

# **Posouzení aktivity protektivní kultury na vývoj obsahu biogenních aminů v sýrech**

Bc. Natálie Krčmová

---

Diplomová práce 2020



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická

---

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická  
Ústav technologie potravin

Akademický rok: 2019/2020

## **ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE** (projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Natálie Krčmová**  
Osobní číslo: **T18273**  
Studijní program: **N2901 Chemie a technologie potravin**  
Studijní obor: **Technologie potravin**  
Forma studia: **Prezenční**  
Téma práce: **Posouzení aktivity protektivní kultury na vývoj obsahu biogenních aminů v sý-  
rech**

### **Zásady pro vypracování**

1. Charakterizujte význam biogenních aminů, charakterizujte jejich výskyt v potravinách živočišného původu, popište rizika při zvýšeném příjmu biogenních aminů konzumentem.
2. Popište možnosti snížení obsahu biogenních aminů v potravinách.

Forma zpracování diplomové práce: **Tištěná/elektronická**

**Seznam doporučené literatury:**

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

Vedoucí diplomové práce: **doc. Ing. Vendula Pachlová, Ph.D.**  
Ústav technologie potravin

Datum zadání diplomové práce: **17. února 2020**

Termín odevzdání diplomové práce: **15. května 2020**

L.S.

---

**prof. Ing. Roman Čermák, Ph.D.**  
děkan

---

**doc. RNDr. Iva Burešová, Ph.D.**  
ředitel ústavu

Ve Zlíně dne 17. února 2020

## **PROHLÁŠENÍ AUTORA DIPLOMOVÉ PRÁCE**

Beru na vědomí, že:

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

### **Prohlašuji,**

- že jsem diplomové práci pracoval samostatně a použitou literaturu jsem citoval. V případě publikace výsledků budu uveden jako spoluautor.
- že odevzdaná verze diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou obsahově totožné.

Ve Zlíně dne:

Jméno a příjmení studenta:

.....  
podpis studenta

## ABSTRAKT

Diplomová práce, je zaměřena na posouzení možností snížení obsahu biogenních aminů v přírodních sýrech, za použití různých druhů mikroorganismů, které jsou schopny je degradovat. Pro tuto práci bylo vyrobeno 5 modelových šarží sýru holandského typu (sýr gouda), kde byla jako kontrolní šarže použita šarže s producentem biogenních aminů a 4 zbylé šarže obsahovaly společně s producentem biogenních aminů (BA) i odlišné kmeny s potenciálem degradovat BA v reálné potravíně. U vyrobených sýrů byl po dobu 56 denního zrání, sledován obsah biogenních aminů. Kontrolní šarže (pouze s producentem BA) vykazovala nejvyšší obsah BA po celou dobu zrání a už od 1. dne zrání, přesahovala bezpečný obsah pro konzumenta (tj. nad 100 mg/kg). Šarže sýrů s potenciálními degradéry, také vykazovaly vysoký obsah biogenních aminů po celou dobu zrání, ale jejich obsah byl oproti kontrolní šarži nižší. Ze získaných výsledků bylo zjištěno, že nejvyšší schopnost degradace byla prokázána v šarži s degradérem *Lbc. plantarum* D2, kde byl celkový obsah BA ve srovnání s kontrolní šarží 56. den zrání snížen o 31,4 % a také vzorky s *Lbc. plantarum* D1 měl nižší obsah BA 28. den zrání o 27,6 % oproti kontrolní šarži. V modelových sýrech byly detekovány fenylethylamin, putrescin, kadaverin, spermin a tyramin. Ze všech detekovaných BA v modelových sýrech vykazoval nejvyšší obsah tyramin a nejnižší obsah kadaverin.

Klíčová slova: degradace biogenních aminů, mikroorganismy, zrání sýrů

## ABSTRACT

The diploma thesis is focused on an assessment, if it is possible to reduce the biogenic amines in natural cheese by using the selected species of microorganism, which are able to degrade biogenic amines. Five model batches of the Dutch cheese (gouda-cheese) were produced for this purpose, where the batch with a producer of the biogenic amines was used as the control batch. The other four batches contained besides the producer of the biogenic amines and also the different strains with the potential to degrade the biogenic amines in real food. The content of the biogenic amines in the produced cheeses was observed during the ripening for 56 days. During the ripening the control batch (only with the producer of the biogenic amines) showed the highest content of the biogenic amines. It exceeded the safe content for a consumer from the first date of ripening (i.e. over 100 mg/kg). The batches of cheeses with the potential degrader also showed the high content of the biogenic amines during the ripening,

but their contents were lower compared to the control batch. Based on the gained results, it was found, that the highest ability to degrade was proved in the batch with the degrader *Lbc. plantarum* D2. The total content of biogenic amines was reduced by 31,4 % compared to the test batch on the 56th day of ripening, and also samples with *Lbc. plantarum* D1 had lower content of biogenic amines by 27,6 % compared to the control batch on the 28th day of ripening. Phenylethylamine, putrescine, cadaverine, spermine and tyramine were detected in the model cheeses. It was showed, that tyramine had the highest content and cadaverine had the lowest content of all the detected biogenic amines in the model cheeses.

Keywords: degradation of biogenic amines, microorganisms, ripening of cheeses

Nejprve bych chtěla moc poděkovat vedoucí mé diplomové práce paní doc. Ing. Vendule Pachlové, za ochotu, odborné vedení, čas a trpělivost při zpracovávání této práce, cenné rady a vstřícnost při konzultacích.

Dále bych také chtěla poděkovat Mgr. Richardu Adámkovi za pomoc, kterou mi poskytl při vykonávání praktické části a také laborantkám paní Ing. Ludmile Zálešákové a Ing. Olze Vlčkové za pomoc v laboratoři. Poděkování patří i celé mé rodině za podporu a trpělivost při celém mém studiu.

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

# OBSAH

<b>ÚVOD</b> .....	<b>9</b>
<b>I TEORETICKÁ ČÁST</b> .....	<b>10</b>
<b>1 BIOGENNÍ AMINY</b> .....	<b>11</b>
1.1 VÝZNAM A VZNIK BIOGENNÍCH AMINŮ V ORGANIZMECH .....	12
1.2 RIZIKA PRO KONZUMENTA PŘI ZVÝŠENÉM PŘÍJMU BIOGENNÍCH AMINŮ.....	14
1.2.1 Možnosti stanovení biogenních aminů.....	17
1.3 VÝSKYT BIOGENNÍCH AMINŮ V POTRAVINÁCH ŽIVOČIŠNÉHO PŮVODU.....	18
1.3.1 Sýry a ostatní mléčné produkty.....	20
1.3.2 Ryby a rybí výrobky.....	23
1.3.3 Maso a masné výrobky.....	25
<b>2 MOŽNOSTI SNÍŽENÍ OBSAHU BIOGENNÍCH AMINŮ V POTRAVINÁCH</b> .....	<b>26</b>
2.1 VLIV MIKROORGANISMŮ A STARTOVACÍCH KULTUR .....	27
2.1.1 Akumulace biogenních aminů.....	27
2.1.2 Mikroorganismy schopné degradace biogenních aminů.....	28
2.2 VLIV SKLADOVACÍ TEPLoty .....	30
2.3 VLIV KONCENTRACE PŘÍTOMNÝCH SACHARIDŮ A PH.....	31
2.4 VLIV OBSAHU SOLI .....	32
2.5 VLIV KYSLÍKU .....	32
2.6 VYUŽITÍ VYSOKÉHO HYDROSTATICKÉHO TLAKU.....	33
2.7 POUŽITÍ KOŘENÍ A ÉTERICKÝCH OLEJŮ .....	34
2.8 POUŽITÍ OZAŘOVÁNÍ .....	35
2.9 OSTATNÍ MOŽNOSTI.....	36
<b>II PRAKTICKÁ ČÁST</b> .....	<b>38</b>
<b>3 CÍL PRÁCE</b> .....	<b>39</b>
<b>4 MATERIÁL A METODY</b> .....	<b>40</b>
4.1 VÝROBA MODELOVÝCH VZORKŮ SÝRŮ .....	40
4.2 MIKROBIOLOGICKÝ ROZBOR .....	43
4.2.1 Stanovení celkového počtu mezofilních aerobních a fakultativně anaerobních mikroorganismů.....	44
4.2.2 Stanovení plísní a kvasinek.....	45
4.2.3 Stanovení enterokoků.....	45
4.2.4 Stanovení bakterií mléčného kvašení.....	45
4.3 ZÁKLADNÍ CHEMICKÁ ANALÝZA .....	46
4.3.1 Měření pH .....	46
4.3.2 Stanovení obsahu sušiny .....	46
4.3.3 Stanovení obsahu tuku .....	46
4.3.4 Stanovení obsahu soli.....	47
4.4 TEXTURNÍ PROFILOVÁ ANALÝZA.....	47
4.5 STANOVENÍ OBSAHU BIOGENNÍCH AMINŮ .....	48
<b>5 VÝSLEDKY A DISKUZE</b> .....	<b>50</b>



5.1	MIKROBIOLOGICKÝ ROZBOR .....	50
5.2	ZÁKLADNÍ CHEMICKÁ ANALÝZA .....	55
5.2.1	Stanovení pH .....	55
5.2.2	Stanovení obsahu sušiny .....	56
5.2.3	Stanovení obsahu tuku v sušině .....	57
5.2.4	Stanovení obsahu soli .....	58
5.3	STANOVENÍ OBSAHU BIOGENNÍCH AMINŮ .....	59
5.4	TEXTURNÍ PROFILOVÁ ANALÝZA .....	66
5.5	SOUHRNNÁ DISKUZE .....	67
<b>ZÁVĚR .....</b>		<b>75</b>
<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....</b>		<b>77</b>
<b>SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK .....</b>		<b>84</b>
<b>SEZNAM OBRÁZKŮ .....</b>		<b>85</b>
<b>SEZNAM TABULEK .....</b>		<b>86</b>
<b>SEZNAM PŘÍLOH .....</b>		<b>87</b>

## ÚVOD

Biogenní aminy jsou nízkomolekulární organické látky vznikající dekarboxylací aminokyselin nebo při působení transamináz z aminokyselin karbonylových sloučenin. Jejich výskyt je detekován téměř ve všech potravinách, kde vznikají v průběhu biochemických změn při fermentaci nebo, ve kterých jsou obsaženy bílkoviny. Při zvýšené konzumaci mohou být pro člověka škodlivé a mezi nejčastější symptomy patří např. nevolnost, bolest hlavy, zvýšený či snížený krevní tlak a v nejhorších případech anafylaktický šok či zástava srdce. Ale při správném příjmu jsou však pro člověka nepostradatelnou součástí a mohou v těle sloužit například při regulaci krevního tlaku a regulaci tělesné teploty a dále také jako různé prekurzory nukleových kyselin nebo hormonů. Mezi možnosti snížení obsahu biogenních aminů v potravinách, které jsou fermentované nebo obsahují bílkoviny, můžeme zařadit volbu správné startovací kultury, doba a teplota zrání, vliv soli, vliv sacharidů a pH. Dále vliv kyslíku, použití vysokého hydrostatického tlaku, ozařování, použití koření a éterických olejů a další možnosti.

Tato diplomová práce je zaměřena na popis vývoje obsahu biogenních aminů v modelových vzorkách sýrů v průběhu zrání. V těchto modelových vzorcích byly použity různé mikroorganismy schopné jak produkce, tak i degradace biogenních aminů. Cílem této diplomové práce bylo posoudit tuto možnost při snížení obsahu biogenních aminů přidanými mikroorganismy v reálném prostředí vyrobeného přírodního sýra. Současně byl v průběhu zrání sledován také vývoj dalších vybraných parametrů.

## **I. TEORETICKÁ ČÁST**

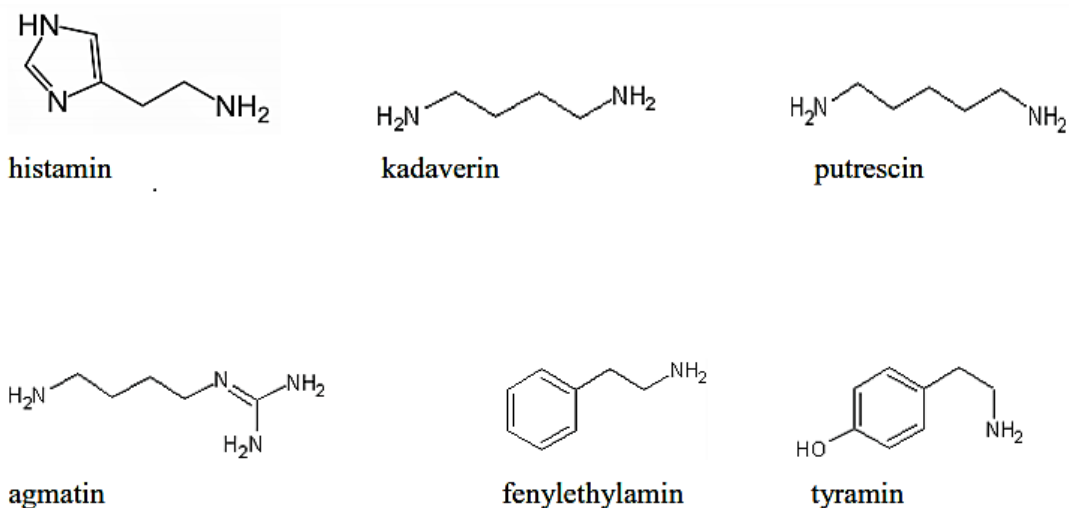
## 1 BIOGENNÍ AMINY

Biogenní aminy (BA) tvoří skupinu aromatických, alifatických nebo heterocyklických bází, které jsou odvozeny od aminokyselin. Vznik biogenních aminů je zapříčiněn působením karboxyláz (dekarboxyláz, která obsahuje kofaktor pyridoxal-fosfát) na jednotlivé aminokyseliny nebo působením transamináz na aminokyseliny a karbonylové sloučeniny. Při dekarboxylaci se odstraní karboxylová kyselina určité aminokyseliny a vzniká daný biogenní amin a oxid uhličitý [1].

Biogenní aminy můžeme rozdělit na endogenní, které jsou produkty metabolismu a jsou v nízkých koncentracích přirozenou složkou téměř všech potravin. Exogenní BA vznikají v potravinách kvůli mikrobiální kontaminaci (dekarboxylací daných aminokyselin), při kvasných procesech a výskyt vyšších koncentrací je v důsledku kažení potraviny. Jak již bylo zmíněno na začátku, biogenní aminy rozdělujeme podle struktury do skupin:

- 1) Alifatických (putrescin (PUT), kadaverin (CAD), spermin (SPM), spermidin (SPD))
- 2) Aromatických (tyramin (TYR), fenylethylamin (PEA))
- 3) Heterocyklických (tryptamin (TRY), histamin (HIS)) [1].

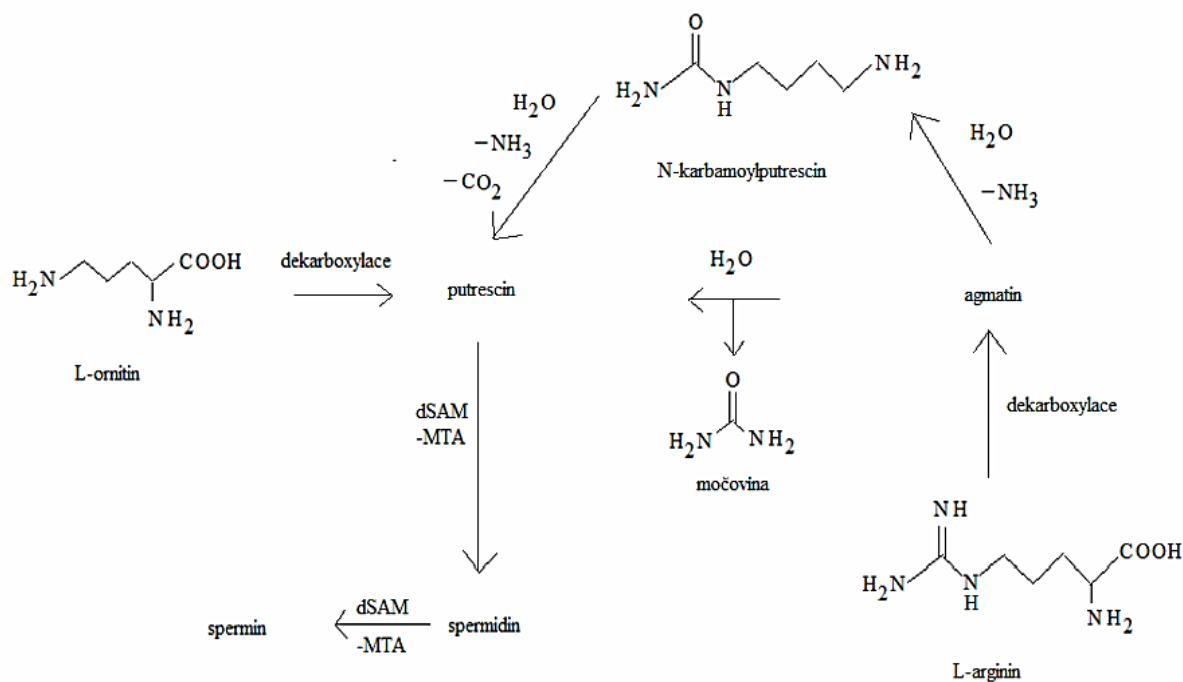
Mezi hlavní se řadí hlavně agmatin, histamin, 2-fenylethylamin, tyramin, tryptamin, kadaverin, putrescin, dopamin, spermin a spermidin a některé jejich struktury jsou zobrazeny na Obrázku 1.



Obrázek 1. Struktury některých biogenních aminů [1]

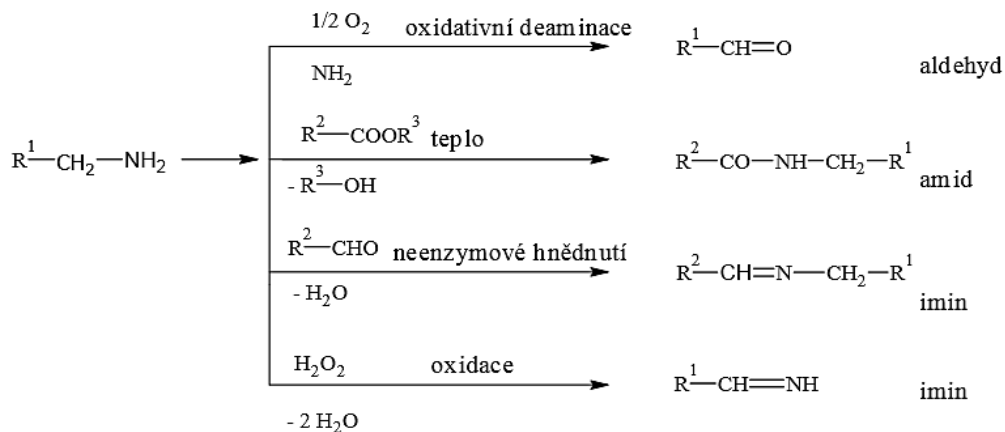
## 1.1 Význam a vznik biogenních aminů v organizmech

Biogenní aminy jsou pro organismus v menších koncentracích nepostradatelné, protože jsou přirozenou součástí nejenom fyziologického metabolismu člověka, ale také i zvířat, mikroorganismů a rostlin. Při vyšších koncentracích však mohou být zdravotně závadné až toxické [3, 4]. Pro živé organismy mohou sloužit jako zdroj dusíku, mohou být prekurzory pro syntézu proteinů, nukleových kyselin, hormonů a alkaloidů (např. rostlinné tropanové alkaloidy) a dále ovlivňují procesy jako je regulace krevního tlaku, regulace tělesné teploty nebo příjem živin [5]. Dané BA mají na organismus různé biologické účinky. Biologicky odlišné účinky ve srovnání s klasickými BA mají např. spermin a spermidin. Jejich specifická cesta vzniku je zobrazena na Obrázku 2. [1]. Tyramin může podléhat oxidaci za vzniku oktopaminu, který byl prokázán u chobotnic (*Octopus* spp.) a má funkci jako neurohormon a neuromodulátor u bezobratlých živočichů a dále také methylaci, kdy vzniká *N*-methyltyramin prekurzor synefrinu (neboli také oxedrin nebo sympatol), který se nachází v hořkých pomerančích a hordeninu, který se nachází v ječmeni. Při oxidaci dopaminu vzniknou katecholaminy živočichů a také hormon dřeně nadledvinek (*R*)-epinefrin, (*L*-norepinefrin, noradrenalin) a při jeho methylaci hormon nadledvinek (*R*)-epinefrin (*L*-epinefrin, adrenalin). Tyto produkty mají význam jako mediátory sympatických nervů. Tyramin je prekurzorem dopaminu a funguje jako lokální tkáňový hormon, zvyšuje krevní tlak a má také vliv na kontrakce hladkého svalstva. Oxidací tryptofanu vzniká serotonin, dekarboxylací tryptamin, ze kterého následně vzniká při oxidaci hormon serotonin a při působení serotonin-*N*-acetyltransferázy vzniká ze serotoninu *N*-acetylserotonin a dále při působení hydroxyindol-*O*-methyltransferázy hormon melatonin. Tyto hormony jsou lokálními tkáňovými a rostlinnými hormony (katecholaminy), dále mají vliv na krevní tlak, správnou peristaltiku střev a také na psychické funkce. [1, 3, 4]. Histamin má funkci jako lokální tkáňový hormon, snižuje krevní tlak, má vliv na sekreci žaludečních šťáv, účastní se anafylaktických šoků a dále funguje při alergických odezvách a při zánětlivých a alergických reakcích funguje jako neurotransmitter v centrálním nervovém systému [3, 4, 6].



Obrázek 2. Biosyntéza sperminu a spermidinu [1]

Methyltransferázy a oxygenázy se uplatňují při transformacích na další biologicky aktivní produkty. Oxidativní deaminací mohou poskytovat aldehydy a kromě enzymových reakcí mohou vznikat další sloučeniny a deriváty biogenních aminů. Při zvýšené teplotě nebo při delší době skladování začnou reagovat s triacylglyceroly a vznikají amidy mastných kyselin. Také jako jiné aminosloučeniny mohou vstupovat do reakcí při neenzymovém hnědnutí a následně se tvoří příslušné iminy, které jsou primárními reakčními produkty. Ty se ale mohou také vytvořit při oxidaci aminů. Biogenní aminy jako jsou např. putrescin, histamin, fenylethylamin mohou také reagovat s bílkovinami za vzniku  $\beta$ -*N*-substituovaných derivátů diaminopropionové kyseliny. Reakce oxidů dusíku a sekundárních aminů dává možnost vzniku karcinogenních nitrosaminů. Tyto interakce dokazují, že BA jsou reaktivními látkami. Hlavní reakce vznikající při oxidaci, působením tepla nebo při neenzymovém hnědnutí jsou uvedeny Obrázku 3. [1, 2].



Obrázek 3. Hlavní reakce při vzniku BA [1, 2]

Pomocí dekarboxylace vznikají některé BA, které již byly zmíněny. Konkrétně arginindekarboxylázou vzniká z argininu agmatin. Z ornithinu vzniká působením ornithindekarboxylázy putrescin. Putrescin pomocí dekarboxylace ornithinu a zároveň agmatinu za katalýzy agmatinázou je poté výchozí sloučeninou pro vznik sperminu a spermidinu. Tyto reakce katalyzují sperminsyntázy a spermidinsyntázy spolu s S-adenosyl-L-methioninem a probíhají u savců i bakterií. Histidindekarboxylázou vzniká z histidinu histamin [1, 4]. Taylor a kol. [13] identifikoval 112 druhů bakterií produkující histamin, u kterých je známo, že obsahují histidin dekarboxylázu. Počet bakteriálních kmenů, které mají tento enzym, je poměrně nízký; nejvíce jsou to někteří členové *Enterobacteriaceae*, *Clostridium* a *Lactobacillus*. Enterické bakterie, konkrétně *Morganella morganii*, určité kmeny *Klebsiella pneumoniae* a několik kmenů *Hafnia alvei*, jsou významnými producenty histaminu hlavně v rybích produktech [13].

Fenylalanindekarboxylázou vzniká z fenyalaninu 2-fenylethylamin. Z tyrosinu pomocí tyrosindekarboxylázy tyramin. 3,4-dihydroxyalanin (DOPA) a tryptofan při působení dopa-dekarboxylázy nebo tryptofandekarboxylázy poskytují dopamin či tryptamin. Lysin-dekarboxyláza dává vzniku kadaverinu (1,5-diaminopentanu) z lysinu [1, 4].

## 1.2 Rizika pro konzumenta při zvýšeném příjmu biogenních aminů

Jak již bylo popsáno, biogenní aminy jsou při určitém příjmu pro člověka potřebné, ale při vyšším příjmu se biogenní aminy mohou projevat jako:

- psychoaktivní: působí jako přenašeč v CNS (centrální nervový systém)

- vasoaktivní: působí přímo nebo nepřímo na vaskulární (cévní) systém a ty se dále dělí na:
  - vasokontraktibilní (tyramin)
  - vasodilatační (histamin) [1]

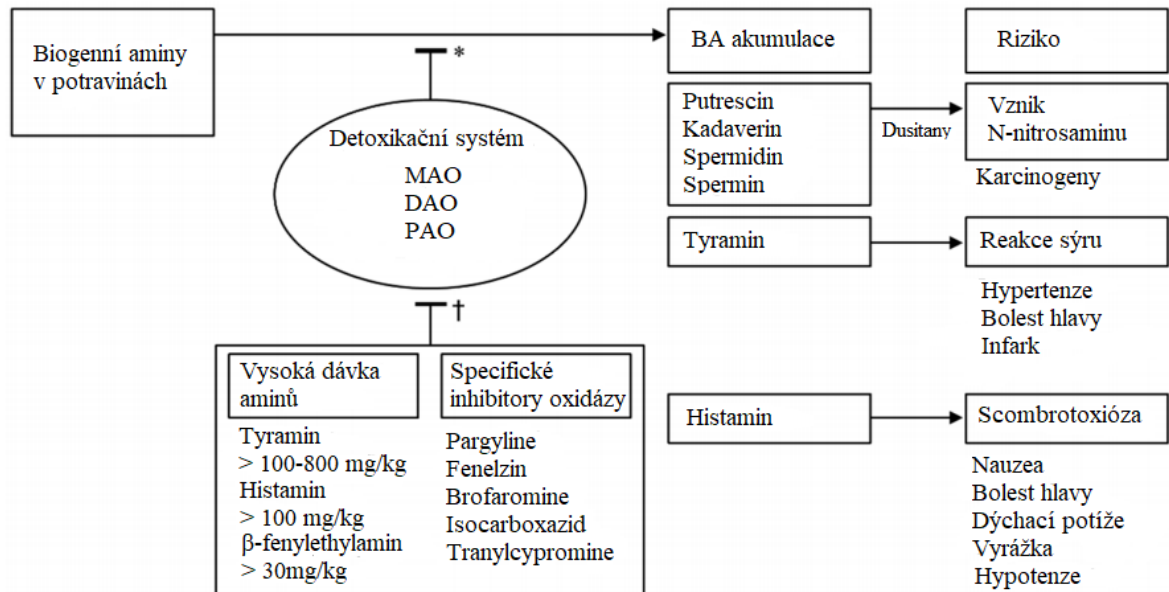
Toxický účinek je třeba hodnotit nejen z přítomnosti daného biogenního aminu, ale také množstvím a kvalitou zkonsumované potraviny a přítomností jiných toxických látek. Mezi více toxické se řadí hlavně histamin, kadaverin a putrescin. Při vysoké konzumaci biogenních aminů se mohou objevovat charakteristické symptomy, mezi které patří kožní vyrážka, kopřivka, otoky. Gastrointestinální potíže jsou charakterizovány nevolností, zvracením, průjmem, břišními křečemi apod. Mezi další příznaky zvýšeného příjmu histaminu patří bolesti hlavy (hlavně tyramin), bušení srdce, mravenčení, návaly horka, pocení, pálení v ústech, nízký tlak (způsobeno histaminem) nebo vysoký tlak (způsobeno tyraminem) [13].

