *International Journal of Food Microbiology*, 1998, 44 (1-2), 15-20.
- [31] LATORRE-MORATALLA, M.L.; BOVER-CID, S.; VECIANA.NOGUÉS, T.; VIDAL-CAROU, M.C. Thin-layer chromatography for the identification and semi-quantification of biogenic amines produced by bacteria. *Journal of Chromatography A*, 2009, 1216 (18), 4128-4132.
- [32] MARCOBAL, A.; RIVAS, B.; de las MUÑOZ, R. Methods for the detection of bacteria producing biogenic amines on foods: A Survey. *Journal of Consumer Protection and Food Safety*, 2006, 1 (3), 187-196
- [33] FERNANDES, J.O.; JUDAS, I.C.; OLIVIERA, M.B.; FERREIRA, I.M.P.L.V.O.; FERREIRA, M.A. A GC-MS Method for quantitation of histamine and other biogenic amines in beer. *Chromatographia*, 2001, 53 (1), 327-331.
- [34] ARCE, L.; RIOS, A.; VALCÁRCEL, M. Selective and rapid determination of biogenic amines by capillary zone electrophoresis. *Chromatographia*, 1997, 46 (3-4), 170-176.
- [35] CASTILLO, M.A.; CASTELLS, R.C. Procedure for the determination of biogenic amines by derivatization with dabsyl chloride and reversed phase liquid chromatography. *Chromatographia*, 2001, 54 (11-12), 711-716.
- [36] PEÑA-GALLEGO, A.; HERNÁNDEZ.ORTEM P.; CACHO, J.; FERREIRA, V. Biogenic amine determination in wines using solid-phase extraction: A comparative study. *Journal of Chromatography A*, 2009, 1216 (15), 3398-3401.
- [37] BOCKHARDT, A.; KRAUSE, I.; KLOSTERMEYER, H. Determination of biogenic amines by RP-HPLC of the dabsyl derivatives. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und Forschung A*, 1996, 203 (1), 65-70.
- [38] BUSTO, O.; VALERO, Y.; GUASCH, J.; BORRULL, F. Solid phase extraction applied to the determination of biogenic amines in wines by HPLC. *Chromatographia*, 1994, 38 (9-10), 571-578

- [39] POLO, C.; MORENO-ARRIBAS, M.V. *Wine Chemistry and Biochemistry*.
Nex York : Springer, 2008. ISBN 978-0-387-74116-1.
- [40] ZIMÁK, E. *Technologie*. Nakladatelství technické literatury, n.p., 1988.
ISBN 04-804-88.
- [41] BŘEZNINA, P.; HRABĚ, J.; KOMÁR, A. *Technologie, zbožíznalectví a
hygienu potravin II.část - technologie, zbožíznalectví a hygiena potravin
živočišného původu*. Vyškov: VVŠ PV, 2001. ISBN 80-7231-076-8.
- [42] KADLEC, P., et al. *Technologie potravin II.*, 1st ed. Praha: VŠCHT, 2002.
ISBN 80-7080-510-2.
- [43] GAJDŮŠEK, S. *Mlékařství II.*, 1st ed. Brno: MZLU, 1998. ISBN 80-7157-
342-6.
- [44] FOX, P.F.; McSWEENEY, P.; COGAN, T.M.; GUINEE, T.P. *Cheese -
major cheese groups*, volume 2. 3rd ed. Academic press, 2004. ISBN 978-0-
1226-3653-0
- [45] FOX, P.F. *Cheese - chemistry, physics and microbiology*, volume 1. 2nd ed.
Springer, 1999. ISBN 978-0-8342-1339-5.
- [46] SCOTT, R.; ROBINSON, R.K.; WILBEY, R.A. *Cheesemaking practice*.
Verlag : Springer, 1998. ISBN 978-0-7514-0417-3.
- [47] *Povltavské mlékárny, a.s.*, „výrobce sýrů“ [cit. 2009-02-03], [online],
dostupný z <<http://www.povltavskemlekarny.cz>>
- [48] TEUBNER, O.; WALDBURG, H.M.; MÜLLER, M.; MÜLLER, W.;
ZACHERL, R. *Velká kniha o sýru*. Bratislava: Perfekt a.s., 1998. ISBN 80-
8046-101-5.
- [49] OSTRÝ, V. "Kulturní plísňe" používané při výrobě potravin. *Potravinářská
Revue*, 2006, 3, 22-26.
- [50] DRDÁK, M. *Základy potravinářských technologií*. 3rd ed. Bratislava : Malé
centrum, 1996. ISBN 80-967064-1-1.
- [51] *Codex standard for Camembert*, Formely codex STAN C-33-1973, revision
2007