Biogenní aminy a jejich toxické účinky mohou být odbourávány ve střevech díky enzymům, které má člověk jako svoje vlastní detoxikační mechanismy. Jsou to aminooxidázy jako monoaminooxidáza (MAO) a diaminooxidáza (DAO). Při odbourávání sperminu a spermidinu byla popsána polyaminooxidáza (PAO). Bylo zjištěno, že tyto enzymy MAO a DAO, které jsou přítomny ve střevním traktu, zabraňují absorpci nemetabolizovaného histaminu do oběhu. [13]. Tyto enzymy hrají klíčovou roli v detoxikačních drahách monoaminů a diaminů včetně tyraminu, fenylethylaminu, histaminu, kadaverinu, putrescinu a tryptaminu. Spermidin a spermin, jejichž metabolické dráhy jsou vzájemně zaměnitelné, podléhají oxidační biodegradaci prostřednictvím cest zahrnujících polyamin oxidázy (PAO) a spermidin / spermin-N-acetyltransferázy (SSAT), čímž se získá zpět putrescin, který je zase detoxifikován prostřednictvím specifických drah buď pomocí DAO nebo MAO. U lidí je rozsah detoxikační aktivity BA genetickou vlastností, jejíž výkonnost se u jednotlivců značně liší. Přesto ani nejvyšší detoxikační aktivita nezajistí absolutní ochranu před toxikologickými účinky BA [33]. Tyto enzymy jsou však značně ovlivněny řadou faktorů, mezi které patří především přítomnost inhibitorů. Hlavními inhibitory, které snižují tyto enzymy, jsou určitá léčiva (psychofarmaka apod.) a také alkohol nebo vyskytující se alergie. Enzymový systém je také omezen při vysoké koncentraci biogenních aminů a již není schopen je eliminovat. Pro člověka se považují za nebezpečné koncentrace histaminu vyšší než 500-1000 mg / kg, které mohou vyvolat i anafylaktický šok [1, 3, 18].

Diaminoxidázy patří k rozšířené třídě enzymů souvisejících s polyaminovým metabolismem. Enzym diaminoxidáza se podílí na metabolismu polyaminů, a proto je nezbytný pro



růst a replikaci všech živých buněk. Katalyzují oxidační deaminaci řady primárních diaminů. Naila a kol. (2015) [24] ukázali novou metodu, jak zabránit otravě z potravin obsahující histamin pomocí diaminoxidázy a degradovat histamin v Rihaakuru - vařené rybí pastě z Malediv [24].



Obrázek 4. Detoxikační a toxikologická rizika biogenních aminů. \*: Metabolická inaktivace biogenních aminů oxidační deaminací oxidázami. †: Zneschopnění střevního detoxikačního systému saturací biogenními aminy nebo inhibicí antidepresivy. BA: biogenní aminy [23]

Tyramin patří mezi nejprostudovanější biogenní amin a to kvůli jeho fyziologickým účinkům na člověka. Jeho toxicita závisí hlavně na přijatém množství, na přítomnosti jiných BA, které násobí toxický účinek, ale také na celkovém zdravotním stavu jedince. Mezi hlavní příznaky otravy tyraminem patří hypertenze, bolest hlavy a migrény [20, 21]. Zvýšení krevního tlaku v důsledku toxicity tyraminu může způsobit srdeční selhání nebo krvácení do mozku [27].

Histamin je silná biologicky aktivní chemická látka a v těle může vykonávat mnoho reakcí. Histamin projevuje své toxické účinky interakcí s receptory, které jsou na buněčných membránách (H1, H2, H3 a H4). Tyto histaminové receptory jsou exprimovány na různých typech buněk a pracují různými signálními cestami, což vede k mnoha biologickým odpově-

dím [24]. Nejběžnější příznaky otravy histaminem vyplývají z působení histaminu na kardiovaskulární systém, který zahrnuje oba tyto receptory. Histamin způsobuje dilataci periferních krevních cév, kapilár a tepen a to má za následek hypotenzi, návaly horka a bolesti hlavy. Histaminem vyvolaná kontrakce hladkého svalstva ve střevě je zprostředkována H1 receptory a může způsobovat břišní křeče, průjem a zvracení. Sekrece žaludeční kyseliny je regulována histaminem prostřednictvím receptorů H2, které jsou umístěny na parietálních buňkách, ale není známo, zda tento účinek odpovídá za některé z příznaků pozorovaných v případě otravy histaminem [13].

Histamin ale také zastává roli antigenu a je uvolňován z bazofilních granulocytů a mastocytů při způsobené alergické reakci. Zčervenání kůže a zvýšená propustnost kapilár a tvorba podlitin je způsobena tím, že je histamin uvolněn do kůže, protože je schopen síťovat molekuly protilátek IgE na povrchu mastocytů a tím dochází k exocytóze z buněk [20].

Putrescin je jedním z nejhojnějších a nejčastěji se vyskytujících polyaminů v mléčných výrobcích, kde je produkován různými startérovými BMK nebo doplňkovými startovacími kulturami nebo mikrobiálními kontaminanty. Linares a kol. (2013) zaznamenali koncentrace až 2,5 g putrescinu na kg sýra [33, 34].

Informace o toxicitě putrescinu a kadaverinu jsou vzácné a k dispozici doposud nejsou žádné údaje o odpovědi na dávku u člověka. Byla zveřejněna pouze jedna studie z pokusu na zvířatech, ve které nebyla pozorována hladina nežádoucích účinků NOAEL (no observed adverse effect level) 2000 ppm (180 mg/kg tělesné hmotnosti / den) a ta byla stanovena u krys [25].

Vzhledem k tomu, že tvorba biogenních aminů závisí na různých okolních podmínkách ovlivňujících mikrobiální vývoj, lze v podobných surovinách nalézt různé úrovně biogenních aminů, a je proto důležité znát kritické faktory ovlivňující jejich tvorbu, aby se kontrolovala tvorba těchto aminů. Například se uvádí, že zatímco k tvorbě putrescinu dochází v důsledku mikrobiálního vývoje za nesprávných skladovacích podmínek, tak spermin a spermidin se vyskytují přirozeně v potravinách, a proto nejsou spojovány pouze s mikrobiálním znehodnocením [26].

### 1.2.1 Možnosti stanovení biogenních aminů

Spolehlivé analytické výsledky jsou důležité pro kontrolu kvality a bezpečnost spotřebitele. Pro kvantifikaci obsahu biogenních aminů v potravinách se používají metody založené na

chromatografii. Je to plynová chromatografie (GC), tenkovrstvá chromatografie (TC), kapilární elektroforéza (CE) a vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC). HPLC je metoda, která se používá nejčastěji pro kontrolu obsahu biogenních aminů. Existují i nové molekulární metody, které jsou založeny na hybridizaci DNA a na PCR amplifikaci a jsou používány pro citlivou detekci, která je navíc rychlá a určí biogenní aminy různých bakterií, které je produkují. Cílem těchto metod je dosažení včasné detekce obsahu biogenních aminů a předejít tak otravám způsobené např. histaminem [14, 15].

Nová metoda založená na kapalinové chromatografii (LC) a tandemové hmotnostní spektrometrii (MS / MS) s použitím analyzátoru trojitého kvadrupolu (QqQ) byla uvedena pro analýzu biogenních aminů, jako je kadaverin, histamin, fenylethylamin, putrescin, spermin, spermidin, tyramin a tryptamin v rybích tkáních [24].

Infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací (FTIR) je všestranným nástrojem v oblasti bezpečnosti potravin se širokou škálou aplikací včetně detekce aminů a amoniaku v akvakulturním průmyslu. Pokročilými technikami je FTIR spektrometr s ATR technikou - technika zeslabeného úplného odrazu (FTIR-ATR). FTIR-ATR lze také použít ke studiu biogenních aminů a těkavých aminů. Dále je to Fourierova transformační infračervená fotometrická akustická spektroskopie (FTIR-PAS) [24].

V současné době byly k detekci biogenních aminů a těkavých aminů v produktech z akvakultury použity různé tradiční analytické nástroje, jako jsou chromatografie, kolorimetrické testování, UV-VIS spektroskopie, hmotnostní spektroskopie, elektroforéza, NMR a další účinné nástroje. Vzhledem k tomu, že tyto analytické nástroje jsou zdoluhavé a postupy předběžného vzorkování byly časově náročné, zvýšila se poptávka po nástroji, který bude mít rychlou odezvu. V tomto kontextu byly navrženy pokročilé nástroje, jako jsou biosenzory s minimálním odběrem vzorků a předúpravou, tak aby detekovaly a monitorovaly aminy s minimálním analytickým časem a větší citlivostí [24].

### 1.3 Výskyt biogenních aminů v potravinách živočišného původu

Biogenní aminy jsou přirozenou součástí téměř všech potravin (rostlinných i živočišných) jako běžné produkty metabolismu. Potraviny podle vzniku daných biogenních aminů lze rozdělit do dvou skupin.

1. Potraviny nefermentované: zde mohou být biogenní aminy ukazatelem mikrobiální kontaminace a jejich množství také ukazatelem kvality. Vznik je zde způsoben působením kontaminující mikroflórou. Vyskytují se hlavně v rybách a rybích výrobcích a také v mase v průběhu jejich skladování.
2. Potraviny fermentované: biogenní aminy se zde tvoří hlavně při fermentačních procesech a při průběhu jejich skladování. Patří sem hlavně fermentované ryby a rybí výrobky, masné výrobky, déle zrající sýry a z potravin rostlinného původu jsou to alkoholické nápoje (víno, pivo) a kysaná zelenina [1, 7, 9, 18].

Syntéza BA je možná, pokud jsou splněny tři hlavní podmínky:

- dostupnost aminokyselin v substrátu (potravině)
- přítomnost mikroorganismů s danou dekarboxylační aktivitou
- prostředí příznivé pro dekarboxylační aktivitu

Tyto podmínky závisí na několika faktorech, jako je zpracování mléka (pasterace), použití daných startovacích kultur, koncentrace NaCl, dále čas, teplota zrání a konzervace nebo pH teplota a technologické procesy po zrání [7].

Současně používané startovací kultury v potravinách by neměly vykazovat vysokou dekarboxylační aktivitu aminokyselin nebo pouze velmi nízkou pro zamezení vzniku BA. Dané významné mikroorganismy a jejich produkované biogenní aminy v potravinách živočišného původu jsou uvedeny v Tabulce 1 [1].

Tabulka 1. Významné mikroorganismy produkující biogenní aminy [1]

Potravina	Bakterie	Produkované aminy
Sýry	<i>Lactobacillus buchneri</i> , <i>L. bulgaricus</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>Enterococcus faecium</i> , <i>Streptococcus mitis</i> , <i>Paenibacillus macerans</i> , <i>Propionibacterium</i> spp.	histamin, kadaverin, putrescin, tyramin, fenyletylamin, tryptamin
Ryby	<i>Morganella morganii</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Hafnia alvei</i> , <i>Proteus mirabilis</i> , <i>Proteus vulgaris</i> , <i>Clostridium perfringens</i> , <i>Enterobacter aerogenes</i> , <i>Bacillus</i> spp., <i>Staphylococcus xylosus</i>	histamin, tyramin, kadaverin, putrescin, agmatin, spermin, spermidin
Maso a masné výrobky	rody <i>Pediococcus</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Micrococcus</i> , čeleď <i>Enterobacteriaceae</i>	histamin, kadaverin, putrescin, tyramin, fenyletylamin, tryptamin

Pro některé druhy potravin a také pro různé země jsou stanoveny limitní obsahy biogenních aminů. V roce 1996 navrhl Shalaby pokyny pro obsah histaminu v rybách takto: <50 mg/kg (bezpečné pro spotřebu), 50–200 mg/kg (pravděpodobně toxické), 200–1000 mg/kg (pravděpodobně toxické), > 1000 mg/kg (toxický a nebezpečný pro lidskou spotřebu) na základě přezkumu předpisů a jiné literatury. V té době byly hlášeny toxické dávky 100–800 mg/kg tyraminu a 30 mg/kg  $\beta$ -fenylethylaminu a 100 mg histaminu na kg potravy a 2 mg histaminu na litr alkoholického nápoje byly navrženy jako horní limity pro lidskou spotřebu. Kromě toho na celém světě nenajdeme žádnou vládní legislativu ani pokyny týkající se obsahu biogenních aminů ve fermentovaných sójových potravinách [23]. Dále vzorek s obsahem histaminu 100 mg / kg může způsobit intoxikaci, 100 – 800 mg/kg tyraminu může způsobit tzv. reakci na sýr a i 6 mg, pokud pacient užívá léky s účinkem MAO a dále 30 mg/kg 2-fenylethylaminu může vyvolat migrénu [18].

Dále podle Brinka je již množství 100 mg/kg biogenních aminů v produktu považováno za rizikové [12]. Kvalitativní posouzení rizik biogenních aminů, které se vyskytují u fermentovaných potravin, provedl panel pro biologické nebezpečí (BIOHAZ) EFSA (neboli Evropský úřad pro bezpečnost potravin). Panel BIOHAZ použil údaje z odborné literatury a díky nim dospěl k závěru, že se ve fermentovaných potravinách kumulují biogenní aminy. Tento proces je komplexní a rovněž je ovlivňován mnoha faktory a jejich interakcemi, přičemž kombinace vlivů jsou specifické, četné a variabilní pro daný produkt [9].

Pro Českou republiku platí nařízení komise (ES) č. 2073/2005 o mikrobiologických požadavcích na potraviny a také vyhláška 305/2004 Sb. (platné znění), která stanovuje druhy kontaminujících a toxikologicky významných látek a jejich přípustné množství v potravinách, stanovuje přípustné množství histaminu v rybách a produktech rybolovu na 100 mg/kg produktu. Tento limit se může ve dvou vzorcích z devíti z jedné šarže překročit až do hodnoty 200 mg/kg. Legislativa dále neurčuje výrobcům deklarovat obsah biogenních aminů na obale [10, 11].

### 1.3.1 Sýry a ostatní mléčné produkty

Zrání sýrů zahrnuje komplexní řadu biochemických procesů, které zahrnují degradaci laktózy, lipolýzu a nejsložitější proces - katabolismus proteinů nebo-li proteolýzu. Proces zrání se provádí pomocí startérových BMK, ale také pomocí sekundární mikrobioty, která zahrnuje nestrterové BMK, propionové bakterie, plísně a kvasinky. K odbourávání proteinů přispívají hlavně startérové bakterie, zatímco nestrterové BMK jsou zodpovědné za

peptidolýzu a uvolňování volných aminokyselin. Některé „modré sýry“ zpracované ze syrového mléka vykazují vysokou hladinu proteolytické aktivity v důsledku působení některých plísní, což koreluje s vysokou akumulací BA. Zrání a proteolýza jsou velmi důležité faktory ovlivňující hromadění BA v sýrech. Rychlost proteolýzy se zvyšuje s dobou zrání, což také vede k akumulaci volných aminokyselin, které slouží jako substrát pro dekarboxilaci, ze kterých následně vznikají a akumulují se BA. Obecně platí, že čím delší je proces zrání, tím vyšší je obsah BA [7].

Sýry jsou jednou z potravin, ve kterých se mohou vyskytovat nadměrná množství biogenních aminů. Po rybách jsou sýry druhou nejčastější potravinou spojenou s otravou histaminem a to hlavně kvůli *Lactobacillus buchneri*, která disponuje enzymem histidindekarboxylázou. Jak již bylo zmíněno z histidinu za pomoci dekarboxylace vzniká histamin. Sýry jsou ideální potravinou pro vznik biogenních aminů, které vznikají převážně dekarboxylací aminokyselin [7, 13, 18]. Při působení proteáz a peptidáz, které jsou v sýrech přítomny tak dochází k proteolýze kaseinu a k následné tvorbě volných aminokyselin a z nich nadále BA. Ovlivnění mikroorganismů při tvorbě biogenních aminů mohou faktory jako je přítomnost volných aminokyselin, volba správné skladovací teploty, koncentrace solí a pH. Také je velmi důležitý i výběr správné startovací kultury s nízkou dekarboxylační aktivitou [16, 17, 18]. Výroba mléčných potravin není sterilní proces a producenti BA pravděpodobně vstoupí do potravinového řetězce jako nestarterové BMK, které jsou v syrové surovině. Sýr představuje ideální matici pro tvorbu BA, protože není sterilní a proteolýza kaseinu zajišťuje dostupnost volných aminokyselin jako substrátu. Proto sýr může dosáhnout koncentraci BA až do 2000 mg/kg [7]. Vyšší obsahy biogenních aminů v sýrech mohou být také způsobeny i nevhodným výběrem mléka, které mělo špatnou kvalitu nebo také nehygienickými podmínkami, kde byl sýr vyráběn [16, 17, 18]. Hlavní mikrobiologické skupiny přítomné v syrovém mléce jsou mezofilní bakterie mléčného kvašení (BMK) jako enterokoky, laktokoky, laktobacily, leukoocoky, dále enterobakterie a psychrotropní bakterie, jako je *Pseudomonas* sp. nebo *Acinetobacter* sp. Zástupci těchto mikrobiálních skupin byli označeni za producenty BA [7]. V nekontaminovaném mléce by obsah biogenních aminů neměl překročit 1 mg/kg [18]. Vyšší obsah BA byl zjištěn u sýrů, které jsou vyrobeny z nepasterovaného mléka, pravděpodobně kvůli výskytu divokých kmenů mikroorganismů. Obsah tak lze snížit pasterací mléka, kratší dobou fermentace, dobrým skladováním vstupních surovin a sýrů. Při dodržování správných hygienických zásad a

správné technologii se tak zabrání sekundární kontaminaci, která je z velké části zodpovědná za intenzivní produkci BA v průběhu zrání sýrů [16, 17, 18].

Hlavními producenty BA v sýru jsou však většinou bakterie mléčného kvašení (BMK). Jak již bylo uvedeno v Tabulce 1, nejběžnějšími druhy mikroorganismů, které produkují biogenní aminy v sýru, jsou zejména *Lactobacillus buchneri*, *L. bulgaricus*, *L. plantarum*, *L. casei*, *L. acidophilus*, *Enterococcus faecium*, *Streptococcus mitis*, *Paenibacillus macerans*, *Propionibacterium* spp. Tyto bakterie produkují hlavně histamin, tyramin a putrescin [1, 7]. Různé typy sýrů (v závislosti na jejich době zrání a rovněž tvrdosti) mají různé zastoupení obsahu biogenních aminů (Tabulka 2). Možností snížení obsahu BA v mléčných výrobcích by mohla být použita doplňková kultura, která je schopna degradovat BA. V případě sýru byla popsána schopnost *Brevibacterium linens* katabolizovat histamin a tyramin během zpracování sýru munster [7]. Benkerroum a kol. (2013) [33] zjistili, že v sýru Montasio se nachází mikrobiální skupina gramnegativních bakterií, zejména *Enterobacteriaceae* a ta dokáže přežít až 120 dní zrání a produkuje zejména histamin, putrescin a kadaverin [33].

Z pohledu zvýšených koncentrací BA patří mezi potenciálně rizikové také sýry typu čedar (2-fenylethylamin, putrescin, tryptamin, tyramin), brick (tryptamin, tyramin), gruyere (kadaverin), romano (tyramin) [13].

Sýry většinou obsahují velmi malá množství tryptaminu, desítky mg/kg 2-fenylethylaminu a dále jednotky až stovky mg/kg histaminu, putrescinu, tyraminu, kadaverinu. Sýry podle obsahu biogenních aminů můžeme rozdělit:

- s vysokým obsahem BA: to jsou sýry zejména s vysokodohřívanou sýřeninou (ementál) a měkké zrající sýry (pivní sýr)
- se zvýšeným obsahem BA: to jsou sýry s nízkodohřívanou sýřeninou (eidam), plísňové sýry (camembert) nebo sýr kozí
- s nízkým obsahem BA: to jsou sýry smetanové nebo termizované měkké sýry (lučina) [18]

Obsah BA byl sledován i v tavených sýrech, ve kterých se nacházel nižší obsah než u tvrdého sýru. V ochucené variantě taveného sýru byl naopak vyšší obsah BA a to bylo zřejmě způsobeno použitou výchozí surovinou, která mohla být nižší kvality [18].

Pro hodnocení kvality sýrů, masa a masných výrobků nelze použít index kvality jako u ryb a výrobku z nich, protože tento index nepřinesl dobré výsledky hlavně proto, že nezahrnuje obsah tyraminu, hlavního biogenního aminu v těchto výrobcích [19].

Tabulka 2: Výskyt biogenních aminů v různých typech sýrů [13]

<b>Parmezán</b>	tyramin	<b>Roguefort</b>	kadaverin
			putrescin
			tyramin
<b>Gouda</b>	kadaverin	<b>Camembert</b>	kadaverin
	putrescin		putrescin
	tryptamin		tyramin
<b>Edam</b>	( $\beta$ -fenylethylamin)	<b>Brie</b>	kadaverin
	putrescin		putrescin
	tryptamin		
	tyramin		
<b>Provolone</b>	kadaverin	<b>Mozzarella</b>	kadaverin
	putrescin		

Kromě sýra je kefir dalším fermentovaným mléčným výrobkem, kde mohou být přítomny BA. Özdestan a Üren (2010) uvedli, že celkový obsah BA ve vzorcích kefiru se pohyboval mezi 2,4 a 35,2 mg/l, přičemž nejvíce se vyskytoval tyramin. Jiné mléčné fermentované výrobky včetně podmáslí nebo jogurtu pravděpodobně neobsahují tak významné hladiny BA [7]. Obecně se zdá, že fermentovaná mléka a jogurt jsou méně vystaveny akumulaci BA kvůli jejich krátké době zpracování a době skladování. Stále je o nich hlášeno, že obsahují malé nebo nedetekovatelné hladiny BA [33].

### 1.3.2 Ryby a rybí výrobky

Jak již bylo uvedeno pro ryby a rybí výrobky je stanovena maximální koncentrace BA, a to na 100 mg/kg produktu [11]. V současné době je histamin jediným biogenním aminem, pro který FDA (Food and Drug Administration) USA stanovil orientační úroveň, tj. 50 mg/kg histaminu v jedlých částech ryb, zatímco Evropská komise (ES) stanovila regulační limity 100 mg/kg pro histamin v rybích druzích a 400 mg/kg pro histamin v rybí omáčce vyrobené fermentací produktů rybolovu. Mezitím Evropský úřad pro bezpečnost potravin (EFSA) uvedl, že ačkoli je dávka 50 mg histaminu hladinou bez pozorovatelného nepříznivého účinku NOAEL (no observed adverse effect level), u zdravých jedinců se nevyskytují příznaky, pokud nepožijí větší množství histaminu než NOAEL. Poté Organizace pro výživu a zemědělství / Světová zdravotnická organizace oznámila 200 mg histaminu / kg jako maximální přípustnou úroveň pro spotřebu ryb a rybích produktů. Podle standardu Codex je 200 mg/kg histaminu v rybách a rybích výrobcích a 400 mg/kg histaminu v rybí omáčce bylo stanoveno jako úroveň indikátorů hygieny a manipulace v odpovídajících produktech [23].



U ryb jsou bakterie produkující biogenní aminy pravděpodobně přítomny na žábřácích, kůži nebo v gastrointestinálním extraktu. Přenos těchto bakterií do masa ryb, kde mohou být přítomny volné aminokyseliny, vede k vývoji biogenních aminů. Ve vědecké literatuře se uvádějí ty druhy, které pravděpodobně produkují histamin: *Morganella morganii*, *Morganella psychrotolerans*, *Photobacterium damsela*, *Photobacterium*, *Raoultella*, *Enterobacteriaceae*, *Lactobacillus*, *Enterococcus* [24].

Hlavními producenty v rybích produktech jsou *Clostridium perfringens*, *Staphylococcus xylosum*, *Morganella morganii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Hafnia alvei*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Bacillus* spp. Tyto mikroorganismy produkují hlavně histamin, tyramin, kadaverin, putrescin, agmatin. V kvalitním čerstvém rybím masu se obsah BA pohybuje v nízkých hodnotách. Pokud jsou ryby nevhodně skladovány při vyšších teplotách, tak je přítomnou mikroflórou dekarboxylován hlavně histidin. Pokud se teploty pohybují okolo 0 °C, tak BA vznikají pouze v zanedbatelném množství. Teplota pro tvorbu histaminu je rozsáhlá (5-38 °C) a závisí na přítomném druhu kontaminující mikroflóry. Některé druhy ryb (*Scombridae*) mají přirozeně vyšší obsah aminokyseliny histidinu, který se nachází v rybí svalovině a z něj dekarboxylací vzniká histamin, např. tuňák může obsahovat až 8000 mg/kg histaminu a makrela 3000 mg/kg histaminu. Při vhodných skladovacích teplotách má čerstvý tuňák obsah BA cca 0-2 mg/kg tyraminu a 0-10 mg/kg histaminu. Ostatní BA jako jsou tyramin, putrescin, kadaverin apod., také vznikají ve vyšším množství. V menším množství se vyskytuje agmatin, který se pohybuje většinou 1-3 mg/kg [1, 3]. Hladiny BA nad 200 mg/kg v produktech z ryb a v mořských plodech nejsou neobvyklé, v průzkumech často dosahují až 10% převahy. Z údajů vyplývá, že zpracované zmrazené rybí výrobky jsou častěji kontaminovány na vyšších úrovních; například u sardinek byly pozorovány hladiny histaminu nad 200 mg/kg [24].

Pro zjištění kvality ryb a výrobků z nich byl vytvořen index kvality vyvinutý Mietem a Karmasem, který byl použit jako indikátor rozkladu ryb. Tento index je založen na zvýšení hladin putrescinu, kadaverinu a histaminu a snížení hladin spermidinu a sperminu v průběhu procesu skladování ryb. Skóre 0 a 1 ukazuje dobrou kvalitu ryb, mezi hodnotou 1 a 10 jsou tyto produkty tolerovatelné a skóre nad 10 naznačuje rozklad produktu. Index biogenních aminů je tedy indikátorem kažení rybího i jiného masa – BAI a je to obsah biogenních aminů v mg/kg [19].

$$BAI = \frac{HIS (histamin) + PUT (putrescin) + CAD (kadaverin)}{(1 + SPD (spermidin) + SPM (spermin))}$$

Jak již bylo zmíněno, hodnota BAI by se měla pohybovat do 10, protože poté je produkt považován za nekvalitní [3].

### 1.3.3 Maso a masné výrobky

Hlavní mikroorganismy, které se vyskytují v masu a masných výrobcích, jsou *Pediococcus* spp., *Lactobacillus* spp., *Pseudomonas* spp., *Streptococcus* spp., *Micrococcus* spp. a čeleď *Enterobacteriaceae*. Hlavní BA, které tyto mikroorganismy produkují, jsou histamin, kadaverin, putrescin, tyramin, fenylethylamin, tryptamin. Během skladování masa vlivem enzymové aktivity mikroflóry, která se tam vyskytuje, dochází k nárůstu biogenních aminů. Tuto skutečnost lze využít jako indikátor pro posouzení čerstvosti masa. Vepřové maso, které je čerstvé, obsahuje většinou kadaverin a putrescin do 7 mg/kg a zkažené maso dosahuje hodnot 60 mg/kg. Vysoký obsah kadaverinu u hovězího masa a také u masa, které se skladuje delší dobu, byl spojen s velkou kontaminací čeledí *Enterobacteriaceae*. Ve vakuově baleném mase se nejčastěji vyskytuje putrescin a kadaverin, který způsobuje většinou *Enterobacteriaceae* nebo *Pseudomonas*. Při tepelných úpravách (vaření, dušení) obsah biogenních aminů významně neklesá, protože dochází pouze k jejich vyluhování nebo rozkladu. Vyššímu poklesu se dosahuje při smažení či pečení [1, 3].

V masných výrobcích jako jsou fermentované salámy je obsah BA většinou vyšší (většinou patrný v počáteční fázi fermentace) a je závislý na druzích mikroorganismů, které se tam nachází a také na kvalitě použité suroviny. Proto by startovací kultury měly vykazovat nízkou aktivitu, v ideálním případě nevykazovaly dekarboxylační aktivitu [1].

U masa byl také jako u ryb navržen alternativní index biogenního aminu (BAI), který se skládá ze součtu putrescinu, kadaverinu, histaminu a tyraminu. Ruiz-Capillas a kol. [19], také navrhli rozmezí kvality pro index: BAI

- <5 mg/kg označuje čerstvé maso dobré kvality
- 5 - 20 mg/kg pro ještě přijatelnou potravinu

Užitečnost BA jako indexu kvality závisí na mnoha faktorech, zejména na povaze produktu (čerstvá, konzervovaná, upravená atmosféra, fermentovaná atd.). Například indexy BA se ukázaly být uspokojivější v čerstvém masu a masných výrobcích a tepelně ošetřených výrobcích než ve fermentovaných výrobcích. Je to zčásti proto, že koncentrace biogenních aminů se u fermentovaných produktů má vyšší množství různých faktorů, které se podílejí na jejich zpracování (použitá kultura, zrání, aditiva atd.) [19].

## 2 MOŽNOSTI SNÍŽENÍ OBSAHU BIOGENNÍCH AMINŮ V POTRAVINÁCH

Obsah BA v potravinách se často využívá jako ukazatel kvality v různých potravinách (maso, ryby, sýry, vína atd.) dále nám signalizuje stupeň čerstvosti a / nebo poškození a také se využívají ke kontrole zpracování a vývoji potravin a nápojů. Jak již bylo zmíněno v předchozí kapitole, stanovení indexu biogenních aminů, který spolehlivě předpovídá kvalitu produktu, není jednoduché. Je důležité si uvědomit, že někdy se u potravin s toxickými hladinami BA, jako jsou histamin nebo tyramin, jeví organolepticky „normální“. Pro hodnocení indexu kvality se rovněž používají jednotlivé BA, jako je histamin, tyramin, kadaverin nebo kombinace ostatních aminů (putrescin-kadaverin, spermidin-spermin atd.) Aby byla zajištěna kvalita potravin z pohledu BA, je nezbytné používat vhodné suroviny, aby se omezila přítomnost BA v konečném výrobku, a tím se zajistila i jeho lepší kvalita. Je třeba poznamenat, že tyto BA jsou termostabilní. Jinak řečeno, jakmile tyto biogenní aminy ve výrobku vzniknou, je velmi obtížné je zničit následným zpracováním (pasterizace, vaření atd.). To znamená, že pokud jsou přítomny v surovině nebo produktu, budou stále přítomny i v konečném produktu [19].

Množství produkovaného biogenního aminu závisí na hladině přítomných volných aminokyselin, které souvisí s daným druhem potraviny a na množství a aktivitě enzymů dekarboxylázy. Množství dekarboxylázy je vztaženo k počtu bakterií produkujících dekarboxylázy přenesených do potravin a na rozsah, v jakém se množí. Existuje mnoho dalších faktorů, které mohou urychlit růst producentů biogenních aminů. Při dodržování daných hygienických a technologických postupů lze zabránit, nebo alespoň omezit vznik biogenních aminů v potravinách. Mezi nejdůležitější zásady patří dodržování skladovací teploty, při které může být produkce BA omezena. To znamená, že kontrola chladicího řetězce během skladování je hlavním nástrojem, který zabrání hromadění nežádoucích produktů po výrobě, zejména v nefermentovaných potravinách a čerstvých rybách. Kromě toho bylo pozorováno, že obsah BA v sýru holandského typu byl vyšší, se zvýšenou teplotou zrání a skladování. Další zásadou je i dodržování doby skladování, protože právě při ní se zvyšují obsahy BA [3, 27].

Koncentrace biogenních aminů tedy závisí na kombinaci času a teploty. Delší doba a vyšší teploty skladování povedou k vyššímu mikrobiálnímu růstu a tvorbě biogenních aminů. Další důležité faktory, které ovlivňují koncentraci BA v potravinách, jsou pH, obsah soli, dostupnost kyslíku a konkurence s jinými kazícími se mikroorganismy [24]. Preferovány pro

snížení obsahu BA jsou i metody, jako je použití ozářování, přísad a balení v modifikované atmosféře [26].

## 2.1 Vliv mikroorganismů a startovacích kultur

### 2.1.1 Akumulace biogenních aminů

Biosyntéza a akumulace BA v mléčných potravinách vyžaduje přítomnost bakterií s dekarboxylázovou aktivitou, vhodné podmínky prostředí pro jejich růst a aktivitu dekarboxyláz a přítomnost aminokyselin v substrátu [7]. Do startovací kultury se používají prověřené kmeny bakterií nebo jejich směsi kmenů, které se při výrobě některých druhů potravin do nich přidávají z toho důvodu, že ve výsledné potravíně vytvoří specifické vlastnosti a žádanou změny, jako je i sensorická jakost. Při použití startovacích kultur se také zajistí optimalizace výroby výrobku a také jeho kvalita a zdravotní nezávadnost [3, 21]. Kromě přítomnosti mikroorganismů s vhodnou metabolickou cestou je tvorba BA možná pouze tehdy, existuje-li i dostupnost volných aminokyselin v substrátu a podmínky prostředí jsou pro dekarboxylační aktivitu příznivé. S těmito podmínkami souvisejí i různé faktory: ošetření mléka, použití startovacích kultur a enzymů, skladování a teplota zrání, úroveň proteolýzy, pH, koncentrace NaCl, přítomnost kyslíku, aktivita vody a relativní vlhkost, bakteriální hustota a synergický účinek mezi mikroorganismy [7].

Hlavními producenty BA jsou však většinou bakterie mléčného kvašení (BMK) a to některé rody *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus* a *Streptococcus* [27]. BMK mohou produkovat histamin, kadaverin, putrescin, ale zejména jsou nejúčinnějšími producenty tyraminu [27]. Kmeny určitého druhu s dekarboxylázovou aktivitou se mezi sebou mohou lišit, ale existují také i kmeny stejného druhu bez dekarboxylázové aktivity. Mohou to být amin-negativní, tzn., že nejsou schopné dekarboxylace aminokyselin na dané biogenní aminy. Pro snížení rizika vysoké akumulace BA v potravinách by producenti potravin měli k technologickým účelům využívat výhradně kmeny bez dekarboxylázové aktivity [33, 35].

U fermentovaných produktů jsou BMK identifikovány jako hlavní producenti biogenních aminů a vysoký počet některých laktobacilů bývá spojen s vysokými koncentracemi histaminu. Bylo zjištěno, že některé kmeny *Streptococcus lactis* a *Lactobacillus helveticus*, které se používají v mlékárenském průmyslu, jsou mikroorganismy produkující histamin. Jako potenciální producenti biogenních aminů jsou rovněž identifikovány i některé druhy kvasinek (*Debaryomyces hansenii*, *Yarrowia lipolytica*, *Pichia jadinii*, *Geotrichum candidum*)

[26]. Tyrozin dekarboxyláza u bakterií mléčného kvašení je často schopna dekarboxylovat také fenylalanin (produkující 2-fenylethylamin), i když s menší účinností ve srovnání s tyrozinem. Tuto schopnost potvrdilo několik autorů, kteří také zdůraznili, že fenylalanin byl enzymem používán jako substrát pouze tehdy, když nebyl k dispozici tyrozin [27].

### 2.1.2 Mikroorganismy schopné degradace biogenních aminů

Naproti předchozímu tvrzení bylo prokázáno, že i některé kmeny BMK snižují obsah BA v různých potravinách včetně mléčných výrobků. Přidání vybraných startovacích kultur je jedním z hlavních nástrojů, které mohou působit proti akumulaci BA ve fermentovaných potravinách. V prvním případě musí být použité mikroorganismy charakterizovány nepřítomností jakékoli dekarboxylační aktivity. BMK používané jako startovací kultury mohou indukovat rychlé okyselení, a tak inhibovat růst dekarboxylačních mikroorganismů, což má za následek snížení tvorby BA. Je však známo, že použití samotných vybraných startovacích kultur nemůže zajistit snížení nebo inhibici produkce BA [27].

Proto byl jako prostředek ke snížení obsahu BA v potravinách navržen výběr kmenů, které mají být použity jako startovací nebo doplňkové startovací kultury na základě dekarboxylázy-negativních (neprodukujících BA) a / nebo BA-oxidujících (degradujících BA), které jsou schopny oxidace aminu na aldehydy, hydroperoxy a amoniak. Tyto mikroorganismy jsou schopny produkovat aminooxidázy, které jsou zodpovědné za detoxikaci BA. Tyto enzymy (jak bylo popsáno výše) metabolizují BA nejprve deaminací, za vzniku  $\text{NH}_3$  a  $\text{H}_2\text{O}_2$  v přítomnosti kyslíku. Vytvořené aldehydy se dále redukují na odpovídající kyseliny, které se pak mohou přenést do centrálního metabolismu buněk [27, 33].

BMK rodů *Lactobacillus* a *Enterococcus* s dekarboxylázovou aktivitou se nejvíce podílejí na akumulaci BA v mléčných výrobcích. Druhy obou těchto rodů jsou trvale přítomny v syrovém mléce, kde mohou přežít pasterací a během fermentace a / nebo zrání se vyvíjejí jako sekundární mikroflóra. Proto kromě poskytování syrového mléka s dobrou mikrobiologickou kvalitou je zároveň použití startovacích kultur složených z BA-negativních kmenů možností, jak množství BA ve fermentovaných mléčných výrobcích efektivněji snížit společným působením souběžně, než každé z těchto opatření samostatně. Ukázalo se, že i různé směsi některých kmenů pediokoků, lactobacilů a staphylokoků potlačují produkci BA v různých fermentovaných potravinových produktech různého původu. Tato strategie může být účinná a praktická za předpokladu, že jsou použity vhodné kombinace mléčných kmenů.

Detoxikační oxidace BA byla prokázána *in vitro* u mnoha bakterií s použitím v mléčných výrobcích a jsou některé varianty doplňkových startovacích kultur *Micrococcus*, *Brevibacterium linens*, *Lactobacillus sakei* a *Lactobacillus curvatus*, *Staphylococcus xylosus*, *Lactobacillus casei* a *Pediococcus* spp. [33]. Mezi BMK s aminooxidázou prokázalo tyto schopnosti v kultivačních médiích mnoho kmenů *Lactobacillus*, *Pediococcus* a *Oenococcus*. *In vitro* s aminooxidázovou aktivitou byly pozorovány také *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum* a *L. sakei* v silážované rybí kejďe. Leuschner a kol. (1998) popsal u sýrů Munster použití *Brevibacterium linens* a jeho katabolizaci histaminu a tyraminu během zpracování [27]. Rovněž se uvádí, že použití *Staphylococcus xylosus* jako startovací kultury může omezit tvorbu histaminu a tyraminu v solených a fermentovaných ančovičkách [26]. Aktivita vybraných stafylokoků v reálných potravinových systémech však byla omezena přítomností jiných zdrojů dusíku, které jsou pro tyto bakterie snadno dostupné, například v případě suchých fermentovaných uzenin. Herrero-Fresno a kol. (2012) také prokázali, že použití dvou kmenů *L. casei* s vysokou mírou degradace pro histamin a tyramin by mohlo snížit akumulaci těchto BA v mini sýrech podobných Cabrale. Dále byla schopnost degradace některých BA nalezena také u *Bacillus amyloliquefaciens* a *Bacillus subtilis* [27]. *Lactobacillus paracasei* je běžným členem populace nestarterových BMK v sýrech. Vzhledem k obavám z přítomnosti BA v tradičních sýrech tato studie ukázala, že vybrané kmeny *Lb. paracasei* lze také použít ke snížení koncentrace histaminu a tyraminu v sýrech. To by mělo za následek zvýšení bezpečnosti sýrů, zatímco by se zachovaly typické sensorické rysy tradičních sýrů [35].

Použití kultur bakterií mléčného kvašení (BMK) produkující bakteriociny může mít důležitý potenciál pro omezení akumulace BA, i když jsou k objasnění tohoto potenciálu zapotřebí další výzkumy [27]. Bakteriociny jsou ribozomálně syntetizované antimikrobiální peptidy produkované některými bakteriemi, které jsou aktivní proti jiným konkurenčním bakteriím; tvoří tedy důležitou součást systému mikrobiální obrany. Takové kmeny produkující bakteriocin mohou nabídnout potenciál jako alternativu k antibiotikům a mohou být užitečné jako prostředek kontroly transportu patogenu, a proto jsou velmi vhodné jako mikrobiální potravinářské přísady. Bakteriociny z BMK vzbudily velký zájem, protože jsou často produkovány komerčně užitečnými kmeny, které jsou obecně považovány za bezpečné pro lidskou spotřebu. Tyto antimikrobiální molekuly patří mezi prospěšné peptidy, které jsou přirozeně syntetizovány některými BMK během fermentace mléka a tradičně se používají jako přirozeně vyráběné potravinové biokonzervanty. Kromě toho mohou v GIT (gastrointestinální

trakt) fungovat jako potenciální přírodní bioterapeutická činidla usnadňující konkurenci probiotických kmenů a / nebo inhibici patogenů [34].

## 2.2 Vliv skladovací teploty

Schopnost produkovat biogenní aminy je obecně omezena při snižování teploty. Skladování při správné teplotě je jednou z možností, jak snížit či omezit obsah biogenních aminů v potravinách. To znamená, že kontrola chladicího řetězce během skladování a uvádění na trh je hlavním nástrojem, který zabraňuje hromadění nežádoucích produktů po výrobě, zejména v nefermentovaných potravinách, jako jsou produkty rybolovu. Pokud jde o fermentované potraviny, musí teplota fermentace a průběh zrání umožnit mikrobiologickou aktivitu pro mikroorganismy, které jsou do potraviny záměrně přidány. Tato teplota je různá při výrobě různých fermentovaných potravin [27]. Zatímco dekarboxylázy jsou aktivnější pod 30 °C, tak nejsou schopny vykazovat aktivitu nad 40 °C. Dekarboxylázová aktivita mezi 0 °C a 10 °C se mění v závislosti na teplotních požadavcích daných mikroorganismů v prostředí. Uvádí se, že *Klebsiella pneumoniae* produkuje nižší množství kadaverinu při 10 °C ve srovnání s 20 °C. Zatímco obsah putrescinu a kadaverinu se u vepřového masa skladovaného při -20 °C a 5 °C zvyšuje, tak obsah sperminu a spermidinu se za stejných podmínek snižuje [26].

Otravě nahromaděným histaminem z některých potravin lze zabránit několika způsoby. Správná skladovací teplota je však pravděpodobně nejdůležitější metodou prevence [13]. Zhang a Ni (2014) [36] zjistili, že tyrosin dekarboxyláza z *Lactobacillus brevis* měla svou optimální teplotu při 50 °C, ale při vyšší teplotě byla rychle inaktivována. Aktivita enzymu při optimální teplotě 50 °C byla však rychle snížena během jedné hodiny. Dále kmen produkující histamin (*S. thermophilus*) inkubován v mléce při nízké teplotě (4 °C) produkoval méně histaminu než stejný kmen, který byl udržován při 42 °C. Tato redukce byla přičítána spíše nižší aktivitě histidinkarboxylázového enzymu, než snížení genové exprese nebo přítomnosti nižšího počtu buněk [27].

Zdá se, že teplota hraje důležitou roli při tvorbě histaminu i v sýru. Například švýcarský sýr je záměrně skladován při 21 až 26 °C po dobu 2 až 7 týdnů, dokud nedojde k požadovanému vytvoření ok. Joosten (1998) [37] zjistil, že hladiny histaminu v sýru Gouda skladované při 9, 14, 18 a 21 °C se zvyšovaly s vyššími skladovacími teplotami. Gouda se obvykle udržuje na teplotě 13 - 14 °C, dokud není uvedena na trh. Skladovací teplota byla také uváděna jako

nejdůležitější faktor bránící hromadění histaminu v málo soleném sýru Cheddar obsahujícím *Lactobacillus buchneri* [13].

Komprda a kol. [50] zjistili, že obsah tyraminu v sýru s pasterovaného mléka skladovaného 22 týdnů při 8 °C má nižší obsah tyraminu jak sýr skladovaný při vyšší teplotě [50].

### 2.3 Vliv koncentrace přítomných sacharidů a pH

Přítomnost fermentovatelných sacharidů, jako je glukóza, způsobuje to, že se v prostředí v důsledku rozkladu těchto sacharidů tvoří organické kyseliny, jako je kyselina mléčná, snižuje se pH, a tím se zvyšuje bakteriální růst (zejména bakterií mléčného kvašení) a aminokyselinová dekarboxylázová aktivita. Uvádí se, že koncentrace glukózy mezi 0,5 - 2 % (hm./obj.) jsou optimální pro tvorbu biogenního aminu a enzymy jsou inhibovány při koncentracích vyšších než 3,0 % (hm./obj.). Glukóza má silný vliv na tvorbu tyraminu, pokud jde o bakteriální růst, ale neovlivňuje aktivitu tyrozin dekarboxylázy [26]. Buňková a kol. (2012) [38] zjistili maximální akumulaci tyraminu u *E. durans* v přítomnosti vyšší koncentrace laktózy (5 %). Méně jasný účinek tohoto cukru byl pozorován u *L. lactis*: zvyšující se koncentrace laktózy nevedla k vyšší koncentraci tyraminu, což bylo přičítáno nadbytku metabolické energie získané primární fermentací [27].

Hodnota pH je důležitý faktor, který ovlivňuje aktivitu aminokyselinové dekarboxylázy, a tím i tvorbu biogenního aminu. Je známo, že nízké pH je rozhodujícím faktorem pro aktivitu některých aminokyselinových dekarboxyláz. V literaturách existují různé práce popisující kyselé pH, které je optimální pro tyrozin dekarboxylázu a další bakteriální dekarboxylázy aminokyselin. Geny kódující dekarboxylázy mohou být navíc indukovány při nízkém pH [7]. Aminokyselinová dekarboxyláza je optimální v prostředí s nižším pH, které se pohybuje od 4,0 do 5,5. V prostředí s pH okolo 4,0 mnoho mikroorganismů s dekarboxylázovou aktivitou neprospívá, a proto je v takovémto prostředí i nižší produkce BA [26]. Ve studii Majjala (1994) [39] bylo stanoveno, že *Lactobacillus bulgaricus* rychleji syntetizoval histamin, tyramin a tryptamin v kyselém prostředí na MRS (pH 5,0), který byl obohacen přidáním aminokyselin. Dále použití okyselujících činidel, jako je glukono-lakton (GDL), který se doporučuje pro použití v masných výrobcích a patří mezi potravinářské přídatné látky ve třídě regulátorů kyselosti, může také snížit produkci aminů snížením pH. Použitím GDL při výrobě uzenin se dosáhne rychlého snížení pH hydrolyzou GDL na kyselinu glukonovou ve



vodě. Přidání GDL do trvanlivých fermentovaných masných uzenin vede ke snížení hladiny pH a dále také nežádoucích mikroorganismů jako fekálního streptokoka, aerobních mezofilních bakterií a koliformních bakterií. Na druhou stranu přídavek GDL neovlivňuje vývoj bakterií mléčného kvašení, i když způsobuje snížení množství histaminu a putresinu [26].

## 2.4 Vliv obsahu soli

Obecně se zvyšující se koncentrací solí se snižuje akumulace BA v potravinách, zejména dochází ke snížení metabolické aktivity dekarboxylačních mikroorganismů. Zejména gram-negativní bakterie jsou více inhibovány se zvyšující se koncentrací solí než gram-pozitivní mikrobiota [27]. Uvádí se, že tvorba histaminu klesá v případech, kdy je koncentrace soli vyšší než 5 %. Jelikož má proces solení inhibiční účinek na enzym histidinkarboxylázu, snižuje se aktivita daného enzymu, a tím se brání tvorbě histaminu. Bylo však zjištěno, že soli odolné (halotolerantní) bakterie nejsou působením soli ovlivněny, a mohou tak produkovat biogenní aminy i v mase sardinek s koncentrací soli 12 %. Vysoká koncentrace soli může potlačovat aktivitu histidinové dekarboxylázy u některých mikroorganismů jako jsou *Staphylococcus capitis*, *Enterobacter cloacae* a *Pantoea agglomerans*, ale naopak u halotolerantní *Staphylococcus* spp. se aktivita může zvyšovat [26]. U fermentovaných uzenin, které byly inokulovány tyraminogenním kmenem *E. faecalis* se zvýšením množství soli, se podařilo snížit koncentraci tyraminu, 2-fenylethylaminu produkovaného enterokoky, ale také se omezilo produkci kadaverinu a putrescinu produkovaného enterobakteriemi. V řeckém sýru Feta, který se vyznačuje vysokým obsahem soli, se i přes zrání ve slaném nálevu a nízkém pH našly pozoruhodné koncentrace některých aminů (asi 200 mg/kg tyraminu, 90 mg/kg histaminu a 200 mg/kg putrescinu) [27]. Přestože v řadě studií je popsán vliv vyšší koncentrace NaCl na snížení produkce BA, není možné tento faktor využít pro všechny komodity, a to z důvodu nežádoucího ovlivnění sensorických vlastností produktu. Navíc některé studie neprokázaly vliv NaCl na významnou redukci BA. Na základě zjištěných informací lze konstatovat, že využití tohoto faktoru je v praxi limitováno [26].

## 2.5 Vliv kyslíku

Konzervace prostřednictvím balení obvykle zahrnuje změnu prostředí obklopující produkt pomocí plynné směsi. To může zpomalit produkci biogenních aminů v důsledku inhibice

mikroorganismů nebo enzymů produkujících biogenní aminy. Enzym histidinkarboxyláza byl uváděn jako účinnější v nepřítomnosti kyslíku ( $O_2$ ), zatímco enzym histamináza (jako je DAO), který oxiduje histamin, byl shledán účinným pouze v přítomnosti  $O_2$ . Jak anaerobní, tak aerobní bakterie jsou schopné produkovat biogenní aminy, ale také je i degradovat, takže nalezení rovnováhy, která bude řídit mikrobiální růst a enzymatickou aktivitu, může být obtížné [28]. Konzervace potravin založená na modifikaci atmosféry je však zaměřena na vyloučení kyslíku. Nicméně v takové strategii není hlavním cílem ve vztahu k přítomnosti BA inaktivace dekarboxylázové aktivity, ale inhibice mikrobiální populace s dekarboxylačními vlastnostmi. Z tohoto hlediska může atmosféra použitá pro balení ovlivnit kvalitativní a kvantitativní tvorbu BA. Existují důkazy, že kyslík může ovlivnit produkci BA. Například se ukázalo, že akumulace tyraminu *Enterococcus durans* a *Lactococcus lactis* je podporováno anaerobními podmínkami. V několika studiích bylo uvedeno, že účinek kyslíku je také důležitý v biosyntéze aminů. Např. *Enterobacter cloacae* produkuje v anaerobních podmínkách asi polovinu množství putrescinu v porovnání s aerobními podmínkami, zatímco *Klebsiella pneumoniae* produkuje v aerobních podmínkách více putrescinu a kadaverinu [27].

## 2.6 Využití vysokého hydrostatického tlaku

Mezi alternativní procesy k tepelnému ošetření pro konzervaci potravin patří oblast vysokotlakého zpracování, lépe známá jako vysoký hydrostatický tlak (HHP) nebo vysokotlaká homogenizace (HPH). Vzhledem k antimikrobiálním účinkům HHP může tato technologie kvantitativně i kvalitativně modifikovat mikrobiotu ošetřených potravin, což ovlivňuje také vlastnosti matrice potravin. Kromě HHP může být také strategií pro kontrolu přítomnosti dekarboxylačních mikroorganismů v surovinách, jako je mléko používané pro výrobu sýrů, použito také HPH. Lanciotti a kol. (2007) [40] prokázali, že ošetření mléka HPH při 100 MPa může významně snížit akumulaci BA ve srovnání s tepelně ošetřeným mlékem v důsledku hluboké modifikace mikrobioty během zrání. [27]. Vysoký hydrostatický tlak (HHP) je metoda non-termální konzervace, která poškozují buněčné membrány mikroorganismů, což má za následek inaktivaci nebo subletální poškození. Inaktivaci mikroorganismů prodlužuje HHP trvanlivost, zachování původní chuti a vlastností potravin. Potraviny ošetřené HHP jsou komerčně dostupné ve Spojených státech (například guacamole, ústřice), Japonsku (například ovocná marmeláda) a Španělsku (například vařená a vakuově balená šunka). HHP byl aplikován na mnoho dalších potravin včetně sýrů, klobás, ryb a zelí. Když

se HHP aplikuje na surovinu nebo konečné produkty fermentace, tak může napomoci snížit počet bakterií a tím inhibovat tvorbu biogenních aminů [28]. Celkově jsou k dispozici pouze omezené informace o účinnosti použití HHP na kontrolu biogenních aminů při zpracování surovin, přičemž existují důkazy o zvýšené i snížené tvorbě biogenních aminů. Je možné, že HHP ovlivňuje enzymy i bakterie, které způsobují tvorbu biogenních aminů, ačkoli tento aspekt nebyl studován [32].

Latorre-Moratalla a kol. (2007) [32] aplikovali HHP (200 MPa) na surovinu rozmělněného masa pro fermentaci uzenin, tím byl inhibován růst enterobakterií a současně se oddálilo hromadění putrescinu a kadaverinu [32].

Inhibice tvorby biogenních aminů závisí na úrovni aplikovaného tlaku. Například Novella Rodriguez a kol. (2002) se během zrání sýrů, pro které bylo použito nízkotlaké ošetření 50 MPa po dobu 72 hodin, zvýšil obsah biogenního aminu, zatímco vysokotlaké ošetření 400 MPa po dobu 5 minut plus 50 MPa po dobu 72 hodin ukázalo mírný pokles biogenních aminů v sýrech. Ošetřování fermentovaných klobás vysokým tlakem (350 MPa / 15 min) snížilo počet bakterií mléčného kvašení a došlo ke snížení hladiny kadaverinu, putrescinu a tyraminu během 160 dní chlazeného skladování ve srovnání s klobásou neošetřenou HHP [28].

## 2.7 Použití koření a éterických olejů

Použití éterických olejů jako aromatických přísad se v poslední době zvýšilo kvůli rostoucí poptávce spotřebitelů po přírodních produktech a přírodních konzervačních látkách a nahrazení syntetických aditiv v potravinářském průmyslu. Koření jsou často definována jako aromatické, sušené rostlinné látky používané v potravinách pro aromatizaci či barvení [27].

Komprda a kol. (2004) [3] napsali, že přirozeně se vyskytující specifické inhibiční látky v koření a přísadách inhibují tvorbu biogenních aminů. Mezi tyto látky patří kurkumin (kurkuma), kapsaicin (červený pepř) a piperin (černý pepř). Nevýhodou těchto látek je značná ztráta účinnosti, ke které dochází během vaření. Dále uvedli, že vysoký obsah červené papriky spolu se startovacími kulturami přispěl k nižšímu obsahu BA v suchých fermentovaných uzeninách [30].

Z těchto látek byl kapsaicin shledán jako tepelně stabilnější než kurkumin a piperin. Neaktivnější složkou kurkumy je kurkumin, analog 6-gingerolu. Kurkuma má žlutou barvu, což

je způsobeno kurcuminoidy. Kurkumin se používá jako potravinářská přídatná látka, koření a jako léčivá bylina. Hladiny kurkuminu 8 g / d mohou být tolerovatelné s přibližnou spotřebou 0,1 g / d. Je to silný antioxidant 10krát silnější než vitamin E [28].

Červený pepř obsahuje kapsaicin, o kterém je známo, že brání růstu některých bakterií. Ve studii Mah a kol. (2009) [41] byly zkoumány účinky různých druhů koření včetně zázvoru, česneku, zelené cibule, červené papriky, hřebíčku a skořice pro snížení obsahu BA v myeol-chi-jeot (korejské solené a fermentované ančovičky). Největší inhibiční účinek na produkci BA byl zjištěn v kultuře ošetřené česnekovým extraktem, zatímco ostatní koření extrakty vykazovaly menší účinek na snížení obsahu BA. Česnek obsahuje antimikrobiální složku allicin a jeho účinnost pravděpodobně souvisí s přítomností této molekuly. Zázvorový extrakt snížil obsah putrescinu, zatímco extrakt z červené papriky snížil akumulaci kadaverinu [27].

Dále byla provedena studie Özogul a kol. (2015) [29] na dopad karvakrolu v různých koncentracích (0,1, 0,5 a 1 ml / 100 ml) na produkci BA bakteriemi z potravin včetně *Staphylococcus aureus*, *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *E. faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Listeria monocytogenes*, *A. hydrophila* a *Salmonella Paratyphi* v bujónu histidindekarboxylázy. Výsledky této studie ukázaly, že všechny testované bakterie byly schopny dekarboxylovat více než jednu aminokyselinu a že karvakrol byl schopen snížit tvorbu BA v závislosti na koncentraci a druhu bakterií [29].

Kromě toho Bozkurt (2006) uvedl, že hladiny histaminu, putrescinu a tyraminu v sucuk (turecká suchá fermentovaná klobása) byly nižší v uzeninách s použitím extraktu ze zeleného čaje než v kontrolním vzorku bez extraktu [31].