- [52] WALTMANN, G. *Sýry - druhy a recepty*. Praha : Euromedia Group, k.s. - Ikar, 2006. ISBN 80-249-0756-9.
- [53] GÖRNER, F.; VALÍK, L. *Aplikovaná mikrobiologie požívatin*. Bratislava : Malé centrum, 2004. ISBN 80-967064-9-7.
- [54] FOX, P.F., et al. *Fundamentals of cheese science*. 2nd ed. Verlag : Springer - Verlag, 2000. ISBN 978-0-8342-1260-2.
- [55] Vyhláška Ministerstva zemědělství č. 77/2003 Sb. (novelizován vyhláškou č. 370/2008 Sb. dne 26. 9. 2008) ze dne 6. března 2003, kterou se stanoví požadavky pro mléko a mléčné výrobky, mražené krémy a jedlé tuky a oleje. In *Sbírka zákonů České republiky*. 2003, částka 32, s. 2488-2516.
- [56] DEETAE, P.; BONNARME, P.; SPINNELR, H.E.; HELINCK, S. Production of volatile aroma compounds by bacterial strains isolated from different surface-ripened French cheeses. *Applied microbial and cell physiology*, 2007, 76 (5), 1161-1171.
- [57] ISO Standard No. 5534:2004. Cheese and processed cheese – Determination of the total solids content (Reference method)
- [58] KARAVIČOVÁ, J.; KAHAJDOVÁ, Z.; ŠIMKO, P.; LUKÁČOVÁ, D. Using of capillary isotachopheresis for determination of biogenic amines and D-isocitric acid in food products. *Nahrung/Food*, 2003, 47 (3), 188-190

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

2-ME	2 – merkaptoetanol
BA	Biogenní aminy (Biogenic amines)
CE	Kapilární elektroforéza (Capillary electrophoresis)
CZE	Kapilární zónová elektroforéza (Capillary zone electrophoresis)
FITC	Fenylizothiokyanát (Fluorescein isothiocyanate)
FMOOC	Fluoroenylmetyloxokarbamát (Fluorenylmethyloxycarbonyl)
GC	Plynová chromatografie (Gas chromatography)
GC-MS	Plynová chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií (Gas chromatography – Mass spectrometry)
HFBA	Kyselina heptafluoromáselná (Heptafluorobutyric acid)
HPLC	Vysokoučinná kapalinová chromatografie (High-performance liquid chromatography)
HPLC-MS	Vysokoučinná kapalinová chromatografie s hmotnostní spektrometrií (High-performance liquid chromatography – Mass spectrometry)
OPA	<i>o</i> -ftalaldehyd
RP-HPLC	Vysokoučinná chromatografie s obrácenými fázemi (Reversed phase high-performance liquid chromatography)
TLC	Tenkvrstevná chromatografie (Thin layer chromatography)
TVS	Obsah tuku v sušině

SEZNAM OBRÁZKŮ

<i>Obrázek 1 - Stříbrňák, Sedlčanský hermelínek, Karel IV. Camembert.....</i>	<i>29</i>
<i>Obrázek 2 - Obsah jednotlivých biogenních aminů (mg.kg⁻¹) během skladování ve vzorku C</i>	<i>35</i>
<i>Obrázek 3 - Obsah jednotlivých biogenních aminů (mg.kg⁻¹) během skladování ve vzorku S.....</i>	<i>36</i>
<i>Obrázek 4 - Obsah jednotlivých biogenních aminů (mg.kg⁻¹) během skladování ve vzorku H.....</i>	<i>37</i>
<i>Obrázek 5 - Závislost množství biogenních aminů (mg.kg⁻¹) v sýrech s plísní na povrchu na době skladování; C – Camembert, S – Stříbrňák, H –Hermelínek.....</i>	<i>39</i>