## 2.8 Použití ozařování

Ozařování potravin lze použít ke zvýšení bezpečnosti a trvanlivosti potravin snížením mikrobiálního růstu. Bylo hlášeno, že záření gama snižuje obsah BA v potravině v důsledku zpoždění počátečního růstu náhodných mikroorganismů [28]. I přes neochotu spotřebitelů přijímat ozářené potraviny kvůli nejistotám ohledně jejich bezpečnosti, ozařování získává na popularitě jako technika, která dokáže účinně kontrolovat patogenní bakterie, viry, plísňe, parazity a hmyz, jakož i toxické chemikálie, jako jsou dusitany, nitrosaminy a BA v potravinách, čímž se zvyšuje jejich bezpečnost a kvalita. Ionizující záření  $x$  a  $\gamma$  jsou v současné

době legálně schválena pro uchovávání potravin v přibližně 50 zemích po celém světě. Tento počet neustále roste, protože se shromažďuje více vědeckých důkazů, které prokazují, že přínosy ozařování potravin převažují nad jeho potenciálními riziky. Pro uchování potravin jsou povoleny různé dávky radiace  $\gamma$  (1 až 30 kGy), v závislosti na povaze potraviny, cílových mikroorganismech, které mají být usmrceny, a na cíli ošetření (prodloužení doby použitelnosti, částečné nebo úplné odstranění mikrobiálních kontaminantů, zrání a naklíčení zeleninových potravin). Ačkoli neexistuje žádné právní postavení týkající se ozařování fermentovaných potravin včetně mléčných výrobků, tak mnoho studií prokázalo účinnost ozařování při snižování obsahu BA v těchto potravinách. Byly vzneseny i obavy týkající se možných nepříznivých účinků na nutriční kvalitu potravin po ozáření. Takové obavy souvisely s tvorbou volných radikálů a oxidací lipidů, což by vedlo ke změnám chemického složení potravinářských produktů bohatých na tuk a proteiny, když by také potraviny byly vystaveny dávkám vyšším než 6 kGy. Benkerroum [33] popsál, že takové dávky zvyšují hladinu některých BA (fenytyethylamin, spermidin, kadaverin a tryptamin) v masných výrobcích, což by mohlo platit i pro mléčné výrobky. Ukázalo se však, že dávky nižší než 6 kGy neovlivňují jak chemické složení, tak ani chuťovou kvalitu mléčných výrobků a zároveň snižují obsah BA a mikrobiální počty v různé míře. Proto může být ozařování mléčných výrobků zvláště užitečné v sýrech, kde může být použito po zrání ke snížení obsahu BA a současně zabránit nadměrnému zrání některých odrůd sýrů, kde se současně snižuje počet mikroorganismů [33]. Během skladování byly pozorovány nízké hladiny BA při použití záření gama na klobásu pepperoni. Byla provedena studie účinků různých dávek záření gama (2, 4 a 6 kGy) na tvorbu BA v egyptských fermentovaných uzeninách. Histamin byl detekován v ozářených vzorcích ihned po ozáření a během skladování byly pozorovány nízké hladiny všech BA zejména u produktů, které byly ošetřeny při 6 kGy [27]. Ozařování do 10 kGy se považuje za bezpečné pro jakýkoli potravinový produkt (WHO 1994). Prodloužení doby použitelnosti potravinářských výrobků ošetřených ozářením bylo použito u mnoha potravin včetně vepřového a hovězího masa, klobás, sójové pasty [28].

## 2.9 Ostatní možnosti

Pulzní elektrická pole (PEF) je netermická metoda konzervování potravin, která používá k mikrobiální inaktivaci krátkých pulzů elektřiny, a způsobuje tak minimální škodlivý vliv na atributy kvality potravin. Předchozí studie prokázaly, že ošetření PEF může být užitečné při

sterilizaci ovocné šťávy za různých podmínek. Byla pozorována jasná mikrobiální inaktivace v závislosti na šťávě, mikroorganizmech, podmínkách ošetření a zařízení. Navíc zvýšení intenzity elektrického pole ( $> 600 \text{ kV / m}$ ) zlepšilo inhibici růstu mikroorganismů během skladování v Tilápii nilské [27].

Použití dvou slabých kyselin (sorbát a benzoát) v kombinaci s hřebíčkem inhibovalo dekarboxylační účinek aminobiogenetického kmene *Enterobacter aerogenes* izolovaného z ryb. Byla provedena studie Lapa-Guimarães a kol. (2011) [42] a Genççelep a kol. (2014) [43], kde benzoát a sorbát byly také použity k omezení produkce BA během skladování dvou různých druhů produktů rybolovu (filé z tresky obecné a perlové mulletové) [27]. Sorbát sodný může omezit tvorbu biogenních aminů a také se ukázalo, že hexametafosfát sodný ve 2 % zpomaluje produkci histaminu. Kyselina citronová, kyselina jantarová, D-sorbitol a kyselina jablečná dokázaly inhibovat dekarboxylázovou aktivitu a výsledná tvorba histaminu v makrelách skladovaných po dobu 10 dní při 25 °C. Použití kyseliny citronové (1%) během fermentace kysaného zelí způsobilo mírné snížení biogenních aminů. Bylo také zjištěno, že sorbát draselný prodlužuje trvanlivost mořských plodů. Klobása obsahující sorbát draselný a kyselinu askorbovou vykazovala významné snížení akumulace biogenních aminů. Přidání 0 až 1% glukono-delta-laktonu (GDL) do masa snížilo produkci histaminu a putrescinu poklesem pH masa. Přidání cukru může také mírně snížit tvorbu biogenních aminů [28].

## **II. PRAKTICKÁ ČÁST**

### 3 CÍL PRÁCE

Cílem této diplomové práce bylo zjistit a popsat vliv přísad vybraných kmenů mikroorganismů na obsah biogenních aminů v průběhu zrání sýru holandského typu. Základní cíl byl dále ještě rozdělen do několika dalších dílčích cílů:

- vyrobit modelové šarže sýrů s producentem biogenních aminů *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 946 a potenciálními degradéry biogenních aminů *Lactobacillus casei* CCDM 198, *Lactobacillus casei* CCDM 802, *Lactobacillus plantarum* CCDM 183 a *Lactobacillus plantarum* CCDM 185
- porovnat mezi sebou obsah biogenních aminů v modelových šaržích sýrů v průběhu zrání
- v rámci skladování sledovat i vybrané vlastnosti modelových sýrů



## 4 MATERIÁL A METODY

### 4.1 Výroba modelových vzorků sýrů

#### Materiál a pomůcky

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

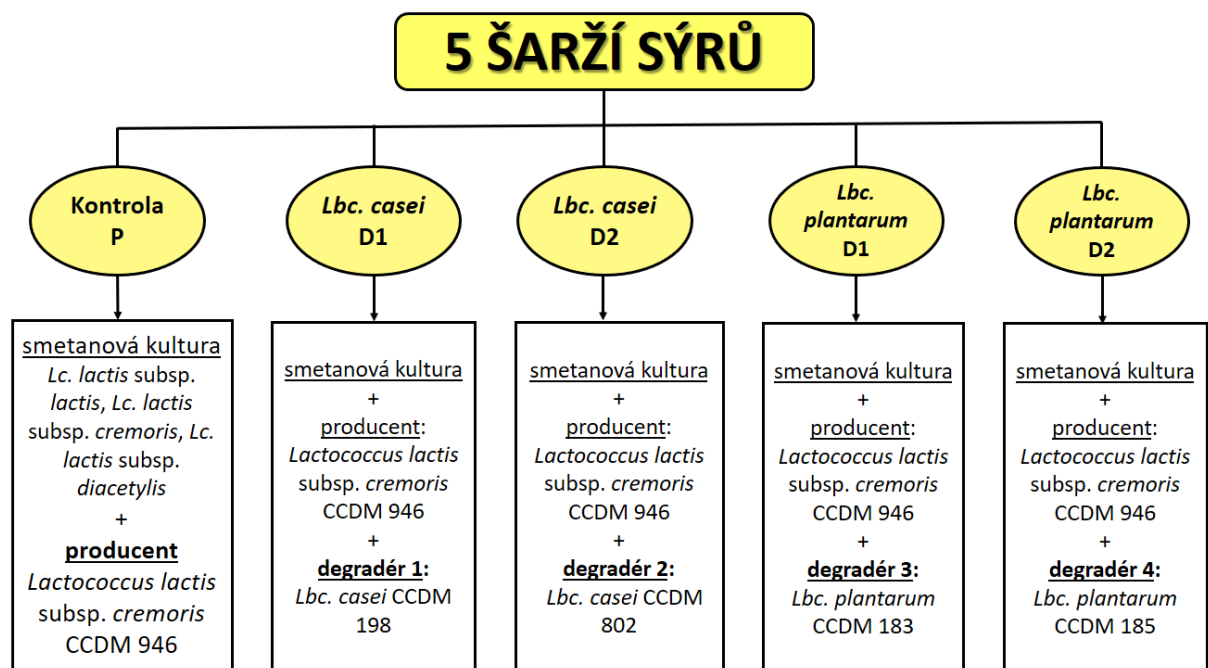
#### Postup výroby

Bylo vyrobeno celkem 5 šarží sýrů s nízkodohřívanou sýřeninou typu gouda, které byly následně uskladněny pro zrací pokus.

Jako prvním krokem bylo předeřtí syrového mléka ve výrobě na teplotu  $37 \pm 1$  °C pro snížení viskozity mléka a jeho lepší odstředění. Po předeřtí bylo mléko přelito do odstředivky, kde bylo odděleno mléko od smetany. Dále bylo potřeba mléko nastandardizovat na obsah tuku v mléce 3 %, aby bylo dosaženo výsledné požadované tučnosti sýru 45 % tvs. Nastandardizované mléko bylo převedeno zpět do výrobě sýrů. Pro polotvrdé sýry byla použita krátkodobá šetrná pasterace a mléko bylo zahříváno na teplotu 74 °C / 20 s. Takto

pasteurované mléko se ochladilo a vytemperovalo na vhodnou inokulační a sýřící teplotu  $32 \pm 1$  °C. Mléko o celkovém objemu 35 litrů bylo inokulováno předem připraveným provozním zákysem, který měl celkový objem 160 ml (na Obrázku 5 jsou znázorněny použité mikroorganismy v modelových šaržích):

- Kontrola: 120 ml smetanového provozního zákyasu (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Lactococcus lactis* subsp. *diacetylus*) a 40 ml zákyasu s kmenem, který produkuje biogenní aminy *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 946 (kontrolní šarže)
- Degradér 1: 80 ml smetanového provozního zákyasu, 40 ml zákyasu s BA produkujícím kmenem *Lc. lactis* subsp. *cremoris* CCDM 946 a 40 ml zákyasu s kmenem *Lbc. casei* CCDM 198, který je testován na degradaci biogenních aminů (označení šarže *Lbc. casei* D1)
- Degradér 2: 80 ml smetanového provozního zákyasu, 40 ml zákyasu s BA produkujícím kmenem *Lc. lactis* subsp. *cremoris* CCDM 946 a 40 ml zákyasu s kmenem *Lbc. casei* CCDM 802, který je testován na degradaci biogenních aminů (označení šarže *Lbc. casei* D2)
- Degradér 3: 80 ml smetanového provozního zákyasu, 40 ml zákyasu s BA produkujícím kmenem *Lc. lactis* subsp. *cremoris* CCDM 946 a 40 ml zákyasu s kmenem *Lbc. plantarum* CCDM 183, který je testován na degradaci biogenních aminů (označení šarže *Lbc. plantarum* D1)
- Degradér 4: 80 ml smetanového provozního zákyasu, 40 ml zákyasu s BA produkujícím kmenem *Lc. lactis* subsp. *cremoris* CCDM 946 a 40 ml zákyasu s kmenem *Lbc. plantarum* CCDM 185, který je testován na degradaci biogenních aminů (označení šarže *Lbc. plantarum* D2)



Obrázek 5. Schéma výroby sýrů s použitím daných kmenů mikroorganismů

Po inokulaci se k mléku ve výrobníku přidalo 17,5 ml nasyceného roztoku  $\text{CaCl}_2$ , aby se podpořil průběh sýření. Takto připravená směs se důkladně zamíchala a nechala se 20 minut reaktivovat za současného míchání. Po uplynutém čase se přidalo syřidlo objemu 1120  $\mu\text{l}$ . Směs se znovu krátce, ale intenzivně zamíchala a nechala se bez míchání stát v klidu 30 minut. Po 30 minutách se vzniklá sýřenina prokrojila za pomoci sýrařské harfy, jak podélně, tak i příčně. Po prokrojení, se sýřenina ponechala v klidu 10 minut. Během této doby docházelo k uvolňování syrovátky ze sýřeniny. Po této době se za pomoci sýrařské harfy s vertikálními strunami sýřenina drobila 5 minut. Poté se pomocí míchadla míchala 30 minut. Při téhle fázi docházelo k postupnému vytužování sýrařských zrn. Po vytužení se při neustálém míchání postupně odebírala syrovátka v objemu 10,5 l (tj. cca do 30 % původního objemu mléka). Ke vzniklému sýrařskému zrnu se po malých dávkách přidávala voda s teplotou 60  $^{\circ}\text{C}$  v objemu 7 l (tj. cca do 70 % objemu odebrané syrovátky). Přidáním této vody se mělo dosáhnout zvýšením teploty na 37  $^{\circ}\text{C}$  a tím docházelo k dohřívání sýru. Takovéto dohřívání muselo být pomalé, aby se sýrařské zrno neuzavřelo, kvůli rychlému přidání teplé vody. Pro udržení požadované teploty 37  $^{\circ}\text{C}$  se použilo regulace pomocí řídicí jednotky výrobníku sýrů. Následovalo dosoušení sýra a to probíhalo za stálého míchání po dobu 30 minut a muselo probíhat tak, aby se zrno neusazovalo na dno výrobníku sýru a nevznikali větší shluky

sýrového zrna. Sýřenina byla slévána do nerezové vany, kde se sýrařské zrno předlisovalo 20 minut. Takto předlisovaná sýřenina se rozkrájela na menší části a byla postupně vkládána do 12 forem, které byly vyloženy plachetkou. Formy se uzavřely a sýry se lisovaly pomocí 4 lisů ve trojici podle lisovacího plánu.

#### 1. lisování

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

#### Otočení sýrů ve formách

#### 2. lisování

Doba lisování	Zátěž na páce
60 min	25 kg

Vylisované sýry se uložily do nádob a umístily se přes noc do lednice ( $6 \pm 2$  °C) k prokysání. Druhý den se sýry vložily do předem připravené solné lázně, o koncentraci 20 % (m/v) o teplotě 8 °C a byly soleny 3 hodiny. Celkem byly připraveny 4 solné lázně pro 12 sýrů. Po vysolení se sýry ošetřily antimykotickou suspenzí (Delvocid XT1, DSM, Nizozemsko). Sýry se nechaly krátce oschnout a byly baleny do vakuové smrštitelné fólie. Po označení se sýry daly zrát do zrací komory o teplotě ( $10 \pm 1$  °C) na potřebnou dobu. Odběry modelových vzorků sýrů pro jednotlivé analýzy byly provedeny 1., 14., 28., 56., 84. den zrání. Záměrem však bylo provést analýzy až do 6. měsíce zrání, ale kvůli omezenému přístupu do laboratoří z důvodu zamezení šíření nákazy Covid-19, byly analýzy provedeny jen do 84. dne zrání

## 4.2 Mikrobiologický rozbor

Mikrobiologické stanovení bylo prováděno 14., 28., 56., 84. den a 6. měsíc zrání. Mikrobiologický rozbor modelových vzorků sýrů byl proveden na Ústavu inženýrství a ochrany životního prostředí, Fakulty technologické UTB.

Pro stanovení mikroorganismů byly použity kultivační půdy PCA (pro všechny mikroorganismy), ENDO (enterobakterie), Slanetz-Bartley (enterokoky), CHYGA (plísně a kvasinky), M17 (mléčné koky) a MRS (laktobacily). Stanovení na půdách bylo provedeno pro všechny vzorky sýra.

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

Výpočet byl proveden podle vzorce:

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

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

V – objem inokula v ml

$n_1$  – počet ploten vybraných k výpočtu z prvního zvoleného ředění

$n_2$  – počet ploten vybraných k výpočtu z druhého zvoleného ředění

d – faktor ředění odpovídající prvnímu pro výpočet zvolenému ředění

#### **4.2.1 Stanovení celkového počtu mezofilních aerobních a fakultativně anaerobních mikroorganismů**

Celkový počet mikroorganismů (CPM) byl stanoven podle normy ČSN EN ISO 4833.

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

Podle této normy bylo naváženo 5 g vzorku sýru, který byl zředěn devítinásobkem sterilního fyziologického roztoku. Takto připravená směs, byla zhomogenizována a tím bylo získáno 0. ředění. Poté se připravilo příslušné desítkové ředění ( $10^{-5}, 10^{-6}, 10^{-7}, 10^{-8}$ ) do předem připravených sterilních zkumavek se 4,5 ml fyziologického roztoku. Očkování se provádělo roztěrem 0,1 ml vzorku na sterilní Petriho misku s připravenou půdou PCA. Vždy bylo provedeno osmi desítkové vhodné ředění a očkováno na čtyři Petriho misky. Kultivace byla provedena při teplotě 30 °C po dobu 48 hodin.

#### 4.2.2 Stanovení plísní a kvasinek

Plísně a kvasinky byly stanoveny podle normy ČSN ISO 21527-1.

Bylo naváženo 5 g vzorku modelového vzorku sýru, který byl naředěn devítinásobkem sterilního fyziologického roztoku. Poté se tato směs homogenizovala a tím se získalo 0. ředění. Z homogenizované směsi se připravilo příslušné desítkové ředění ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ) do předem připravených sterilních zkumavek, ve kterých bylo 4,5 ml fyziologického roztoku. Očkování vzorku se provádělo roztěrem 0,1 ml na sterilní Petriho misku s půdou CHYGA. Provedeny byly dvě desítkové ředění a očkovalo se na dvě Petriho misky. Kultivace byla provedena při laboratorní teplotě pro dobu 48 hodin.

#### 4.2.3 Stanovení enterokoků

Enterokoky byly stanoveny podle normy ČSN ISO 7899-2.

Bylo naváženo 5 g modelového vzorku sýru, který byl naředěn devítinásobkem sterilního fyziologického roztoku. Následovala homogenizace této směsi a bylo tak získáno 0. ředění. Připravilo se desítkové ředění ( $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$ ) do předem připravených sterilních zkumavek, ve kterých bylo 4,5 ml fyziologického roztoku. Očkování bylo provedeno roztěrem 0,1 ml vzorku na sterilní Petriho misku s půdou SB. ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ). Vždy bylo provedeno sedm desítkových ředění a očkování bylo provedeno na tři Petriho misky. Kultivace proběhla při teplotě 37 °C po dobu 48 hodin.

#### 4.2.4 Stanovení bakterií mléčného kvašení

Bakterie mléčného kvašení byly stanoveny podle normy ČSN ISO 15214.

Kultivační půda MRS slouží ke stanovení laktobacilů a půda M17 je živné medium, které slouží se stanovení mléčných koků, jako jsou laktokoky, streptokoky, leukonostoky apod.

Bylo naváženo 5 g modelového vzorku sýru, který byl naředěn devítinásobkem sterilního fyziologického roztoku. Poté se tahle směs zhomogenizovala a získalo se tak 0. ředění. Připravilo se desítkové ředění ( $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$ ) do předem připravených sterilních zkumavek se 4,5 ml fyziologického roztoku. Očkování se provedlo roztěrem 0,1 ml vzorku na sterilní Petriho misky s půdou M17 a MRS. Vždy bylo provedeno 8 desítkových ředění a očkovalo se čtyři Petriho misky. Kultivace na půdě MRS proběhla v aerostatu za přítomnosti oxidu uhličitého při teplotě 30 °C po dobu 48 hodin a na půdě M17 proběhla kultivace při teplotě 30 °C po dobu 48 hodin.

### 4.3 Základní chemická analýza

#### 4.3.1 Měření pH

Měření probíhalo 1., 14., 28., 56. a 84. den zrání sýru. Kalibrovaným pH metrem (EUTECH INSTRUMENTS, Nizozemsko) se vzorek sýra změřil celkem šestkrát rovnoměrně v celém bloku sýra.

#### 4.3.2 Stanovení obsahu sušiny

Obsah sušiny v sýru byl stanoven podle normy ČSN EN ISO 5534. Sledovaný modelový vzorek sýru se po změření pH rozemlel, aby bylo možné ho lépe navážít a také pro stanovení dalších analýz. Stanovení obsahu sušiny bylo provedeno 1., 14., 28., 56. a 84. den zrání. Vždy se navážilo cca 3 g vzorku, který byl smíchán v kovové misce s mořským pískem. Takto připravený vzorek se v misce promíchal a vložil do sušárny sušárny (Venticell, Brněnská Medicinská Technika a. s., ČR). Vzorek se sušil při teplotě  $105 \pm 1$  °C po dobu 5 hodin. Obsah sušiny byl vypočítán podle vzorce:

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

$m_1$  - hmotnost misky s pískem [g]

$m_2$  – hmotnost vzorku před sušením [g]

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

#### 4.3.3 Stanovení obsahu tuku

Stanovení obsahu tuku v modelovém vzorku sýra se provádělo 1., 14., 28., 56. a 84. den zrání. Na skleněnou lodičku bylo naváženo s přesností na dvě desetinná místa 3,00 g vzorku sýru, který byl poté vložen do butyrometru. Horním otvorem butyrometru se vpustilo cca 14 ml kyseliny sírové. Poté se butyrometr uzavřel a vložil se do vodní lázně o teplotě 65 °C za promíchávání. Po rozpuštění sýru se přidal 1ml amylalkoholu a zředěná kyselina sírová (tak aby sahala do 2/3 stupnice butyrometru). Poté se butyrometr uzavřel, několikrát se obrátil a byl vytemperován ve vodní lázni s teplotou 65 °C. Následovalo odstředění, které trvalo 5 minut. Po odstředění se ponechal butyrometr 5 minut ve vodní lázni s teplotou 65 °C a na stupnici butyrometru se odečetly hmotnostní procenta tuku. Procentuální podíl tuku z celé sušiny (tuk v sušině), byl vyjádřen pomocí výpočtu:

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

s – sušina v %

t – tučnost v %

x – tuk v sušině v %

#### 4.3.4 Stanovení obsahu soli

Obsah soli byl stanoven potenciometricky podle ČSN EN ISO 5943. Stanovení obsahu soli v modelovém vzorku sýru, bylo provedeno 14., 28., 56. a 84. den zrání. Před stanovením obsahu soli bylo nutno provést standardizaci roztoku dusičnanu stříbrného. Na analytických vahách (A&D GH-200 EC) byl navážen s přesností na dvě desetinná místa 1,00 g homogenizovaného modelového vzorku sýra. Vzorek se následně rozmělnil v třecí misce s 5 – 10 ml destilované vody o teplotě cca 60 °C. K takto připravenému vzorku se přidalo 2 ml HNO<sub>3</sub> zředěné 1:4. Vzorek se převedl do kádinky a doplnil se destilovanou vodou na objem 120 – 130 ml, tak aby se mohly ponořit elektrody a teploměr. Kádinka se následně umístila na magnetickou míchačku a vzorek byl titrován roztokem dusičnanu stříbrného o koncentraci  $c = 0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ . První naměřená hodnota napětí se zaznamenala při 0 ml přídavku dusičnanu stříbrného a následně vždy po 0,5 ml přídavku dusičnanu stříbrného. Titrace byla ukončena po dosažení napětí 400 mV. Objem byl určen pomocí výpočtu z druhé derivace. Celkem byla provedena tři stanovení pro každý vzorek.

#### 4.4 Texturní profilová analýza

Analýza texturních vlastností probíhala 1., 14., 28., 56., a 84. den zrání. Analýza texturních vlastností modelových vzorků sýrů byla provedena pomocí přístroje TA.XT Plus (Stable Micro Systems Ltd., Godalming, Velká Británie) a sondy o průměru 100 mm. Ze středu modelového vzorku sýru byl vykrojen válec o průměru 35 mm a výšce 20 mm. Z těchto výkrojů se provedl kompresní test ve dvou cyklech se stlačením vzorku o 25 % jeho původní výšky s rychlostí 2 mm / s. Ze zátěžové křivky se hodnotila tvrdost vyjádřená jako maximální síla v *N* dosažená během prvního stlačení. Dále se posuzovala i kohezivost vzorku, jako podíl ploch píků druhého a prvního kompresního cyklu. Pro každý modelový vzorek sýra, byla provedena celkem tři opakování.



#### 4.5 Stanovení obsahu biogenních aminů

Před analýzou se modelový vzorek sýru nejprve rozemlel a poté lyofilizoval (lyofilizátor ALPHA 1-4 LSC, CHRIST, LABICOM, s.r.o., ČR). Stanovení biogenních aminů probíhalo 1., 14., 28. a 56. den zrání. Záměrem bylo provést stanovení až do 6. měsíce zrání, ale nestihlo se to, kvůli omezenému přístupu do laboratoří z důvodu zamezení šíření nákazy Covid-19.

Před stanovením obsahu biogenních aminů se provedla třístupňová extrakce z vysušené hmoty modelového vzorku sýru za pomoci 0,6M kyseliny chloristé a derivatizace.

Postup provedené extrakce:

Do zkumavky se navážil 1 g lyofilizovaného modelového vzorku a přidalo se 10 ml 0,6M kyseliny chloristé. Vzorek se nejprve dokonale promíchal ve vortexu a následně byl ponechán 30 minut na třepačce (LT2). Po této době se vzorek odstředil na odstředivce (EBA 21, Hettich ZENTRIFUGEN, Germany, Tuttlingen) při 6000 ot./min. po dobu 10 minut. Získaný supernatant byl přelit do odměrné baňky o objemu 25 ml, přidalo se 7 ml 0,6M kyseliny chloristé a celý postup se znovu opakoval. Tento postup se ještě jednou opakoval po opětovném přidavku 7 ml 0,6M kyseliny chloristé. Odměrná baňka byla doplněna 0,6M kyselinou chloristou po rysku a následně byl roztok přefiltrován přes stříkačkový filtr s porozitou 0,45  $\mu\text{m}$ . Nakonec byly vzorky napipetovány do mikro zkumavek a podrobeny derivatizaci.

Do připravených a popsanych derivatizačních nádobek o objemu 16 ml se odpipetovalo 100  $\mu\text{l}$  vnitřního standardu 1,7-heptandiaminu ( $c = 500 \text{ mg/l}$  v 0,6M  $\text{HClO}_4$ ), 1 ml extrahovaného vzorku, 1,5 ml karbonátového pufru pH 11,1 – 11,2 a čerstvě připravený dansylchlorid o koncentraci 5 g/l, který se zředil acetonem. Po 20 hodinách, při kterých probíhalo třepání směsi v temnu, bylo přidáno 200  $\mu\text{l}$  roztoku prolinu ( $c = 0,1 \text{ g/ml}$  v destilované  $\text{H}_2\text{O}$ ) a třepání probíhalo ještě další 1 hodinu. Přidalo se 3 ml heptanu a intenzivně se protřepávalo 3 minuty ručně. Z vytvořené horní heptanové vrstvy vzorku byl odebrán 1 ml s obsaženými deriváty biogenních aminů. Následně se nechal inertním dusíkem odpařit heptan při 60 °C a odparek byl zředěn 1,5 ml acetonitrilem. Před samotnou analýzou byly vzorky přefiltrovány přes stříkačkový filtr s porozitou 0,22  $\mu\text{m}$ . Stanovení takto připravených vzorků probíhalo pomocí vysokoúčinného kapalinového chromatografu se spektrofotometrickou detekcí ( $\lambda = 254 \text{ nm}$ ) Dionex HPLC UltiMate 3000, Německo. Analytická kolona s předkolonou ZORBAC RRHD Eclipse Plus C18, Agilent Technologies, USA.

Použité chemikálie:

- Acetonotril CHROMASOLV® Plus
- Milli-Q voda upravená přístrojem TheaqMAX™ Ultra 370 Series
- 1,7- heptandiamin o koncentraci 500 mg/l
- Kyselina chloristá ( $\text{HClO}_4$ ) 0,6M
- Dansylchlorid o koncentraci 5 g/l
- Hydrogenuhličitan sodný ( $\text{NaHCO}_3$ ) o koncentraci 0,5 mol/l
- Uhličitan sodný ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) o koncentraci 0,5 mol/l
- Roztoku prolinu o koncentraci 0,1 g/1ml
- Aceton

## 5 VÝSLEDKY A DISKUZE

### 5.1 Mikrobiologický rozbor

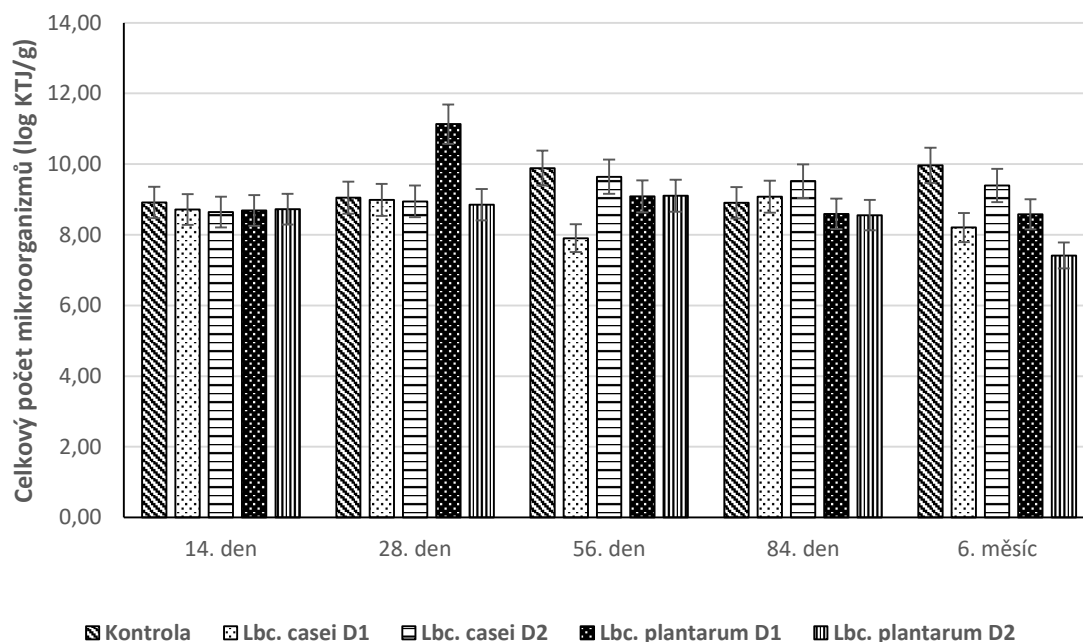
Mléko určené pro výrobu modelových sýrů bylo před tepelným i po tepelném ošetření podrobena mikrobiologickému rozboru z důvodu požadavku vysoké mikrobiologické kvality. Z vyrobených modelových sýrů se stanovily tyto skupiny mikroorganismů: celkový počet mikroorganismů, bakterie mléčného kvašení a mezofilní laktokoky, streptokokoky, koliformní bakterie a enterokoky. Vývoj sledovaných skupin mikroorganismů je zobrazen na Obrázcích 6. – 10.

Celkový počet mikroorganismů (CPM) je znázorněn na Obrázku 6. U kontrolní šarže je vidět, že byl CPM 14. den zrání na hodnotě 8,91 log KTJ/g a hodnota CPM se zvyšovala po celou dobu zrání až do 6. měsíce zrání, kde tato šarže dosáhla počtu 9,96 log KTJ/g. K poklesu došlo 84. den zrání, kde hodnota CPM poklesla na 8,90 log KTJ/g.

U šarže s degradérem *Lbc. casei* D1 14. den zrání byl počet CPM 8,71 log KTJ/g a CPM rostl až do 84. dne zrání, kde dosáhla hodnoty 9,08 log KTJ/g. K poklesu došlo 56. den zrání a to na hodnotu 7,90 log KTJ/g a 6 měsíc zrání, kde počet CPM byl 8,20 log KTJ/g.

Šarže s degradérem *Lbc. casei* D2 měl počet CPM 14. den zrání 8,64 log KTJ/g a v průběhu zrání se obsah CPM zvyšoval až do 56. dne zrání, kde počet CPM byl na hodnotě 9,64 log KTJ/g. Od tohoto dne zrání se počet CPM snižoval a 6. měsíc zrání, byl na hodnotě 9,40 log KTJ/g.

Šarže s degradéry *Lbc. plantarum* D1 a D2 se v době zrání držely přibližně ve stejných hodnotách a 14 den zrání dosahovaly počtu CPM okolo 8,7 log KTJ/g. V 56. dnu zrání dosahovala šarže *Lbc. plantarum* nejvyšší počtu CPM 11,13 log KTJ/g z celé doby zrání a od té doby, u ní CPM začal klesat a u šarže *Lbc. plantarum* D2 hodnota CPM vzrůstala až do 56. dne zrání, kde tato šarže dosáhla hodnoty 9,10 log KTJ/g a šarže *Lbc. plantarum* D1 téměř stejné hodnoty 9,09 log KTJ/g. Nejnižší počet u těchto šarží, byl zaznamenán 6. měsíc zrání a u šarže *Lbc. plantarum* D1 byl počet CPM 8,58 log KTJ/g a u šarže *Lbc. plantarum* D2 byla hodnota CPM 7,41 log KTJ/g.



Obrázek 6. Závislost celkového počtu mikroorganismů v průběhu zrání sýrů

Obsah mléčných koků je zobrazen na Obrázku 7. U kontrolní, byl po celou dobu zrání, až do 6. měsíce zaznamenán růst mléčných koků, kromě 84. dne zrání. U této šarže, byl počet mléčných koků 14. den zrání na hodnotě 8,81 log KTJ/g a 6. měsíc zrání na hodnotě 9,06 log KTJ/g. K poklesu na hodnotu 8,95 log KTJ/g došlo 84. den zrání.

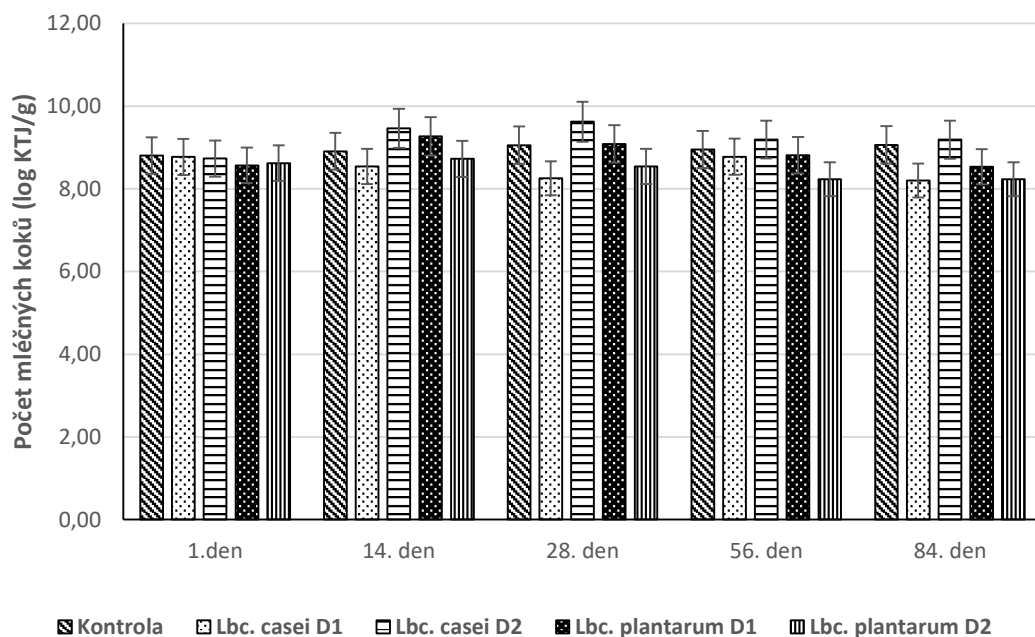
U šarže s degradérem *Lbc. casei* D1 počet mléčných koků 14. den zrání byl na hodnotě 8,77 log KTJ/g a od této doby začal počet klesat až do 6. měsíce zrání, kde počet mléčných koků byl na hodnotě 8,20 log KTJ/g. Počet kolonií mléčných koků, byl od 28. dne zrání ze všech šarží nejnižší a k velkému nárůstu došlo pouze 84. den zrání, kde počet kolonií mléčných koků, byl na hodnotě 8,78 log KTJ/g.

Šarže s degradérem *Lbc casei* D2, kromě 14. dne zrání, kde byl počet mléčných koků na hodnotě 8,73 log KTJ/g, dosahovala nejvyšších hodnot počtu mléčných koků. Růst mléčných koků, byl zaznamenán až do 56. dne zrání, kde se dosáhlo hodnoty 9,62 log KTJ/g a od tohoto dne obsah klesal, až do 6 měsíce, kde byl počet mléčných koků na hodnotě 9,19 log KTJ/g.

Šarže s degradérem *Lbc. plantarum* D1 dosáhla ze všech šarží 14. den zrání nejnižšího počtu kolonií mléčných koků a hodnota byla 8,57 log KTJ/g. Obsah mléčných koků se zvyšoval pouze do 28. dne zrání, kde byl počet kolonií mléčných koků na druhé nejvyšší hodnotě 9,27

log KTJ/g. Od tohoto dne, byl zaznamenán pokles až do 6. měsíce zrání, kde byl počet mléčných koků na nejnižší hodnotě 8,53 log KTJ/g z celé doby zrání.

U šarže s degradérem *Lbc. plantarum* D2, byl počet mléčných koků 14. den zrání na hodnotě 8,62 log KTJ/g a také se zvyšoval pouze do 28. dne zrání, kde byl počet 8,72 log KTJ/g. Od tohoto dne, zde počet kolonií také klesal, až do konce zrání, kde byl počet mléčných koků na hodnotě 8,23 log KTJ/g.



Obrázek 7. Závislost mléčných koků v průběhu zrání sýrů

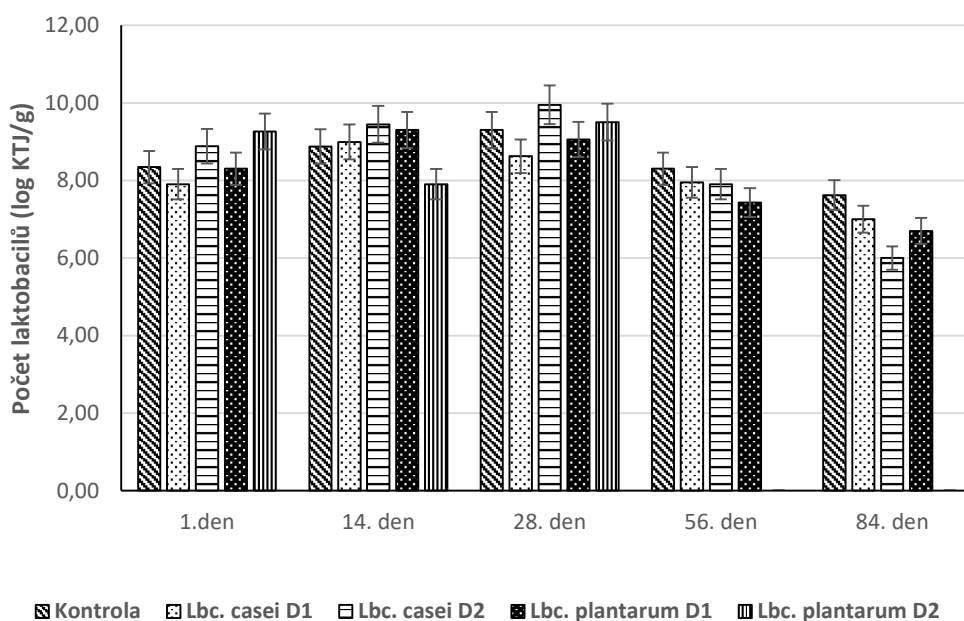
Obsah laktobacilů je znázorněn na Obrázku 8. a z grafu je viditelné, že u některých šarží byl nárůst laktobacilů pouze do 28. dne zrání a u některých do 56. dne zrání. U kontrolní šarže, byl 14. den zrání obsah laktobacilů 8,34 log KTJ/g a obsah laktobacilů stoupal až do 56. dne zrání, kde byla hodnota 9,30 log KTJ/g. Po tomto dni, začaly počty laktobacilů klesat a 6. měsíc zrání, byly na hodnotě 7,00 log KTJ/g.

U šarže s degradérem *Lbc. casei* D1, byla 14. den zrání zaznamenána nejnižší hodnota obsahu laktobacilů ze všech šarží a hodnota zde byla 7,90 log KTJ/g. Obsah laktobacilů u této šarže stoupal pouze do 28. dne zrání a hodnot zde dosahovala 8,99 log KTJ/g. Obsah laktobacilů se snižoval až do 6. měsíce zrání, kde byla zaznamenána hodnota 7,00 log KTJ/g.

Šarže s degradérem *Lbc. casei* D2 měla počet kolonií laktobacilů 14. den zrání na hodnotě 8,88 log KTJ/g a obsah vzrůstal až do 56. dne zrání, kde byla ze všech šarží sýrů zjištěna nejvyšší hodnota počtu laktobacilů a to 9,95 log KTJ/g. Pokles byl zaznamenán až do 6. měsíce zrání, kde počet laktobacilů poklesl na nejnižší hodnotu ze všech šarží a to na 6,70 log KTJ/g.

U šarže s degradérem *Lbc. plantarum* D1, byl počet laktobacilů 14. den zrání na hodnotě 8,30 log KTJ/g a nejvyšší byl 28. den zrání, kde byl zjištěn počet 9,30 log KTJ/g. Pokles laktobacilů byl zaznamenán až do 6. měsíce zrání, kde se zjistil počet laktobacilů na hodnotě 6,70 log KTJ/g.

U poslední šarže s degradérem *Lbc. plantarum* D2 dosahovala tato šarže 14. den zrání 9,26 log KTJ/g laktobacilů. 28. den zrání došlo u této šarže k poklesu laktobacilů a 56. den zrání se počet laktobacilů dostal na hodnotu 9,51 log KTJ/g. 84. den a 6. měsíc, byl u této šarže nulový nárůst laktobacilů.



Obrázek 8. Závislost laktobacilů v průběhu zrání sýrů

Počet enterokoků je zobrazen na Obrázku 9. Z grafu je patrné, že se počet enterokoků téměř po celou dobu znání a skoro všech šarží držel okolo hodnoty 8 - 9 log KTJ/g. U kontrolní šarže, se počet enterokoků 14. a 28. den zrání držel v přibližně stejných hodnotách a to okolo

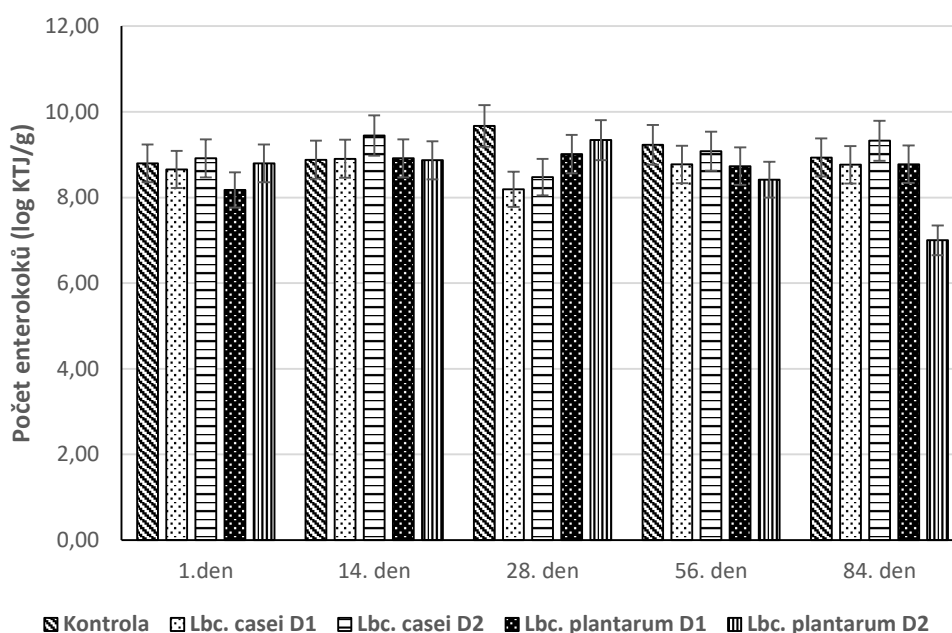
8,85 log KTJ/g, ale 56. den zrání došlo k nárůstu počtu enterokoků na nejvyšší hodnotu ze všech šarží a to na 9,67 log KTJ/g. Od tohoto dne byl zaznamenán pokles enterokoků až do 6. měsíce, kde byla zjištěna hodnota 8,93 log KTJ/g.

U šarže s degradérem *Lbc. casei* D1, byl počet enterokoků 14. den zrání na hodnotě 8,65 log KTJ/g. 28. den zrání došlo k nárůstu počtu enterokoků na hodnotu 8,90 log KTJ/g a poté byl zaznamenán pokles. Nejnižší hodnota, byla zaznamenána 56. den zrání, kde byl enterokoků 8,19 log KTJ/g. Od 56. dne zrání byl zaznamenán opětovný nárůst enterokoků na hodnotu 8,76 log KTJ/g, která byla zjištěna 6. měsíc zrání.

U šarže *Lbc. casei* D2, byl zaznamenán podobný růstový trend enterokoků, jako u předchozí šarže a konkrétně 14. den zrání, byl počet enterokoků na hodnotě 8,91 log KTJ/g a hodnota rostla do 28. dne zrání, kde byla zjištěna hodnota 9,45 log KTJ/g. Při dalším měření v 56. den zrání, byl zaznamenán pokles počtu enterokoků na hodnotu 8,48 log KTJ/g. Další měřením bylo zjištěno, že se počet enterokoků začal opět navyšovat na hodnotu 9,33 log KTJ/g, která byla naměřena 6. měsíc zrání.

Šarže s degradérem *Lbc. plantarum* D1, byl počet enterokoků 14. den zrání ze všech šarží na nejnižší hodnotě 8,18 log KTJ/g. Růst byl zaznamenán do 56. dne zrání, kde počet enterokoků dosáhl hodnoty 9,01 log KTJ/g. Hodnota poté poklesla 84. den zrání, kde byl počet enterokoků na hodnotě 8,73 log KTJ/g.

U poslední šarže s degradérem *Lbc. plantarum* D2, byl počet enterokoků 14. den zrání na hodnotě 8,80 log KTJ/g a měl rostoucí charakter, až do 56. dne zrání, kde byl počet enterokoků na hodnotě 9,34 log KTJ/g. Poté byl u enterokoků zaznamenán pokles až do 6. měsíce zrání, kde byla zaznamenán nejnižší počet ze všech šarží a to konkrétně 7,00 log KTJ/g.



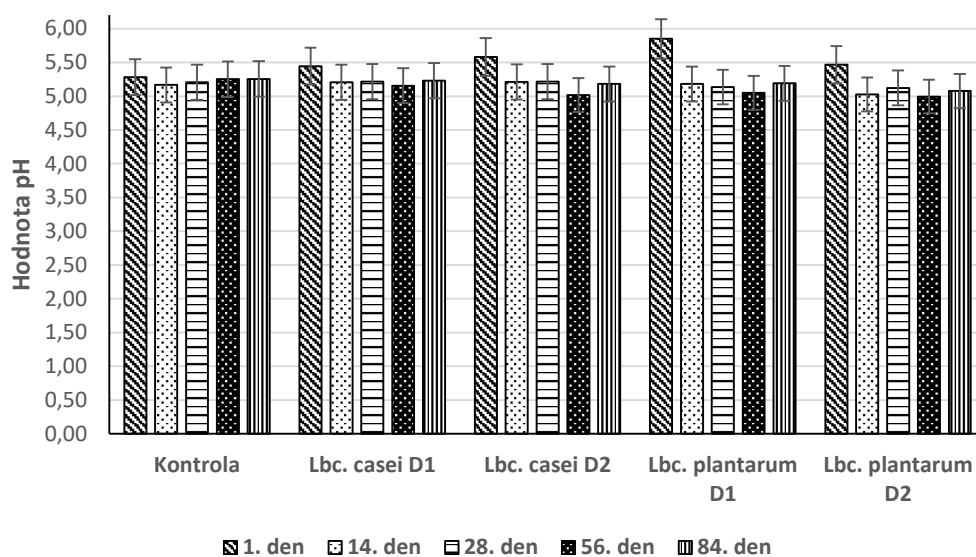
Obrázek 9. Závislost enterokoků v průběhu zrání sýrů

## 5.2 Základní chemická analýza

### 5.2.1 Stanovení pH

Během 84 dnů zrání byl sledován vývoj pH a tyto výsledky jsou zobrazeny na Obrázku 10. Z grafu je patrné, že pH u všech šarží, mělo spíše klesající charakter. U kontrolní šarže, byla hodnota pH nejvyšší 1. den zrání 5,28. 14. den zrání klesla na hodnotu 5,17 a od tohoto dne opět vzrůstala, až na hodnotu pH 5,25. Šarže s degradérem *Lbc. casei* D1 měla 1. den zrání nejvyšší hodnotu pH a to 5,45 a poté se držela v průměru u hodnoty pH 5,22 až na 56. den zrání, kde hodnota pH poklesla na 5,16. Šarže s degradérem BA *Lbc. casei* D2 měla podobný průběh jako šarže s degradérem *Lbc. casei* D1, jenom hodnota pH 1. den zrání dosahovala 5,58 a 56. den pH pokleslo na 5,02. Šarže s použitým degradérem *Lbc. plantarum* D1 měla ze všech šarží 1. den nejvyšší hodnotu pH a dosahovala hodnoty 5,85 a ostatní dny se kromě 56. dne, kde byla hodnota pH 5,05 držela v průměru okolo 5,18. Šarže s degradérem *Lbc. plantarum* D2 měla 1. den zrání hodnotu pH 5,46 a v průběhu zrání došlo ke snižování a opětovnému zvyšování pH. Poslední den zrání pH sýru skončilo na hodnotě 5,08. Změny pH v sýru mohou být způsobeny průběhem zrání v matrici.

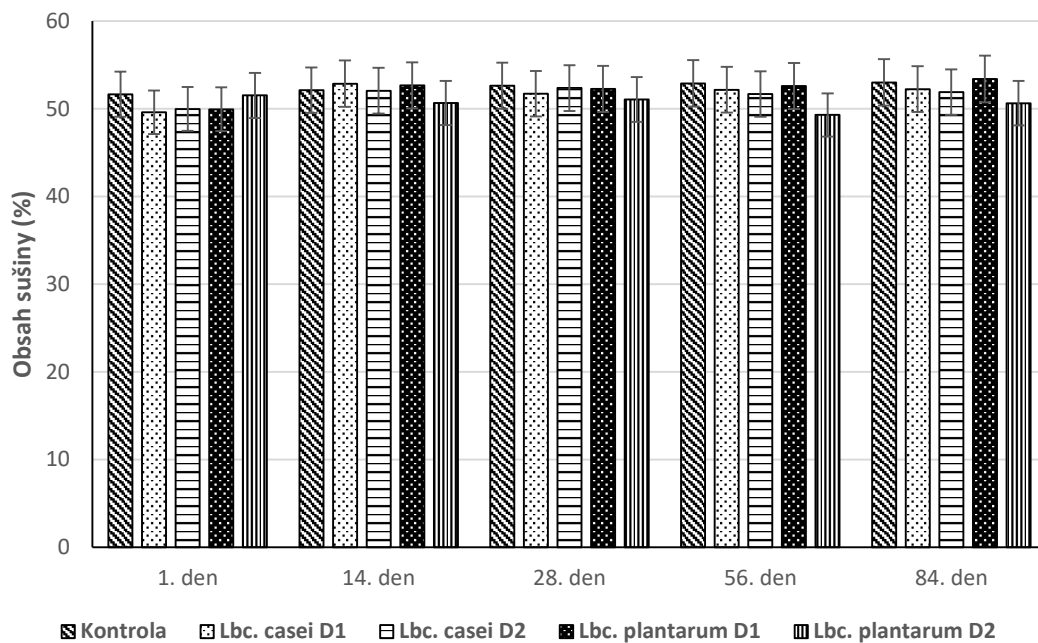




Obrázek 10. Závislost změny pH v šaržích sýrů v průběhu zrání

### 5.2.2 Stanovení obsahu sušiny

Výsledky z měření obsahu sušiny v sýru v průběhu 84. denního zrání jsou znázorněny na Obrázku 11. V grafu je vidět, že obsah sušiny v průběhu zrání u všech šarží sýrů spíše narůstal kromě šarže sýru s degradérem *Lbc. plantarum* D2, kde sušina v době zrání klesla. U kontrolní šarže byl obsah sušiny 1. den zrání 51,7 %. Poslední 84. den zrání obsah sušiny vzrostl o necelé 3 %. U šarže sýru s použitým degradérem BA *Lbc. casei* D1 byla sušina 1. den zrání na hodnotě 49,6 %. V průběhu zrání do 84. den sušina vrostla o necelé 3%. Odchylka v obsahu sušiny byla zaznamenána 14. den zrání, kde sušina měla hodnotu 52,9 %. V případě šarže sýru s degradérem BA *Lbc. casei* D2 byl obsah sušiny 1. den zrání na hodnotě 50 %. Obsah sušiny mírně rostl až do 28. dne zrání, kde byla zaznamenána hodnota vyšší o 2,5 %. Po 56 dnech zrání sušina mírně poklesla. Poslední den zrání obsah sušiny opět mírně vzrostl na hodnotu 0,2 %. Šarže sýru s degradérem BA *Lbc. plantarum* D1 měla obsah sušiny 1. den zrání na hodnotě 52,7 %. V průběhu zrání sušina rostla a 84. den zrání byla hodnota vyšší o 0,7 %. Odchylka byla zaznamenána 14. den zrání, kde sušina měla hodnotu 52,7 %. U poslední šarže s použitým degradérem BA *Lbc. plantarum* D2 byl obsah sušiny 1. den zrání na hodnotě 51,5 % a klesal až do 56. dne zrání, kde byla hodnota nižší o 2,2 %. Poslední 84. den zrání obsah sušiny vzrostl na hodnotu 50,6 %. Cílem bylo vytvořit stejné podmínky ve všech sýrech s minimálními odchylkami, což bylo u obsahu sušiny splněno a odchylky zde byly maximálně o 3 % jiné.

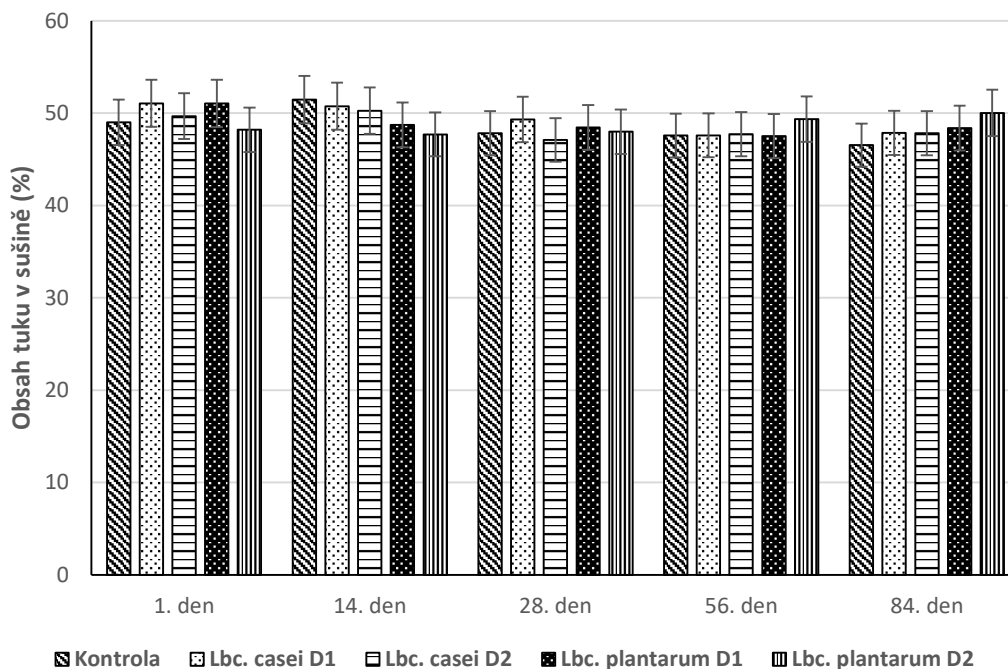


Obrázek 11. Závislost změny obsahu sušiny v průběhu zrání u různých šarží sýrů

### 5.2.3 Stanovení obsahu tuku v sušině

Během 84. dnů zrání se u sýrů měřil obsah tuku v sušině a tyto výsledky jsou zobrazeny na Obrázku 12. V grafu je vidět, že obsah tuku v sušině v průběhu zrání klesal téměř u všech šarží sýrů kromě šarže s degradérem *Lbc. plantarum* D2, kde obsah tuku v sušině rostl. U kontrolní šarže byl obsah tuku v sušině 1. den zrání na hodnotě 49 %. Ve 28. dnu zrání obsah tuku v sušině mírně vzrostl o 2,5 % a s postupnou dobou zrání tuk v sušině lehce klesal. Poslední 84. den zrání byl obsah tuku v sušině u této šarže na hodnotě 46,5 %. U šarže sýru s degradérem *Lbc. casei* D1 byla hodnota tuku v sušině 1. den zrání 51,1 %. V průběhu zrání tuk v sušině lehce klesal a u této šarže byla hodnota tuku v sušině 84. den zrání na 47,8 %. U šarže sýru s použitým degradérem *Lbc. casei* D2, byl 1. den obsah tuku v sušině na 49,7 %. Poté 28. den zrání hodnota nepatrně vzrostla o 0,6 %. 56. den zrání obsah tuku v sušině u této šarže mírně poklesl na 47,1 %. Po tomto dni byl opět zaznamenán mírný nárůst tuku v sušině. U šarže sýru s degradérem *Lbc. plantarum* D1 byl obsah tuku v sušině 1. den zrání 51 %. V době zrání tuk v sušině lehce klesal a poslední 84. den zrání byla hodnota nižší o 2,5 %. U poslední šarže sýru s degradérem *Lbc. plantarum* D2 hodnota obsahu tuku v sušině 1. den zrání byla 48,2 %. Mírný pokles o 0,5 % byl zaznamenán 14. den zrání a od této doby tuk v sušině opět lehce rostl. Poslední 84. den zrání byla u této šarže zaznamenána hodnota

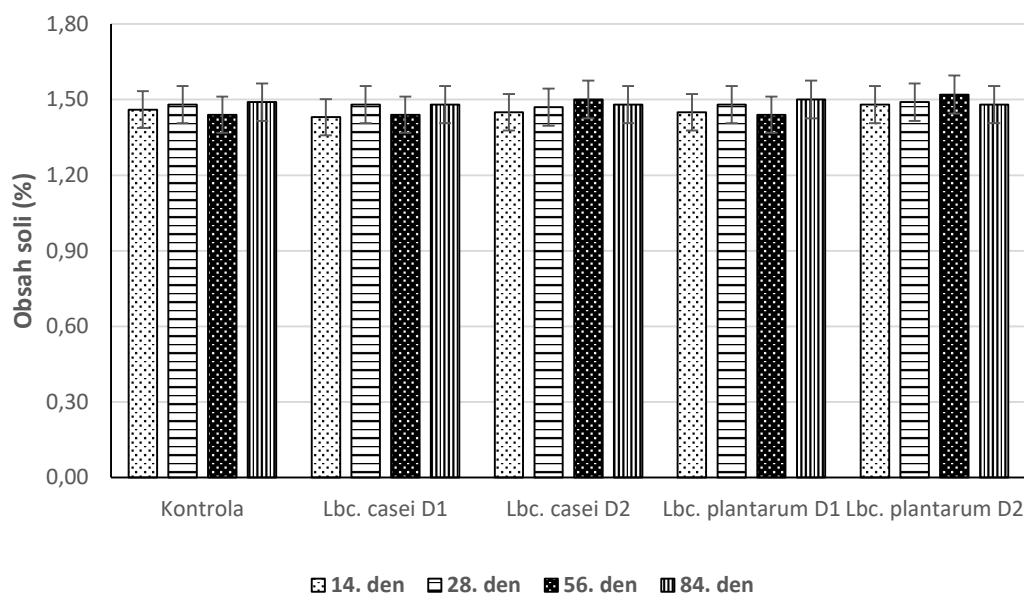
50 %. Obsah tuku v sušině se v průběhu zrání měnil jen nepatrně a tak byly v sýrech s různými mikroorganismy nastaveny stejné podmínky pro růst těchto mikroorganismů.