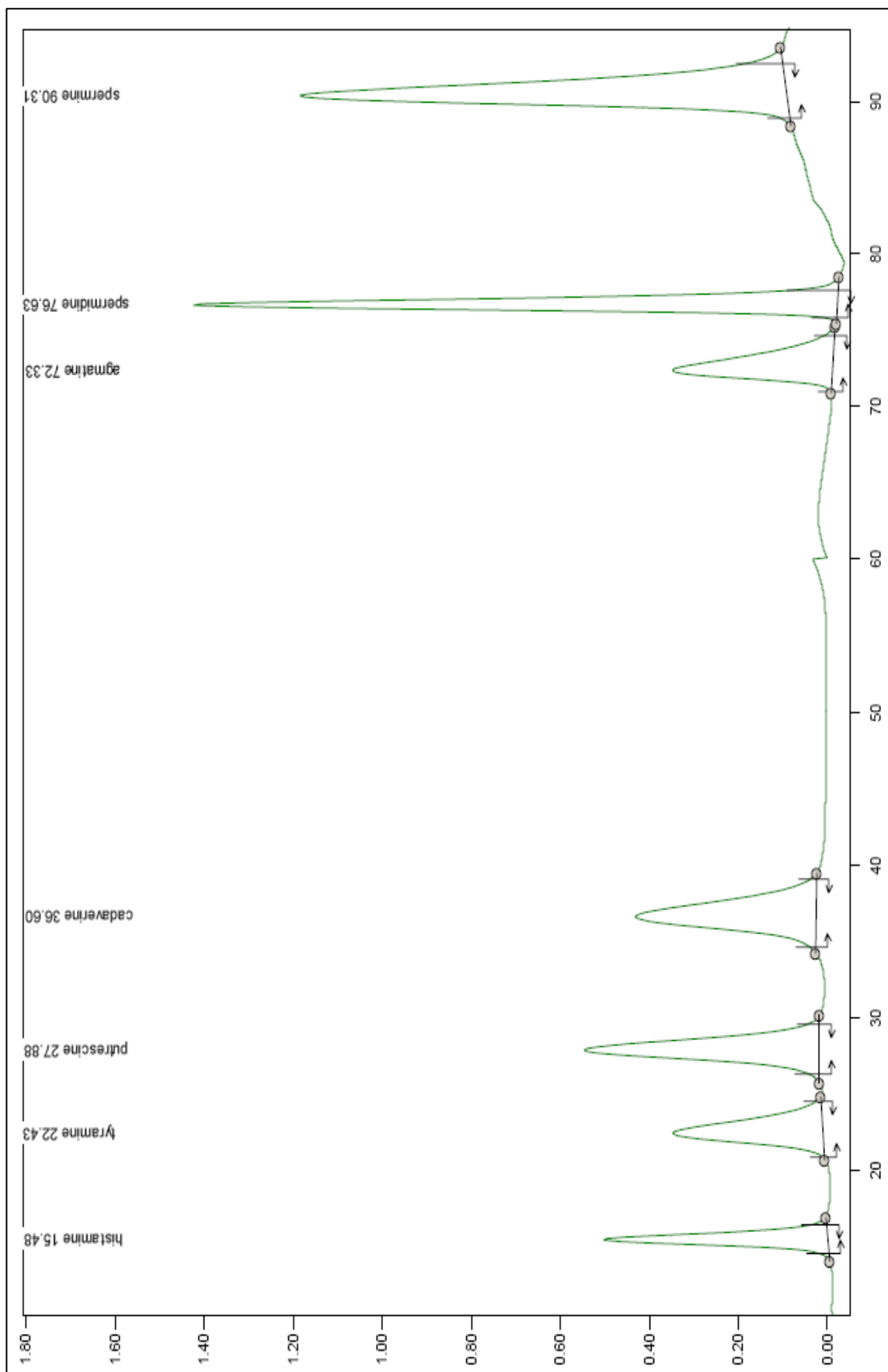
SEZNAM TABULEK

<i>Tabulka 1 - Triviální názvy nejdůležitějších biogenních aminů, jejich systematický název a zařazení do skupin</i>	11
<i>Tabulka 2 - Biogenní aminy, jejich prekurzory a biologický význam.....</i>	12
<i>Tabulka 3 - Základní charakteristika plísňových sýrů uvedená výrobcem.....</i>	30
<i>Tabulka 4 - Teplotní a eluční program použitý při chromatografické analýze</i>	32
<i>Tabulka 5 - Složení použitých pufrů na 1000 ml</i>	32
<i>Tabulka 6 - Chemická analýza vzorků po 0, 28, 56 dnech skladování v lednici při 6 ± 2 °C.....</i>	34

SEZNAM PŘÍLOH

PŘÍLOHA P I: Chromatogram standardu biogenních aminů	51
PŘÍLOHA P II: Chromatogram vzorku S po 14ti dnech skladování.....	52

PŘÍLOHA P I: Chromatogram standardu biogenních aminů



PŘÍLOHA P II: Chromatogram vzorku S po 14ti dnech skladování