Obrázek 12. Závislost změny obsahu tuku v sušině v průběhu zrání na daných šaržích sýrů

#### 5.2.4 Stanovení obsahu soli

Obsah soli v sýru byl stanoven od 14. dne do 84. dne zrání a výsledky jsou zobrazeny na Obrázku 13. Z grafu je patrné, že se obsah soli v sýrech v průběhu zrání změnil prakticky jen minimálně a nejvyšší změna obsahu soli byla zaznamenána o 0,5 %. Takto nevýrazné změny by neměli mít dopad na růst či omezení růstu mikroorganismů v sýrech, jejich tvrdost, apod.



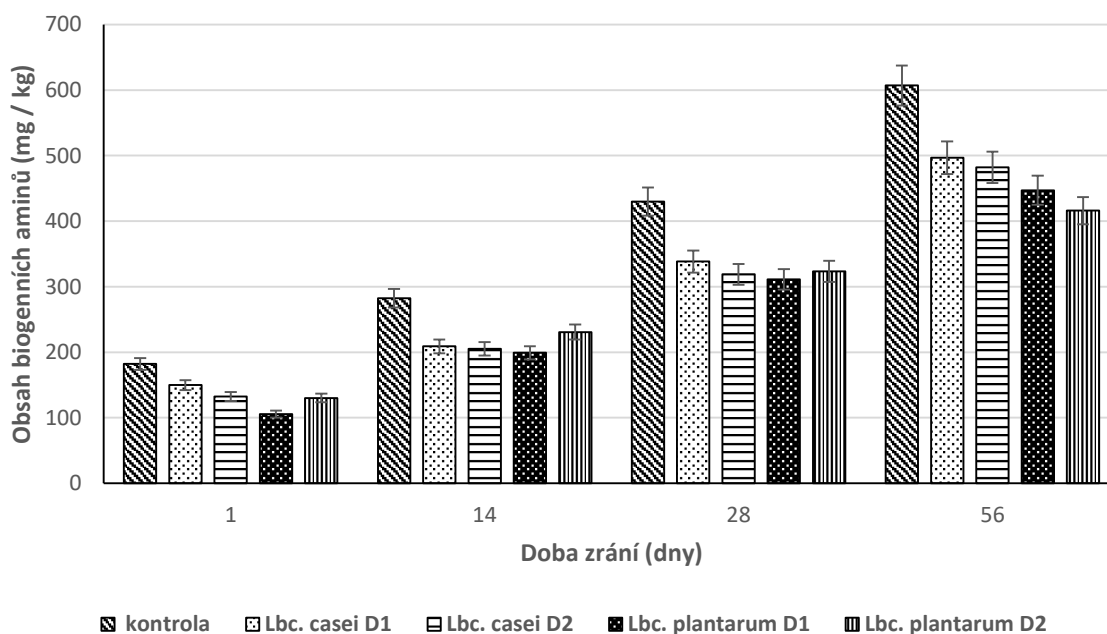
Obrázek 13. Závislost změny obsahu soli na šaržích sýrů v průběhu zrání

### 5.3 Stanovení obsahu biogenních aminů

V průběhu 56. denního zrání byl u sýrů sledován obsah biogenních aminů. Záměrem bylo je sledovat po celou dobu experimentu, tedy až do 6. měsíce zrání, ale z důvodu omezeného přístupu do laboratoří, kvůli zamezení šíření Covid-19 byl obsah BA analyzován pouze do 56. dne zrání. Mezi stanovené biogenní aminy patří fenyethylamin, putrescin, kadaverin, spermin a tyramin. Tyto hodnoty jsou zobrazeny na Obrázcích 14 - 19.

Z grafu celkového obsahu biogenních aminů, který je znázorněn na Obrázku 14. je patrné, že kontrolní šarže dosahovala od začátku až do konce nejvyšších hodnot. U kontrolní šarže byla nejvyšší hodnota 1. den zrání a obsah biogenních aminů byl zde na hodnotě 182,2 mg/kg. U šarže s degradérem *Lbc. casei* D1 byl obsah BA 1. den zrání o něco nižší a hodnota byla 149,9 mg/kg. U šarže s degradérem *Lbc. casei* D2 byl obsah biogenních aminů 1. den zrání 132,5 mg/kg. Šarže s degradérem *Lbc. plantarum* D1 měla 1. den zrání nejnižší obsah biogenních aminů a obsahovala 105,5 mg/kg. Poslední šarže s degradérem *Lbc. plantarum* D2 obsahovala 1. den zrání 130,1 mg/kg biogenních aminů. 14. a 28. den se obsah biogenních aminů stále zvyšoval a šarže s degradérem *Lbc. plantarum* D1 dosahovala do 28. dne zrání nejnižšího obsahu biogenních aminů a prokázala tak nejvyšší schopnost degradace, ze všech použitých degradérů BA. Poslední 56. den zrání byl u kontrolní šarže naměřen obsah 606,9 mg/kg biogenních aminů, což je téměř trojnásobně vyšší koncentrace, než první den

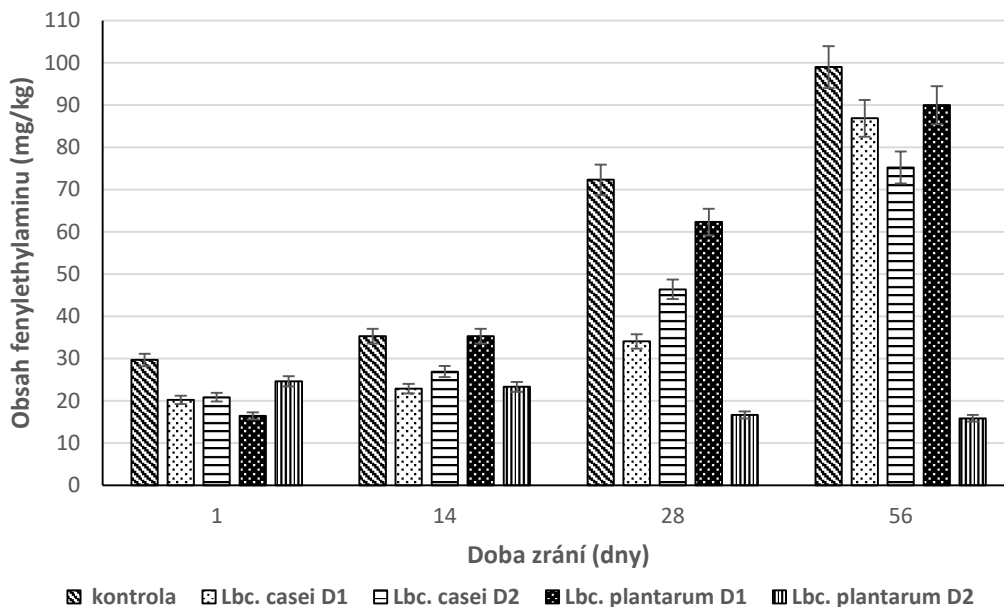
zrání. Šarže s degradérem *Lbc. casei* D1, měla 56. den zrání vyšší obsah biogenních aminů o 347 mg/kg. Šarže sýru s degradérem *Lbc. casei* D2 měla 56. den zrání zvýšený obsah biogenních aminů o 349,6 mg/kg. Šarže s degradérem *Lbc. plantarum* D1 už nedosahovala nejvyššího obsahu biogenních aminů ze všech šarží a množství BA poslední den zrání byl vyšší o 341,6 mg/kg. Poslední šarže s degradérem *Lbc. plantarum* D2 měla ze všech šarží poslední den zrání nejnižší nárůst BA a konkrétně byl u této šarže zaznamenán nárůst od začátků zrání pouze 286 mg/kg. Šarže s degradérem *Lbc. plantarum* D2 měla ze všech šarží s degradérem spolu s použitým producentem, nejvyšší schopnost degradovat biogenní aminy, ale to až 56. den zrání. Dále to byl použitý degradér v šarži *Lbc. plantarum* D1, *Lbc. casei* D1 a *Lbc. casei* D2.



Obrázek 14. Závislost změny celkového obsahu biogenních aminů v průběhu zrání sýrů

Na Obrázku 15. je znázorněn obsah fenylethylaminu ve všech modelových šaržích sýrů. Z grafu je patrné, že nejvyššího obsahu fenylethylaminu v době zrání vykazovala kontrolní šarže, která dosáhla 56. den zrání hodnoty 99 mg/kg. Šarže s degradérem *Lbc. plantarum* D2, jako jediná vykazovala pokles fenylethylaminu od 1. dne zrání až do konce zrací doby. Dokázala snížit obsah fenylethylaminu z hodnoty 24,6 mg/kg, která byla naměřena 1. den zrání o 8,8 mg/kg. Tato šarže, tak dosahovala nejnižšího obsahu fenylethylaminu, ze všech

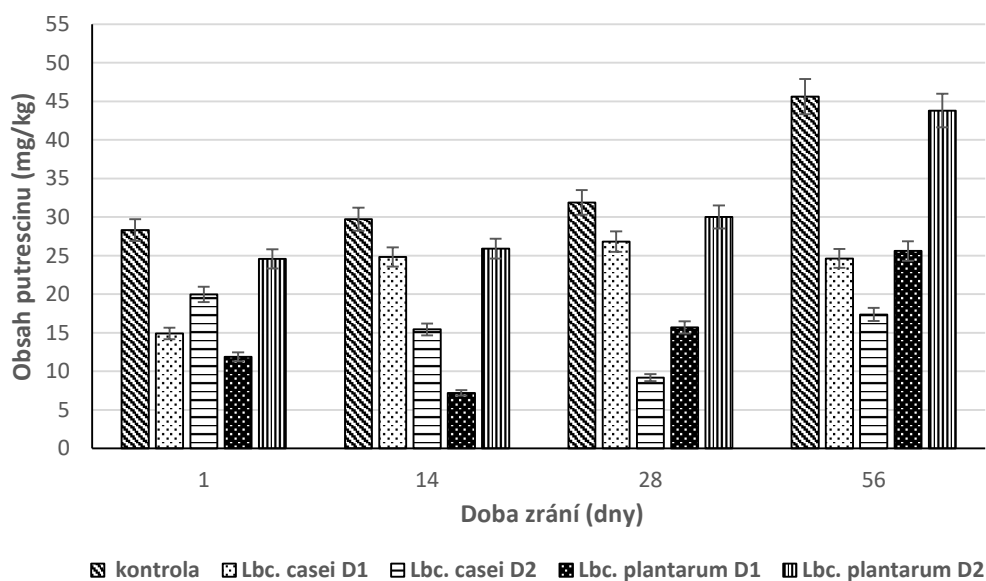
šarží v průběhu zrání, kromě 1. dne zrání, kde dosahovala 2. nejvyšší hodnoty fenylethylaminu. Šarže s degradérem *Lbc. casei* D1 měla 1. den zrání hodnotu fenylethylaminu 20,2 mg/kg a 56. den zrání se tento obsah o 66,2 mg/kg. Tato šarže měla 14. den zrání nejnižší obsah fenylethylaminu ze všech ostatních šarží. U šarže s degradérem *Lbc. casei* D2, byl 1. den zrání obsah fenylethylaminu na hodnotě 20,8 mg/kg a poslední 56. den zrání se obsah BA zvýšil o 54,4 mg/kg a tato hodnota byla druhá nejnižší ze všech šarží. Šarže s degradérem *Lbc. plantarum* D1 měla 1. den zrání nejnižší obsah fenylethylaminu ze všech šarží a tato hodnota byla 16,4 mg/kg. 56. den zrání tato šarže dosahovala druhé nejvyšší hodnoty fenylethylaminu ze všech šarží sýrů a obsah se zvýšil o 73,5 mg/kg. Žádná z modelových šarží sýrů nepřekročila v průběhu zrání hranici 100 mg/kg fenylethylaminu.



Obrázek 15. Závislost obsahu fenylethylaminu v průběhu zrání sýrů

Na Obrázku 16. je znázorněn obsah putrescinu v šaržích sýrů. Kontrolní šarže měla nejvyšší obsah putrescinu po celou dobu zrání. V 1. dnu zrání tato šarže obsahovala 28,3 mg/kg putrescinu a 56. den zrání se obsah zvýšil o 17,3 mg/kg, což je 1,5 × vyšší než na začátku. Šarže s degradérem *Lbc. casei* D1 měla 1. den zrání obsah putrescinu na hodnotě 14,9 mg/kg a obsah vzrůstal až do 28. dne zrání, kde byla zjištěna hodnota 26,8 mg/kg. V 56. dnu zrání byl u této šarže zaznamenán pokles putrescinu na hodnotu 24,6 mg/kg. U šarže s degradérem *Lbc. casei* D2 byl obsah putrescinu 1. den zrání na hodnotě 19,9 mg/kg a poté začal obsah

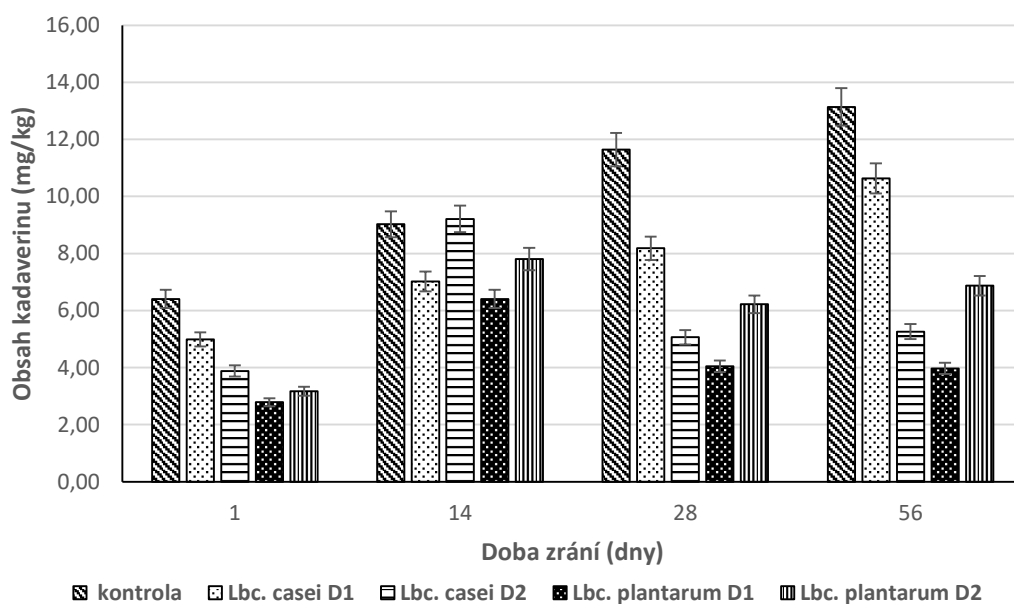
putrescinu klesat až do 28. dne zrání, kde poklesl o 10,7 mg/kg od začátku zrání. V 56. dnu zrání došlo k nárůstu putrescinu na hodnotu 17,4 mg/kg, což je téměř dvojnásobné zvýšení od 28. dne zrání. U šarže s degradérem *Lbc. plantarum* D1 byla hladina putrescinu 1. den zrání na hodnotě 11,9 mg/kg. U této šarže obsah putrescinu vzrůstal po celou dobu zrání kromě 14. dne, kde byl zaznamenán mírný pokles putrescinu na hodnotu 7,2 mg/kg. V 56. dnu zrání byla změřena hladina putrescinu na hodnotě 25,6 mg/kg. Šarže s degradérem *Lbc. plantarum* D2 dosahovala po celou dobu zrání druhého nejvyššího obsahu putrescinu ze všech šarží a 1. den zrání byla tato hladina na hodnotě 24,6 mg/kg a v 56. dnu zrání se hladina putrescinu zvedla o 19,2 mg/kg. Všechny šarže zůstaly pod hranicí 100 mg/kg a nárůst tohoto biogenního aminu v průběhu zrání nebyl u některých šarží až tak výrazný. Nejlepší schopnost degradace putrescinu prokázala šarže s degradérem *Lbc. casei* D2.



Obrázek 16. Závislost obsahu putrescinu v průběhu zrání sýrů

Na obrázku 17. je zobrazen obsah kadaverinu ve všech šaržích sýrů v průběhu zrání. Z grafu je patrné, že kadaverin se ze všech naměřených biogenních aminů držel v nejnižší naměřené hladině a nejvyšších obsahů opět dosahovala kontrolní šarže. U této šarže byl 1. den zrání obsah kadaverinu na hodnotě 6,4 mg/kg a 56. den zrání byl obsah kadaverinu dvakrát vyšší a to konkrétně o 6,7 mg/kg. U šarže s degradérem *Lbc. casei* D1 se obsah kadaverinu 1. den zrání zjistil na hodnotě 5 mg/kg a poslední den zrání to byla hodnota vyšší o 5,6 mg/kg. U

této šarže kadaverin dosahoval druhé nejvyšší hodnoty kromě 14. dne zrání. Šarže s degradérem *Lbc. casei* D2 měla hodnotu kadaverinu 3,9 mg/kg 1. den zrání a nejvyšší hodnoty dosáhla 14. den zrání, kde byla zjištěna hodnota 9,2 mg/kg. Poté obsah kadaverinu této šarže klesal až do 56. dne zrání. Nejnižší hodnota u této šarže byla zjištěna 28. den zrání a to 5,1 mg/kg. U šarže s degradérem BA *Lbc. plantarum* D1 byla obsah kadaverinu 1. den zrání na hodnotě 2,8 mg/kg a nejvyšší hodnota byla změřena 14. den zrání, kde obsah kadaverinu dosáhl hodnoty 6,4 mg/kg. Od tohoto dne hladina kadaverinu mírně klesala až do 56. dne zrání, kde byla naměřena hodnota 4 mg/kg. Šarže s degradérem *Lbc. plantarum* D2 měl podobný trend v průběhu měření kadaverinu jako šarže *Lbc. casei* D2. U této šarže byl zjištěný obsah kadaverinu na hodnotě 3,2 mg/kg a nejvyššího obsahu se také dosáhlo 14. den zrání, kde hodnota dosahovala 7,8 mg/kg. Od této chvíle byl zaznamenán pokles a nejnižší hodnota byla zjištěna 28 den zrání a to konkrétně 6,2 mg/kg. Tento biogenní amin byl nejlépe degradován šarží s degradérem *Lbc. plantarum* D1, protože poslední den zrání vykazovala nejnížší hodnoty. Dále to byla šarže s degradérem *Lbc. casei* D2.

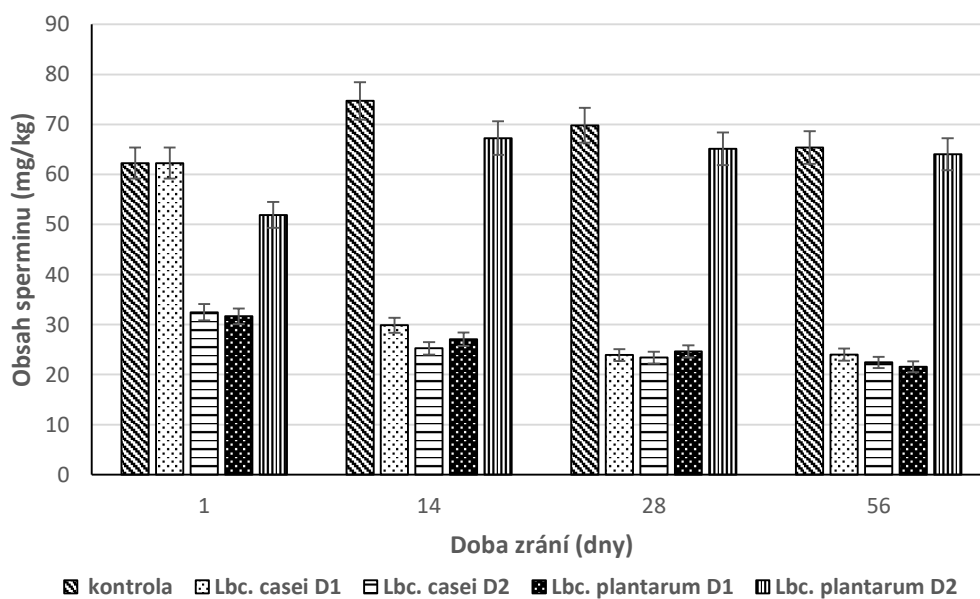


Obrázek 17. Závislost obsahu kadaverinu v průběhu zrání sýrů

Na Obrázku 18. je znázorněn obsah sperminu v modelových šaržích sýrů. Z grafu je patrné, že obsah sperminu v průběhu zrání u většiny šarží spíše klesal. Nejvyššího obsahu sperminu dosahovala kontrolní šarže a 1. den zrání u ní byla zjištěna hodnota sperminu 62,3 mg/kg.

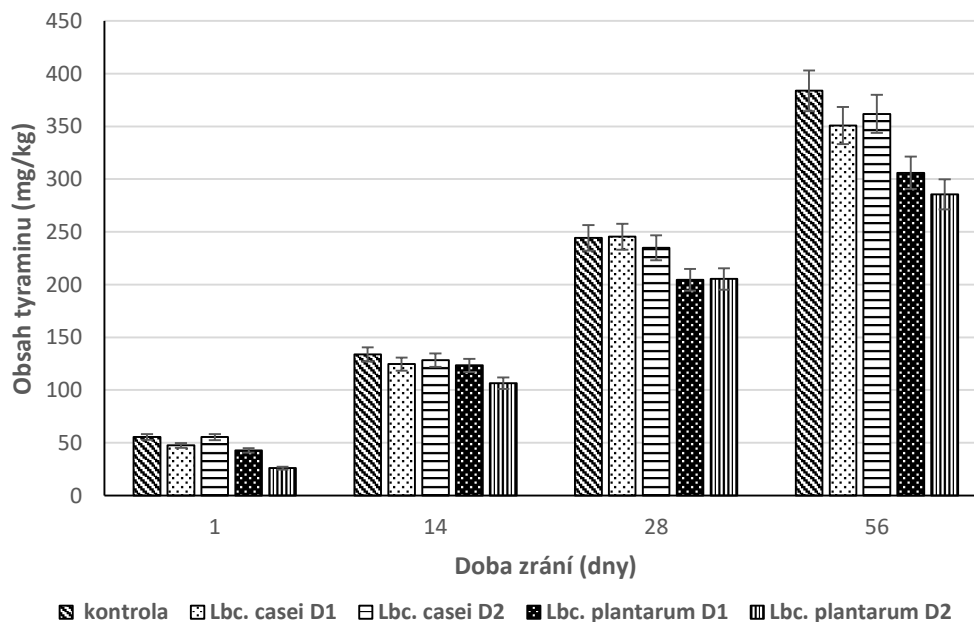


Nejvyššího obsahu tato šarže dosáhla 14. den zrání, kde byla zjištěna hodnota 74,7 mg/kg. Po tomto měření začal obsah sperminu klesat a skončil na hodnotě 65,4 mg/kg 56. den zrání. U šarže s degradérem BA *Lbc. casei* D1 byl obsah sperminu 1. den zrání, také na hodnotě 62,3 mg/kg. Po této době byl zaznamenán velký pokles a v 56. dnu zrání byla naměřena hodnota nižší o 38,3 mg/kg. U šarže s degradérem *Lbc. casei* D2 byl 1. den zrání zjištěn obsah sperminu na hodnotě 32,5 mg/kg a 56. den zrání hladina sperminu klesla o 10,1 mg/kg. Tato šarže ještě dosahovala 14. a 28. den zrání nejnižších hodnot sperminu ze všech šarží sýrů. Šarže s degradérem *Lbc. plantarum* D1 dosahovala podobných hodnot obsahu sperminu jako předchozí šarže, ale nejnižší hodnoty sperminu ze všech šarží dosáhla v 1. a 56. dnu zrání. U šarže s degradérem *Lbc. plantarum* D2 byl naměřen druhý nejvyšší obsah sperminu ze všech šarží v průběhu zrání. V 1. dnu zrání tato šarže dosáhla hladiny sperminu 51,9 mg/kg a nejvyšší hodnota byla zaznamenána 14. den zrání a to konkrétně 67,2 mg/kg. Od tohoto měření byl zaznamenán pokles sperminu a 56. den zrání byla hodnota sperminu 64,0 mg/kg. Spermin nejlépe degradovala šarže s degradérem *Lbc. plantarum* D1, u které byl poslední den zrání zaznamenán nejnižší obsah tohoto biogenního aminu. Nejvyšší pokles byl zaznamenán u šarže s degradérem *Lbc. casei* D1 a to o 38,4 mg/kg ve 28 dnu zrání. U kontrolní šarže, kde byl použit pouze producent BA bez použití degradéra, byl také zaznamenán nepatrný pokles sperminu v průběhu zrání.



Obrázek 18. Závislost obsahu sperminu v průběhu zrání sýrů

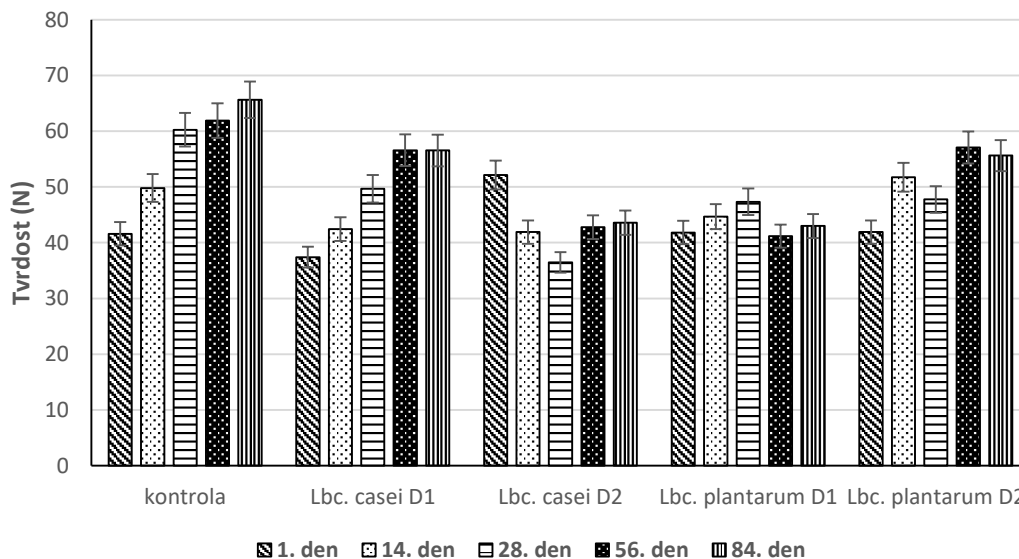
Na Obrázku 19. je znázorněn obsah tyraminu ve všech modelových šaržích sýrů a z tohoto grafu je patrné, že tyramin byl nejvíce zastoupeným biogenním aminem ze všech zjištěných biogenních aminů. V průběhu zrání se obsah biogenních aminů u šarží zvýšil téměř osminásobně. Kontrolní šarže dosahovala nejvyššího obsahu tyraminu, téměř po celou dobu zrání kromě 28. dne zrání, kde nejvyššího obsahu dosáhla šarže s degradérem *Lbc. casei* D1. Kontrolní šarže 1. den zrání dosahovala obsahu tyraminu 55,5 mg/kg a poslední den zrání byl obsah tyraminu vyšší o 328,3mg/kg. U šarže s degradérem BA *Lbc. casei* D1 byl obsah tyraminu 1. den zrání na hodnotě 47,5 mg/kg a poslední den zrání se obsah zvýšil o 303,3 mg/kg. Šarže s degradérem *Lbc. casei* D2 dosahovala hodnoty tyraminu 1. den zrání 55,4 mg/kg a 56. den zrání hodnota obsahu tyraminu vzrostla o 306,4 mg/kg. U šarže s degradérem *Lbc. plantarum* D1 byl obsah tyraminu 1. den zrání na hodnotě 42,8 mg/kg a 56. den zrání obsah tyraminu vzrostl o 263,2 mg/kg. Poslední šarže s degradérem *Lbc. plantarum* D2, dosahovala nejnižší hodnoty tyraminu téměř po celou dobu zrání kromě 28. dne zrání, kde nejnižší hodnoty dosahovala šarže s degradérem *Lbc. plantarum* D1. U této šarže byl obsah tyraminu 1. den zrání na hodnotě 26 mg/kg a v 56. dnu zrání se obsah tyraminu zvýšil o 259,5 mg/kg. Obsah tohoto biogenního aminu se pod bezpečnou hladinou 100 mg/kg pro člověka držel pouze do 14. dne zrání a od tohoto dne se obsah tyraminu významně zvýšil nad bezpečnou hranici u všech šarží.



Obrázek 18. Závislost obsahu tyraminu v průběhu zrání sýrů

## 5.4 Texturní profilová analýza

Během 84. dnů zrání byla u vyrobených sýrů provedena texturní profilová analýza. Tvrdost sýrů byla vyjádřena jako maximální síla ( $N$ ), která byla použita pro stlačení měřeného vzorku o 25 % jeho původní výšky. Tyto výsledky jsou zobrazeny na Obrázku 20. U kontrolní šarže byl zaznamenán růst tvrdosti. 1. den zrání tvrdost dosahovala 42 N a poslední 84. den zrání byla tvrdost na hodnotě 66 N. U šarže D1 s degradérem *Lbc. casei* tvrdost také vzrůstala, ale měla o něco málo nižší tvrdost než kontrolní šarže. 1. den zrání byla tvrdost u této šarže sýru 37 N a poslední 84. den zrání byla tvrdost 57 N. U šarže D2 s použitým degradérem *Lbc. casei* tvrdost klesala. 1. den byla tvrdost u této šarže 52 N a klesala až do 28. dne k 36 N. Poté začala tvrdost opět stoupat a 84. den byla tvrdost na hodnotě 44 N. U šarže s degradérem *Lbc. plantarum* D1 tvrdost stoukala a 1. den zrání byla na hodnotě 42 N. 28. den zrání se tvrdost dostala na 47 N a po tomto dni tvrdost mírně poklesla na 41 N. Poslední 84. den zrání, tvrdost opět nepatrně narostla na 43 N. U poslední šarže s D2 s degradérem *Lbc. plantarum* tvrdost také stoukala a 1. den zrání měla hodnotu 42 N. 28. den zrání, byl zaznamenán pokles tvrdosti. Nejvyšší tvrdosti dosáhla tato šarže 56. den zrání a to hodnoty 57 N. 84. den zrání byla tvrdost nižší o 1 N.



Obrázek 20. Závislost změny tvrdosti v sýrech v průběhu zrání

## 5.5 Souhrnná diskuze

V průběhu 84. denního zrání holandských sýrů typu gouda byl proveden mikrobiologický rozbor, řada chemických analýz, texturní profilová analýza, stanoven byl také obsah biogenních aminů. Všechny vyrobené modelové šarže sýrů byly ponechány zrát ve zrací komoře při teplotě  $10 \pm 2$  °C.

Z mikrobiologické analýzy bylo zjištěno, že se celkový počet mikroorganismů téměř u všech šarží zvyšoval do 56. dne zrání, a pak jejich počet postupně klesal s prodlužující se dobou zrání.

Na zrání sýrů mají vliv starterové (zákysové) mikroorganismy, ale také non-starterové (nezákysové) mikroorganismy. Pro výrobu sýrů se jako základní kultura využívá kultura smetanová, která zahrnuje bakterie mléčného kvašení – laktokoky, příp. leukonostoky a primární funkcí této kultury je produkce kyseliny mléčné během výroby sýrů, pro snížení pH mléka na dostatečnou úroveň. Také přispívají ke zrání sýrů, protože enzymy těchto bakterií se podílejí na proteolýze, limitované lipolýze a přeměně aminokyselin na aromatické sloučeniny. Nestarterové bakterie (NSLAB) se do sýru nepřidávají záměrně (nezákysové mikroorganismy) a pocházejí ze syrového mléka nebo z výrobního prostředí. Tyto mikroorganismy mohou ovlivňovat např. výslednou chuť sýru, ale současně mohou některé z nich produkovat také nežádoucí sloučeniny jako např. biogenní aminy [58]. Z naměřených hodnot bylo zjištěno, že počet mléčných koků, kam lze zařadit skupinu laktokoků, se u kontrolní šarže po celou dobu zrání zvyšoval až do 84. den, kde došlo k mírnému poklesu počtu laktokoků. U šarže *Lbc. casei* D1 se obsah mléčných koků naopak snižoval do 56. dne a 84. den zrání došlo k malému zvýšení jejich počtu. Šarže *Lbc. casei* D2 měla nárůst mléčných koků až do 56. dne zrání a od tohoto stanovení se jejich počet snižoval až do konce zrání. Šarže *Lbc. plantarum* D1 a D2 měly podobný průběh růstu mléčných koků. Jejich počet se zvyšoval do 28. dne zrání a poté už se jenom snižovaly, ale *Lbc. plantarum* D1 měla po celou dobu vyšší počet mléčných koků, než *Lbc. plantarum* D2. Ze všech šarží měla šarže *Lbc. casei* D2 nejvyšší obsah mléčných koků a kontrolní šarže dosahovala druhého nejvyššího počtu mléčných koků. Z analýzy těchto mikroorganismů bylo zjištěno, že s prodlužující se dobou zrání dochází ke snižování počtu bakterií mléčného kvašení, což je v souladu s tvrzením Foxe a kol. [49], který píše, že v době zrání dochází k lýzi startérových mikroorganismů [49]. Bu-

něčná lýza a následné uvolňování intracelulárních enzymů, zejména peptidáz a enzymů degradující aminokyseliny, dostává značnou pozornost, jako důležitý aspekt vývoje chuti v sýrech [58].

*Lactobacillus casei* a *Lactobacillus plantarum* a mnoha dalších patří mezi nestarterové BMK, ale v našem případě byly vybrané kmeny do sýru přidány záměrně jako doplňková kultura [58]. U analýzy laktobacilů bylo zjištěno, že kontrolní šarže měla zvyšující se počet laktobacilů až do 56. dne zrání sýru a poté docházelo ke snižování počtu laktobacilů až do konce zrání. Stejný průběh měla i šarže *Lbc. casei* D2. U šarže *Lbc. casei* D1, byl zaznamenán růst laktobacilů pouze do 28. dne zrání a pak docházelo k jejich snižování. Totéž bylo zaznamenáno i u šarže *Lbc. plantarum* D1. V případě šarže *Lbc. plantarum* D2 byly laktobacily stanoveny pouze do 56. dne zrání a od této chvíle již nebyl zaznamenán jejich růst. Ve 28. dnu zrání bylo z výsledků zjištěno, že nejvyšší obsah laktobacilů v tomto dnu má šarže *Lbc. casei* D2 a po 28. dnu zrání to byla kontrolní šarže. Snižování laktobacilů bylo pravděpodobně zapříčiněno lýzí buněk, kvůli spotřebě živin a hromadění metabolitů [49, 58]. Heterofermentativní laktobacily mohou přežít šetrnou pasteraci a v mnoha polotvrdých sýrech se vyskytují v počtu  $10^8$  CFU/g. Jejich optimální růst je při pH 5,5-6,2. Nicméně aktivita laktobacilů a enterokoků nebývají významně ovlivňovány v sýrech běžným rozsahem pH, obsahem soli a vlhkostí. Jejich počet většinou ovlivňuje teplota zrání. Nestarterové laktobacily mají generační dobu přibližně 8,5 dne v sýru zrajícím při 6 °C a životaschopné buňky lze získat i ze sýru, který byl skladován při 10 °C po dobu 3 let. Rychlé ochlazení a zrání sýrů při nízkých teplotách snižuje rychlost jejich růstu [58]. Přesto lze konstatovat, že se mohou výraznou měrou podílet na procesech během zrání sýrů.

Enterokoky byly v sýrech také nalezeny a byly stanoveny na agaru Slanetz Bartley. Burdychova a kol. [51] i s ostatními autory potvrdily, že nejčastěji se vyskytujícími enterokoky v potravinách jsou *Enterococcus faecalis*, *E. faecium*, *E. durans* a *E. casseliflavus* a vyskytují se také v mléce. Mnoho z těchto druhů přežije i pasteraci. Tyto bakterie jsou schopné produkovat tyramin a proto je jejich výskyt v sýru během zrání nežádoucí. Při výrobě sýrů a zrání se doporučuje přísné dodržování hygienických podmínek, aby se snížil jejich počet [51]. Během výroby sýrů, tak mohlo dojít k významnému nárůstu bakterií mléčného kvašení, jako jsou *Enterococcus* spp., *Enterococcus faecalis*. Vysoký obsah mohl být i způsobený při mikrobiologické analýze z důvodu sekundární kontaminace.

Co se týče *Enterococcus* spp., i přes omezené použití těchto mikroorganismů, jako indikátorů fekální kontaminace, jejich vysoký počet v potravinách naznačuje nedostatečné hygienické postupy nebo vystavení potravin podmínkám, které umožňovaly množení nežádoucích mikroorganismů. Přítomnost *Enterococcus faecalis* a *Enterococcus faecium* v analyzovaných vzorcích sýrů je varováním před podmínkami nedostatečné hygieny při výrobě těchto výrobků [55]. Vysoký obsah enterokoků, který byl v sýru nalezen, tak mohl zapříčinit vyšší produkci biogenních aminů. Toto je potvrzeno i ve studii Gardini a kol (2001) [57], který tvrdí, že *Enterococcus faecalis* se značnou aktivitou dekarboxylázy a pocházející z mléka může způsobit vyšší obsah biogenních aminů jako jsou fenylethylaminu a tyraminu ve výrobcích [57].

Ze základní chemické analýzy bylo zjištěno, že pH se pohybovalo v rozmezí 5,00 až 5,85. Ve srovnání s 1. dnem zrání byly zaznamenány nižší hodnoty pH u šarží s degradéry. U těchto modelových šarží bylo pozorováno kolísání hodnot pH bez zřejmého trendu. V případě kontrolní šarže byl pozorován mírně rostoucí trend v průběhu zrání do 56. dne. Zvyšování pH mohlo být způsobeno proteolýzou, při které se mohou tvořit zásadité látky [49]. Nicméně při zvýšeném počtu bakterií rodu *Lactobacillus* může docházet naopak ke snížení pH, protože tyto mikroorganismy mohou způsobovat lipolýzu pomocí intracelulárních lipáz [49]. Pereira a kol. (2010) [54] potvrdili tvrzení, které již před nimi zjistil Drinan a kol. (1976), že *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* dokáže přeměnit laktózu přímo na kyselinu mléčnou, čímž se také zvyšuje produkce kyseliny mléčné a rychleji se snižuje pH, než u fermentace zprostředkované některými laktobacily. Použité laktobacily jsou zase schopny díky heterofermentaci produkovat kyselinu octovou [54]. Aktivita přidaných laktobacilů, tak pravděpodobně měla vliv na nejednoznačný vývoj pH v případě modelových šarží sýrů s degradéry BA.

Obsah sušiny se u analyzovaných vzorků v průběhu zrání významně nezměnil a rozdíly v obsahu sušiny, mezi vzorky byly minimální. V průběhu zrání byla odchylka maximálně do 3 %. Pro aktivitu sledovaných mikroorganismů, byly tak počáteční podmínky srovnatelné. Mírné zvyšování obsahu sušiny v průběhu zrání u některých šarží, mohla způsobit použitá kryovaková fólie, ve které byly sýry zabaleny po celou dobu zrání. Odpar vody, který způsobil nárůst sušiny, mohl být způsoben polopropustností této fólie. I Fox a kol. popisují, že během prvních pár dnů se sušina zvýšila kvůli odpařování vody a v průběhu zrání nebyly změny tak velké [49].

Obsah tuku, se stejně jako u obsahu sušiny v analyzovaných vzorcích v průběhu zrání výrazně neměnil a dosahoval hodnot 46,5 až 51,5 %. Mírné odchylky v obsahu tuku v sušině mezi vzorky mohly být způsobeny při zpracovávání sýřeniny, kde se mohla část tuku odplavit spolu se syrovátkou. Snižování obsahu tuku v sušině, může zapříčinit vyšší tvrdost sýrů [48].

Obsah soli se u všech šarží nepatrně zvyšoval. V analyzovaných vzorcích sýrů byl obsah soli v rozpětí 1,43 až 1,52 %, což je pro aktivitu mikroorganismů zanedbatelné množství a tak byly ve všech šaržích nastaveny rovnocenné podmínky. Ke změně soli v sýrech může docházet po vysolení sýrů ve vodní lázni, kdy se na jejich povrchu, začne tvořit tzv. solný prsteneček, a kde se také nachází nejvyšší obsah soli. Pod tímto prstencem se koncentrace soli snižuje směrem dovnitř sýru [47]. Sůl se během zrání prostřednictvím difuze vyrovnává a u typu holandského sýru to trvá přibližně 4 týdny [47].

Ze zjištěných výsledků obsahu sušiny, tuku v sušině a soli je možné konstatovat, že nastavené podmínky prostřednictvím výroby modelových šarží sýrů byly srovnatelné mezi jednotlivými vzorky, což je podstatné pro porovnání účinku aktivity sledovaných kmenů.

Tvrdost sýra se zvyšovala během zrání u všech šarží sýrů, kromě šarže sýru *Lbc. casei* D2, kde se tvrdost sýru snižovala do 28. dne zrání a poté se zase zvýšila na podobné hodnoty jako ve 14. dnu zrání. Nejvyšší tvrdosti poslední 84. den zrání měla šarže s producentem BA a nejnižší ji měly šarže s degradéry BA *Lbc. casei* D2 a *Lbc. plantarum* D1. Se snižujícím se obsahem tuku tvrdost sýrů roste a je to zřejmě kvůli menšímu zastoupení tukových kuliček v proteinové matici, což je popsáno i v literatuře [45, 46]. Proteolýza kaseinové matrice, způsobuje klesající tvrdost sýru [44]. Klesající tvrdost byla popsána také autory Guinee a kol. (2000) [56], kde na texturní vlastnosti má významný dopad proteolýza, která způsobí oslabení proteinové matrice.

Při snaze snížit obsah biogenních aminů, je možné použít různé možnosti, které by mohly zajistit nižší obsah v potravinách, které jsou fermentované, nebo které obsahují bílkoviny. Mezi tyto možnosti jak zajistit snížení obsahu BA patří správný výběr startovací kultury, které neprodukují BA, nebo je jsou dokonce schopny degradovat, zvolení správné doby a teploty skladování, použití vysokého hydrostatického tlaku, použití sacharidů a vliv pH, použití soli, použití ozařování, použití modifikované atmosféry a vliv kyslíku, použití aditiv a další možnosti [27, 28, 33, 35, 38]. Za vznik biogenních aminů mohou hlavně přítomné mikroorganismy s dekarboxylázovou aktivitou. Jejich růst a významná aktivita jsou zajištěny

dobrymi podmínkami (fyzikálněchemické faktory, dostupnost substrátu a teplota) a dále koncentrací volných aminokyseliny, které jsou dekarboxylací přeměněny na příslušné BA [1, 2].

Snižování obsahu BA v potravinách je potřebné, protože vyšší obsahy v organismu mohou u člověka způsobit zdravotní rizika a v krajních případech mohou působit až toxicky a způsobit smrt. V nízkých množstvích jsou však pro člověka nepostradatelné a v organismu mohou být metabolizovány a ovlivňují např. regulaci krevního tlaku, tělesné teploty a jsou také prekurzory pro některé nukleové kyseliny nebo hormony [1, 3, 13].

V této diplomové práci bylo snahou posoudit možnost snížení obsahu biogenních aminů v sýrech, při použití různých startovacích kultur. Při výrobě všech modelových šarží sýrů byla použita kultura s producentem biogenních aminů. Dále byly do jednotlivých modelových šarží odděleně použity kultury s potencionální degradační aktivitou. Obsah biogenních aminů byl stanoven pouze do 56. dne zrání, kvůli omezenému přístupu na univerzitní půdu. Toto opatření bylo nařízeno kvůli omezení šíření nákazy Covid-19.

Z analýzy biogenních aminů byly v sýrech detekovány biogenní aminy fenylethylamin, putrescin, kadaverin spermin a tyramin. Biogenní aminy histamin, tryptamin a spermidin nebyly v modelových sýrech detekovány. V literatuře se uvádí, že nejvíce zastoupenými biogenními aminy v sýrech holandského typu je tyramin, tryptamin, fenylethylamin, putrescin a kadaverin, což je v souladu s našimi výsledky [13]. Ze všech biogenních aminů, měl v sýrech kadaverin nejnižší obsah, poté to byl putrescin, spermin, fenylethylamin a nejvyšších obsahů ve všech šaržích dosahoval tyramin. Všechny zmíněné biogenní aminy kromě tyraminu, měly po celou dobu zrání obsah do 100 mg/kg, takže byl jejich obsah relativně přijatelný a neohrožovaly by zdraví člověka. Tyramin měl obsah do 100 mg/kg pouze do 14. dne zrání a poté byly jeho obsahy v sýrech mnohonásobně vyšší a jejich obsah, byl na konci zrácí doby pro člověka nebezpečný. Je však nutné zdůraznit, že vysoké obsahy biogenních aminů byly zapříčiněny záměrně do všech šarží přidaným producentem BA. Následně mohly být z rozdílů obsahů BA mezi jednotlivými šaržemi v průběhu zrání vyvozeny závěry o schopnosti degradace BA použitými degradujícími kmeny v reálných podmínkách.

Jednotlivé šarže sýrů byly srovnávány s kontrolní šarží, která obsahovala producenta BA (*Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 946) bez použití potencionálního degradéra BA. Jednotlivé šarže s použitým potencionálním degradérem obsahovali i producenta, jako kontrolní šarže a tyto šarže měly za úkol snížit obsah biogenních aminů v sýru. U kontrolní



šarže sýru se předvíдалo, že budou biogenní aminy ve vysokém obsahu z důvodu toho, že kmen (*Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 946), který byl u této šarže použit, má pozitivní dekarboxylázovou aktivitu a tudíž je schopen vyprodukovat vysoký obsah biogenních aminů. Tato šarže na konci zrácí doby dosahovala 606,9 mg/kg v celkovém součtu biogenních aminů. V analyzovaných sýrech na konci experimentu, tj. 56. den, měla největší schopnost degradovat biogenní aminy šarže s degradérem *Lbc. plantarum* D2 (*Lactobacillus plantarum* CCDM 185) a ten dokázal snížit obsah biogenních aminů v sýru o 31,4 % oproti kontrolní šarži, kde byl použit pouze producent bez použití potencionálního degradéra BA. Rovněž u šarže s degradérem *Lbc. plantarum* D1 (*Lactobacillus plantarum* CCDM 183) byla pozorována vysoká schopnost degradace v průběhu zrání, 28. den zrání dokázal snížit obsah BA o 27,6 % a 56. den zrání to bylo o 26,3 %. U šarže s degradérem *Lbc. casei* D2 (*Lactobacillus casei* CCDM 802) se snížení obsahu biogenních aminů od začátku zrání podařilo 56. den o 20,6 %. Nejnižší schopnost snížit obsah biogenních aminů ze všech použitých degradérů byla detekována u *Lbc. casei* D1 (*Lactobacillus casei* CCDM 198), kde se obsah BA od začátku zrání snížil o 18,1 %. Intenzita produkce BA s využitým producentem byla vysoká a z toho důvodu lze konstatovat, že i 18% snížení celkového obsahu BA degradérem *Lbc. casei* D1 se považuje za úspěšné. Komprda (2005) tvrdí, že suma biogenních aminů jako jsou tyramin, kadaverin, putrescin a histamin, by neměly v dané potravíně překročit množství 900 mg/kg [52, 53]. U všech šarží s použitými mikroorganismy s cílem snížit obsah biogenních aminů v sýru, bylo překročeno podle Brinka množství, které je ještě pro konzumenta přijatelné (100 mg/kg) [12]. Vysoké množství BA však bylo předvídatelné, protože byl ve všech šaržích použit i producent biogenních aminů za účelem srovnání intenzity degradace BA použitými kmeny. Vysoké obsahy BA byly očekávány také vzhledem k složení sýra a také podmínkám výroby, protože byly vytvořeny v celku příznivé předpoklady pro jejich vznik tj. přítomnost MO s dekarboxylázovou aktivitou, vhodné pH, teplota, přítomnost volných aminokyselin, apod. K narůstajícímu množství také přispívá prodlužující se doba zrání [59].

Bonczar a kol. [56] posoudili od různých autorů výskyt různých biogenních aminů v sýrech. V této literatuře je uvedeno, že obsah tyraminu v holandských sýrech bývá v rozmezí 0,1 – 670 mg/kg, putrescinu 7 – 20 mg/kg, kadaverinu 17 – 48 mg/kg, fenylethylaminu pod 0,1 mg/kg a obsah sperminu v těchto sýrech nebyl uveden [56]. Z našich výsledků je obsah putrescinu a tyraminu s literaturou obdobný.

Z poklesu laktobacilů, které jsou zobrazeny na Obrázku 8. v průběhu zrání (kromě kontrolní šarže) lze usoudit, že došlo v průběhu zrání také k poklesu BA degradujících kmenů (tj. všichni zástupci rodu *Lactobacillus*), což se následně také projevilo na poklesu intenzity degradace BA na konci skladovacího experimentu.

Z obsahu fenylethylaminu bylo zjištěno, že nejvyšší míra degradace tohoto biogenního aminu byla zjištěna po celou dobu zrání u šarže s degradérem *Lbc. plantarum* D2, který dokázal snížit obsah BA o 84 % 56. den zrání oproti kontrolní šarži, ve které byl použit pouze producent (bez použití degradéra BA). Degradér *Lbc. casei* D2 měl nejvyšší schopnost degradace 56. den zrání a dokázal snížit obsah fenylethylaminu o 24 %. Degradace byla pozorována také u šarže s degradérem *Lbc. casei* D1, který snížil obsah fenylethylaminu o 17,6 % v 56. den zrání, ale vyšší intenzitu degradace vykazoval 28. den zrání oproti *Lbc. casei* D2. U šarže s degradérem *Lbc. casei* D2 byl fenylethylamin snížen o 9 % 56. den zrání. U kontrolní šarže byl 56. den zrání naměřen obsah fenylethylaminu 99 mg/kg.

Obsah putrescinu v modelovém sýru, dokázal nejvíce snížit použitý degradér *Lbc. casei* D2, který 28. den zrání snížil obsah o 71,2 %. V 56. dni zrání došlo k mírnému snížení degradační aktivity na téměř 62 % oproti kontrole, ve které byl použit pouze producent bez použití degradéra BA. Dále prokázal vysokou míru degradace také degradér *Lbc. casei* D1, který snížil obsah putrescinu 56. den zrání o 46 %. Podobnou míru degradace měla také šarže s degradérem *Lbc. plantarum* D1, který dokázal snížit putrescin 56. den zrání o 43,9 %, ale nejvyšší míru degradace prokázal 14. den zrání, kde bylo snížení obsahu putrescinu o 74,6 %. Nejnižší míru degradace putrescinu prokázal degradér *Lbc. plantarum* D2, který ho dokázal snížit o 3,9 % 56. den zrání. Kontrolní šarže obsahovala v 56. dnu 45,6 mg/kg putrescinu. Putrescin, který je v potravinách produkován, má souvislost s činností kontaminujících mikroorganismů (většinou G-) [59].

Při zjišťování obsahu kadaverinu v modelových sýrech se zjistilo, že největší schopnost degradovat tento biogenní amin má degradér *Lbc. plantarum* D1, který dokázala snížit obsah kadaverinu v modelovém sýru 56. den o 69,5 % oproti kontrolní šarži. Dále to byla šarže s degradérem *Lbc. casei* D2, který dokázal snížit obsah kadaverinu v sýru 56. den o 59,5 %. U šarže s degradérem *Lbc. plantarum* D2, byla pozorována nejvyšší schopnost degradace kadaverinu 56. den zrání a obsah byl nižší o 47,3 % oproti kontrolní šarži. Nejnižší míru degradace kadaverinu na konci zrání prokázal degradér *Lbc. casei* D1, kde byl obsah snížen o 19,1 %. Kontrolní šarže obsahovala na konci zrácí doby 13,1 mg/kg kadaverinu.

Obsah sperminu byl po 56. dnech zrání nejvíce degradován v šarži s degradérem *Lbc. plantarum* D1, kde se obsah sperminu snížil o 67 %. O něco málo nižší degradaci sperminu prokázal degradér *Lbc. casei* D2, který ho dokázal snížit 56. den zrání o 65,7 %. Dále byl podobný výsledek degradace u šarže s degradérem *Lbc. casei* D1, který ho nejlépe dokázal degradovat 28. den, kdy byl obsah v sýru snížen o 65,8 % a 56. den to bylo o 63,3 %. O 2,1 % snížil spermin v sýru 56. den degradér *Lbc. plantarum* D2, což je oproti ostatním šaržím výrazně nižší množství, ale i v tomto případě byla prokázána schopnost degradace. Kontrolní šarže, u které byl použit pouze producent bez použití degradérem BA byl obsah sperminu 56. den zrání 65,4 mg/kg.

Tyramin byl nejvíce zastoupeným biogenním aminem v modelových sýrech ze všech detekovaných BA a dosahoval nejvyšších naměřených hodnot u všech šarží sýrů. Nejvíce tento biogenní amin dokázala degradovat šarže s degradérem *Lbc. plantarum* D2, která tyramin v sýru dokázala snížit 56. den o 25,6 % oproti kontrolní šarži, kde byl použit pouze producent bez použití degradéra BA. Dále to byla šarže s degradérem *Lbc. plantarum* D1, která snížila obsah tyraminu v sýru 56. den o 20,3 %, ale vyšší schopnost degradace oproti *Lbc. plantarum* D2 prokázala 28. den zrání. Šarže s degradéry *Lbc. plantarum* D1 a D2 od 28. dne zrání vykazovaly vyšší schopnost degradace než šarže s degradéry *Lbc. casei* D1 a D2 (schopnost degradace tyraminu 56. den pod 10 %). Kontrolní šarže obsahovala 56. den zrání nejvyšší obsah tyraminu ze všech šarží a to konkrétně 383,8 mg/kg, což bylo u této šarže předvídatelné, jelikož neobsahuje potencionálního degradéra BA.

V šaržích modelových sýrů byly jako potencionální degradéři použity kultury s *Lbc. casei* a *Lbc. plantarum*. Tyto šarže prokázaly schopnost degradace biogenních aminů v modelových sýrech. I v ostatních studiích se prokázalo, že některé *Lbc. casei* a *Lbc. plantarum* jsou schopny degradace BA v sýrech [35]. Mikroorganismy použité jako potencionální degradéři biogenních aminů vykazovaly nižší obsah biogenních aminů a dokázaly je v modelových sýrech degradovat, oproti kontrolní šarži, která degradéra biogenních aminů neobsahovala a tudíž byl obsah biogenních aminů u této šarže nejvyšší. Dalším výzkumem redukce obsahů biogenních aminů, tak může být sníženo i ohrožení zdraví konzumenta. Při dalším zkoumání je předpoklad, že když budou použity ty nejlepší kmeny u standartních výrobků (bez producenta BA) budou obsahy BA výrazně nižší v porovnání se sýry, kde nebude použita protektivní kultura.

## ZÁVĚR

Diplomová práce, byla zaměřena na možnosti snížení obsahu biogenních aminů v přírodním sýru typu Gouda v průběhu zrání. V teoretické části byly charakterizovány biogenní aminy, jejich vliv na člověka a možnost jejich snížení.

Praktická část diplomové práce byla zaměřena na výrobu modelových vzorků sýrů s použitím rozdílných mikroorganismů, které byly schopny jak produkce, tak i degradace biogenních aminů. Během tříměsíční doby zrání byly odebírány vzorky a byly prováděny jednotlivé analýzy: mikrobiologický rozbor, základní chemická analýza (stanovení pH, obsah sušiny, obsah tuku v sušině, obsah soli), analýza texturních vlastností a stanovení biogenních aminů.

Z experimentu byly zjištěny následující poznatky:

- celkový obsah mikroorganismů a enterokoků v době zrání klesal
- obsah laktobacilů a laktokoků se zvyšoval přibližně do poloviny zrací doby a poté se obsah těchto mikroorganismů snižoval
- hodnoty pH byly rozdílné na základě použitých mikroorganismů v daných šaržích
- obsah tuku se v době zrání téměř u všech šarží sýrů snižoval, ale rozdíly nebyly významné a byla nepatrně ovlivněna pouze tvrdost sýru
- růst obsahu sušiny byl zaznamenán pouze u kontrolní šarže, u ostatních šarží byl zaznamenán kolísající obsah sušiny, ale bez významných rozdílů v celé době zrání
- obsah soli se v průběhu zrání ve všech šaržích významně nelišil
- tvrdost sýrů se zvyšovala, kromě šarže s degradérem *Lbc. casei* D2, kde se tvrdost snižovala a od poloviny skladovacího experimentu se začala také zvyšovat
- ze všech biogenních aminů dosahoval nejvyššího obsahu tyramin a nejnižší koncentrace kadaverin
- celkový obsah biogenních aminů se u všech šarží v době zrání zvyšoval a všechny šarže překročily doporučené množství již první den zrání z důvodu přítomnosti záměrně inokulovaného producenta biogenních aminů
- nejvyšší míra degradace z pohledu celkového obsahu biogenních aminů byla pozorována v šarži s degradérem *Lbc. plantarum* D2 56. den a to konkrétně o 31,4 % a také v šarži s degradérem *Lbc. plantarum* D1, který 28. den zrání snížil celkový obsah BA o 27,6 % a 56. den zrání o 26,3 %

- v šarži s *Lbc. plantarum* D2 byla pozorována také vysoká míra degradace fenylethylaminu (56. den o 84 %) a tyraminu (56. den o 25,6 %) a kadaverinu (28. den o 46,6 %)
- v šarži s degradérem *Lbc. plantarum* D1 byla ze všech šarží pozorována nejvyšší schopnost degradace kadaverinu (56. den o 69,5 %) a sperminu (56. den o 67 %)
- v šarži s degradérem *Lbc. casei* D2 byla v porovnání s ostatními vzorky detekována nejvyšší schopnost degradovat putrescin a to 28. den o 71,2 % a také 56. den 61,8 %
- v šarži sýru, ve které byl použit pouze producent jako simulace rozsáhle kontaminace dekarboxyláza pozitivními mikroorganismy, se obsah biogenních aminů během celé doby zrání zvyšoval mnohonásobně více, než je doporučeno a tyto koncentrace by mohly ohrozit zdraví konzumenta
- v budoucnu v dalších studiích je možné navázat na výsledky z této práce a hledat i další možnost, jak snížit obsah biogenních aminů v přírodních zrajících sýrech např. výběrem kombinace degradujících kmenů

## SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] VELÍŠEK J., HAJŠLOVÁ J. *Chemie potravin II*. OSSIS, Tábor 2009, ISBN 978-80-86659-16-9
- [2] VELÍŠEK, J., CEJPEK, K., DAVÍDEK, D., MÍKOVÁ, K., PÁNEK, J., POKORNÝ, J. *Chemie potravin 3*. 2. vyd. Tábor: OSSIS, 2002. 368 str. ISBN 80-86659-02-3
- [3] KOMPRDA, T. *Obecná hygiena potravin*. Brno, MZLU, 2004, 145 s. ISBN 80-7157-757-7
- [4] DOSTÁL, J., KAPLAN, P. *Lékařská chemie II*. Brno, MU, 2003, 223 s. ISBN 80-210-2731-2
- [5] KAROVIČOVÁ, J., KOHAJDOVÁ, Z. Biogenic amines in food. *Chemical papers*, 2005, vol. 59, no. 1, p. 70–79
- [6] DAVÍDEK, J., JANÍČEK, G., POKORNÝ, J. *Chemie potravin*. 1. Praha: SNTL - Nakladatelství technické literatury ALFA, 1983. ISBN 04-815-83
- [7] LINARES, D. M., DEL RÍO, B., LADERO, V., MARTÍNEZ, N., FERNÁNDEZ, M., MARTÍN, M. a ÁLVAREZ A. M. Factors Influencing Biogenic Amines Accumulation in Dairy Products. *Frontiers in Microbiology*. 2012, 3
- [8] KALACH, P., KRÍŽEK, M. Biogenní aminy a polyaminy v potravinách a jejich vliv na lidské zdraví. *Potravinářská revue*. 2. 2005, s. 40-42. ISSN 1801-9102.
- [9] EFSA Panel on Biological Hazards (*BIOHAZ*). Scientific Opinion on risk based control of biogenic amine formation in fermented foods. [online]. Parma, Italy, 2011;9(10):2393 [cit. 2019-10-26]. Dostupné z: <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.2903/j.efsa.2011.2393>
- [10] Nařízení komise (ES) 2073/2005 o mikrobiologických kritériích pro potraviny.
- [11] Vyhláška č. 305/2004 Sb. (platné znění) ze dne 6. května, kterou se stanoví druhy kontaminujících a toxikologicky významných látek a jejich přípustné množství v potravinách.
- [12] ten BRINK, B., DAMINK, C., JOOSTEN, H. M. L. J., & Huis in't Veld, J. H. J. (1990). Occurrence and formation of biologically active amines in foods. *International Journal of Food Microbiology*, 11, 73–84.
- [13] STRATTON, J., HUTKINS, R. a TAYLOR, S. Biogenic amines in cheese and other fermented foods, A Review, *Journal of Food Protection*. 1990, 460-470. ISSN 19449097

- [14] FERNANDEZ-NO, I. C., BOEHME, K., GALLARDO, J. Differential characterization of biogenic amine-producing bacteria involved in food poisoning using MALDITOF mass fingerprinting. *Electrophoresis*, 2010, 31(6), s. 1116-1127.
- [15] ERIM, F. BEDIA, Recent analytical approaches to the analysis of biogenic amines in food sample. *Trac-trends in analytical chemistry*, 2013, 52(SI), s. 239-247.
- [16] MADEJSKA, A., MICHALSKI, M., OSEK, J. Biogenic amines in rennet ripening cheeses as a health risk to consumers. *MEDYCYNA WETERYNARYJNA-VETERINARY MEDICINE-SCIENCE AND PRACTICE*, 2017, 73(4), s. 214-219. DOI: 10.21521/mw.5681.
- [17] SANLI, T. a SENEL, E. Formation of Biogenic Amines in Cheese. Processing and Impact on Active Components in Food. 2015, 223-230. ISBN 9780124046993.
- [18] STANDAROVÁ, E., BORKOVCOVÁ, I., VORLOVÁ, L.: Obsah biogenních aminů v sýrech z české obchodní sítě. *Veterinářství* č. 58, 2008, 735-739
- [19] RUIZ-CAPILLAS, HERRERO, C. a A., Impact of Biogenic Amines on Food Quality and Safety. *Foods* [online]. 2019, 8(2) [cit. 2020-02-13]. DOI: 10.3390/foods8020062. ISSN 2304-8158. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/2304-8158/8/2/62>
- [20] MALONE, M. H., METCALFE, D., D. Histamine in foods: Its Possible Role in Non-Allergic Adverse Reactions to Ingestants. *NER Allergy Proc*, 1986, Vol. 7, No. 3, p. 241-245
- [21] BURDYCHOVÁ, R.: *Screening of selected starter cultures for the presence of DNA sequences coding for tyrosine decarboxylase*. Acta univ. agric. et silvic. Mendel. Brun., 2006, LIV, No. 5, pp. 7–12
- [22] SILLA-SANTOS M. H.: Biogenic amines: their importance in foods. *Int J Food Microbiol*. 1996, 29: 213–231.
- [23] MAH, Jae-Hyung, Young PARK, Young JIN, Jun-Hee LEE a Han-Joon HWANG. Bacterial Production and Control of Biogenic Amines in Asian Fermented Soybean Foods. *Foods* [online]. 2019, 8(2) [cit. 2020-02-26]. DOI: 10.3390/foods8020085. ISSN 2304-8158. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/2304-8158/8/2/85>
- [24] HEERTHANA, RAMANATHAN, V., a PREETHA, R. Biosensors: a potential tool for quality assurance and food safety pertaining to biogenic amines/volatile amines formation in aquaculture systems/products. *Reviews in Aquaculture* [online]. 2019, 11(1), 220-233

[cit. 2020-02-26]. DOI: 10.1111/raq.12236. ISSN 17535123. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/raq.12236>

[25] DEL RIO, B., REDRUELLO, B., LINARES, D., M., LADERO, V., RUAS-MADIEDO, P., FERNANDEZ, M., MARTIN, C., aA. ALVAREZ, M. The biogenic amines putrescine and cadaverine show in vitro cytotoxicity at concentrations that can be found in foods. *Scientific Reports* [online]. 2019, **9**(1) [cit. 2020-02-27]. DOI: 10.1038/s41598-018-36239-w. ISSN 2045-2322. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/s41598-018-36239-w>

[26] AKAN, S., a MUSTAFA Kemal DEMIRAĞ. The factors affecting biogenic amines formation in the foods and transformation of biogenic amines to other compounds. *Pamukkale University Journal of Engineering Sciences* [online]. 2018, **24**(7), 1388-1392 [cit. 2020-03-03]. DOI: 10.5505/pajes.2017.90022. ISSN 1300-7009. Dostupné z: <http://pajes.pau.edu.tr/eng/jvi.asp?pdire=pajes&plng=eng&un=PAJES-90022>

[27] GARDINI, F., ÖZOGUL, Y.,SUZZI, G., TABANELLI, G. a ÖZOGUL, F. Technological Factors Affecting Biogenic Amine Content in Foods: A Review. *Frontiers in Microbiology* [online]. 2016, **7** [cit. 2020-03-04]. DOI: 10.3389/fmicb.2016.01218. ISSN 1664-302X. Dostupné z: <http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fmicb.2016.01218/abstract>

[28] NAILA, A.,FLINT, S., FLETCHER, G., BREMER, P. a MEERDINK, G. Control of Biogenic Amines in Food-Existing and Emerging Approaches. *Journal of Food Science* [online]. 2010, **75**(7), R139-R150 [cit. 2020-03-10]. DOI: 10.1111/j.1750-3841.2010.01774.x. ISSN 00221147. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1750-3841.2010.01774.x>

[29] ÖZOGUL, F., KACAR, C. a HAMED, I. Inhibition effects of carvacrol on biogenic amines formation by common food-borne pathogens in histidine decarboxylase broth. *LWT - Food Science and Technology* [online]. 2015, **64**(1), 50-55 [cit. 2020-03-16]. DOI: 10.1016/j.lwt.2015.05.027. ISSN 00236438. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S002364381500376X>

[30] KOMPRDA, T. Effect of starter culture, spice mix and storage time and temperature on biogenic amine content of dry fermented sausages. *Meat Science* [online]. 2004, **67**(4), 607-616 [cit. 2020-03-16]. DOI: 10.1016/j.meatsci.2004.01.003. ISSN 03091740. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0309174004000178>



- [31] BOZKURT, H. Utilization of natural antioxidants: Green tea extract and Thymbra spicata oil in Turkish dry-fermented sausage. *Meat Science* [online]. 2006, **73**(3), 442-450 [cit. 2020-03-16]. DOI: 10.1016/j.meatsci.2006.01.005. ISSN 03091740. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0309174006000271>
- [32] LATORRE-MORATALLA, M. L., S. BOVER-CID, T. AYMERICH, B. MARCOS, M.C. VIDAL-CAROU a M. GARRIGA. Aminogenesis control in fermented sausages manufactured with pressurized meat batter and starter culture. *Meat Science* [online]. 2007, **75**(3), 460-469 [cit. 2020-03-16]. DOI: 10.1016/j.meatsci.2006.07.020. ISSN 03091740. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0309174006002907>
- [33] BENKERROUM, N. Biogenic Amines in Dairy Products: Origin, Incidence, and Control Means. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* [online]. 2016, **15**(4), 801-826 [cit. 2020-03-19]. DOI: 10.1111/1541-4337.12212. ISSN 15414337. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/1541-4337.12212>
- [34] LINARES, D. M., GÓMEZ, C., RENES, E., M. FRESNO, J., E. TORNADIJO, M., R. P. ROSS a STANTON, C. Lactic Acid Bacteria and Bifidobacteria with Potential to Design Natural Biofunctional Health-Promoting Dairy Foods. *Frontiers in Microbiology* [online]. 2017, **8** [cit. 2020-03-19]. DOI: 10.3389/fmicb.2017.00846. ISSN 1664-302X. Dostupné z: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2017.00846/full>
- [35] GUARCELLO, R., Maria DE ANGELIS, SETTANNI, L. et al. Selection of Amine-Oxidizing Dairy Lactic Acid Bacteria and Identification of the Enzyme and Gene Involved in the Decrease of Biogenic Amines. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. 2016, **82**(23), 6870-6880 [cit. 2020-03-19]. DOI: 10.1128/AEM.01051-16. ISSN 0099-2240. Dostupné z: <http://aem.asm.org/lookup/doi/10.1128/AEM.01051-16>
- [36] ZHANG, Kai a Ye NI. Tyrosine decarboxylase from *Lactobacillus brevis*: Soluble expression and characterization. *Protein Expression and Purification* [online]. 2014, **94**, 33-39 [cit. 2020-03-27]. DOI: 10.1016/j.pep.2013.10.018. ISSN 10465928. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1046592813002222>
- [37] JOOSTEN, H. M. L. J. 1988. conditions allowing the formation of biogenic amines in cheese. 3. Factors influencing the amounts formed. *Neth. Milk Dairy J.* 41:329-357.
- [38] BUŇKOVÁ, L., BUŇKA, F., DRÁB, V., KRÁČMAR, S. a KUBÁŇ, V. Effects of NaCl, lactose and availability of oxygen on tyramine production by the *Enterococcus durans*

CCDM 53. *European Food Research and Technology* [online]. 2012, **234**(6), 973-979 [cit. 2020-03-27]. DOI: 10.1007/s00217-012-1714-y. ISSN 1438-2377. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00217-012-1714-y>

[39] Majjala RA, "Research note: Histamine and tyramine production by lactobacillus strain subjected to external pH decrease". *Journal of Food Protection*, 57(3), 259-262, 1994.

[40] LANCIOTTI, R., PATRIGNANI, F., IUCCI, L., GUERZONI, M. E., SUZZI, G., BELLETTI, N. a GARDINI, F. Effects of milk high pressure homogenization on biogenic amine accumulation during ripening of ovine and bovine Italian cheeses. *Food Chemistry* [online]. 2007, **104**(2), 693-701 [cit. 2020-03-27]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2006.12.017. ISSN 03088146. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814606009915>

[41] MAH, Jae-Hyung, Young Jun KIM a Han-Joon HWANG. Inhibitory effects of garlic and other spices on biogenic amine production in Myeolchi-jeot, Korean salted and fermented anchovy product. *Food Control* [online]. 2009, **20**(5), 449-454 [cit. 2020-03-27]. DOI: 10.1016/j.foodcont.2008.07.006. ISSN 09567135. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0956713508001783>

[42] LAPA-GUIMARÃES, J., TRATTNER, S. a PICKOVA, J. Effect of processing on amine formation and the lipid profile of cod (*Gadus morhua*) roe. *Food Chemistry* [online]. 2011, **129**(3), 716-723 [cit. 2020-03-27]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2011.05.010. ISSN 03088146. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814611006996>

[43] GENÇCELEP, H., S. ANDIÇ a Ş. KÖSE. Effects of Potassium Sorbate Application on Shelf Life and Biogenic Amines of Pearl Mullet (*Chalcalburnus tarichi* Pallas, 1811) Fillets Packaged With Vacuum. *Journal of Aquatic Food Product Technology* [online]. 2014, **23**(4), 347-357 [cit. 2020-03-27]. DOI: 10.1080/10498850.2012.719588. ISSN 1049-8850. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10498850.2012.719588>

[44] DEL NOBILE, M. A., CHILLO, S., FALCONE, P. M., LAVERSE, J., PATI, S., BAIANO, A. 2007. Textural changes of Canestrello Pugliese cheese measured during storage. In *Journal of Food Engineering*, roč. 83, 2007, s. 621-628. ISSN 0260-8774

[45] BERTOLA, N. C., CALIFANO, A. N., BEVILACQUA, A. E., ZARITZKY, N. E. 2000. Effect of ripening conditions on the texture of Gouda cheese. In *International Journal of Food Science and Technology*, roč. 35, 2000, s. 207-214. ISSN 1365-2621

- [46] FENELON, M. A., GUINEE, T. P. Primary proteolysis and textural changes during ripening in Cheddar cheese manufactured to different fat content. *International Dairy Journal*, 2000, 10(3), s. 151 – 158.
- [47] GUINEE, P. a FOX, P. Salt in Cheese: Physical, Chemical and Biological Aspects. Cheese. 2017, 317-375. ISBN 9780124170124.
- [48] ONG, L., DEGASTINE, R., AUTY, M. E., KENTISH, S., GRAS, S. Coagulation temperature affects the microstructure and composition of full fat Cheddar cheese. *Dairy Science and Technology*, 2011, 91, s. 739 – 758.
- [49] FOX, P., McSWEENEY, P., COGAN, T. a GUINEE, T. Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology, Third edition - Volume 1: General Aspects. Amsterdam: London Elsevier, 2004a. 617s. ISBN 0-1226-365
- [50] KOMPRDA T., NOVICKÁ K., KALHOTKA L., SMĚLÁ D. (2005): Biogenic amine content in sterilised and pasteurised long-term stored processed cheese. *Czech J. Food Sci.*, 23: 209–216
- [51] BURDYCHOVA, R. a KOMPRDA, T. Biogenic amine-forming microbial communities in cheese. *FEMS Microbiology Letters* [online]. 2007, **276**(2), 149-155 [cit. 2020-04-07]. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2007.00922.x. ISSN 03781097. Dostupné z: <https://academic.oup.com/femsle/article-lookup/doi/10.1111/j.1574-6968.2007.00922.x>
- [52] KOMPRDA, T. Biogenní aminy a polyaminy ve fermentovaných potravinách živočišného původu. *Veterinářství*, 2005, vol. 55, no. 10, p. 646–650. ISSN 0506-8231.
- [53] ČERNÝ V., KVASNIČKOVÁ E., HAVLÍKOVÁ Š., KALHOTKA L., 2009: Výskyt mikroorganismů s dekarboxylázovou aktivitou v sýrech, *Mlékařské listy* 16, 16 -18 s
- [54] PEREIRA, C.I., D.M. NETO, J.C. CAPUCHO, M.S. GIÃO, A.M.P. GOMES a F.X. MALCATA. How three adventitious lactic acid bacteria affect proteolysis and organic acid production in model Portuguese cheeses manufactured from several milk sources and two alternative coagulants. *Journal of Dairy Science* [online]. 2010, **93**(4), 1335-1344 [cit. 2020-04-08]. DOI: 10.3168/jds.2009-2294. ISSN 00220302. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022030210001062>
- [55] LIMA, C.D.L.C., L.A. LIMA, M.M.O.P. CERQUEIRA, E.G. FERREIRA a C.A. ROSA. Bactérias do ácido láctico e leveduras associadas com o queijo-de-minas artesanal produzido na região da Serra do Salitre, Minas Gerais. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* [online]. 2009, **61**(1), 266-272 [cit. 2020-04-08]. DOI:

10.1590/S0102-09352009000100037. ISSN 0102-0935. Dostupné z: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0102-09352009000100037&lng=pt&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-09352009000100037&lng=pt&tlng=pt)

[56] BONCZAR, G., FILIPCZAK-FIUTAK, M., PLUTA-KUBICA, A. a DUDA, I. Biogenic amines present in cheese – occurrence and threats. *Medycyna Weterynaryjna* [online]. 2017, **73**(3), 136-143 [cit. 2020-04-14]. DOI: 10.21521/mw.5657. ISSN 0025-8628. Dostupné z: <http://www.medycynawet.edu.pl/index.php/archives/396/5657-summary-medweter-73-3-136-143-2017>

[57] GARDINI, F., MARTUSCELLI, M., CARUSO, M. C., GALGANO, F., CRUDELE, M. A., FAVATI, F., GUERZONI, M. E. a SUZZI, G. 2001. Effects of pH, temperature and NaCl concentration on the growth kinetics, proteolytic activity and biogenic amine production of *Enterococcus faecalis*. *International Journal of Food Microbiology*. 64(1-2), 105-117. DOI: 10.1016/S0168-1605(00)00445-1. ISSN 01681605.

[58] FOX, P. F. *Cheese: chemistry, physics, and microbiology*. 3rd ed. London: Elsevier, 2004. ISBN 0122636538.

[59] BUŇKOVÁ, L., BUDINSKÝ, P., ADAMCOVÁ, G., PLEVA, P., BUŇKA, F. Monitoring výskytu biogenních aminů ve fermentovaných mléčných výrobcích v ČR. *Mlékařské listy*, 2012, č. 134, s. 1 – 3

**SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK**

BA	Biogenní aminy
MO	Mikroorganismus
MAO	Monoaminoxidáza
DAO	Diaminoxidáza
BMK	Bakterie mléčného kvašení
KTJ	Kolonie tvořících jednotek
CPM	Celkový počet mikroorganismů

**SEZNAM OBRÁZKŮ**

Obrázek 1. Struktury některých biogenních aminů [1] .....	12
Obrázek 2. Biosyntéza sperminu a spermidinu [1].....	14
Obrázek 3. Hlavní reakce při vzniku BA [1, 2].....	16
Obrázek 4. Detoxikační a toxikologická rizika biogenních aminů. *: Metabolická inaktivace biogenních aminů oxidační deaminací oxidázami. †: Zneschopnění střevního detoxikačního systému saturací biogenními aminy nebo inhibicí antidepressivy. BA: biogenní aminy [23].....	18
Obrázek 5. Schéma výroby sýrů s použitím daných kmenů mikroorganismů.....	43
Obrázek 6. Závislost celkového počtu mikroorganismů na době zrání v různých šaržích.....	51
Obrázek 7. Závislost mléčných koků na době zrání v různých šaržích.....	52
Obrázek 8. Závislost laktobacilů na době zrání v různých šaržích.....	53
Obrázek 9. Závislost enterokoků na době zrání v různých šaržích.....	55
Obrázek 10. Závislost změny pH v šaržích sýru v průběhu zrání.....	56
Obrázek 11. Závislost změny obsahu sušiny v průběhu zrání sýrů.....	57
Obrázek 12. Závislost změny obsahu tuku v sušině v průběhu zrání na daných šaržích sýrů.....	58
Obrázek 13. Závislost změny obsahu soli na šaržích sýrů v průběhu zrání.....	59
Obrázek 14. Závislost změny celkového obsahu biogenních aminů v průběhu zrání sýrů.....	60
Obrázek 15. Závislost obsahu fenylethylaminu v průběhu zrání v sýrech.....	61
Obrázek 16. Závislost obsahu putrescinu v průběhu zrání sýrů.....	62
Obrázek 17. Závislost obsahu kadaverinu v průběhu zrání sýrů.....	63
Obrázek 18. Závislost obsahu sperminu v průběhu zrání sýrů.....	64
Obrázek 19. Závislost obsahu tyraminu v průběhu zrání sýrů.....	65
Obrázek 20. Závislost změny tvrdosti v sýrech v průběhu zrání .....	66

**SEZNAM TABULEK**

Tabulka 1. Významné mikroorganismy produkující biogenní aminy [1].....	19
Tabulka 2. Výskyt biogenních aminů v různých typech sýrů [13].....	23

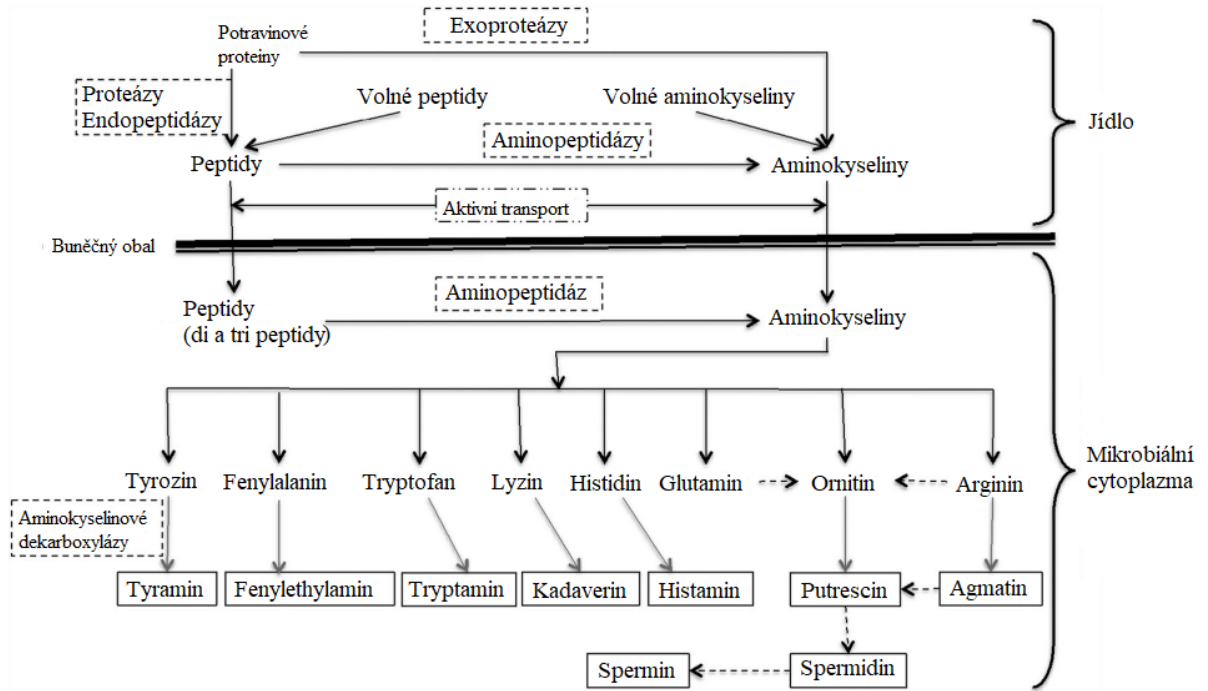
## SEZNAM PŘÍLOH

Příloha P I: Obecné schéma tvorba biogenních aminů v potravinách v důsledku mikrobiální metabolické aktivity

Příloha P II: Obecné schéma výroby sýrů s nízkodohřívanou sýřeninou



# PŘÍLOHA P I: OBECNÉ SCHÉMA TVORBY BIOGENNÍCH AMINŮ V POTRAVINÁCH V DŮSLEDKU MIKROBIÁLNÍ METABOLICKÉ AKTIVITY



## PŘÍLOHA P 2: OBECNÉ SCHÉMA VÝROBY SÝRŮ S NÍZKODOHŘÍVANOU SÝŘENINOU

