

Dekarboxylázová aktivita mikroorganismů izolovaných v mlékárenských provozech

Anna Hůdová

Bakalářská práce
2013



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav technologie potravin
akademický rok: 2012/2013

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Anna HŮŽOVÁ**
Osobní číslo: **T10053**
Studijní program: **B2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Chemie a technologie potravin**
Forma studia: **prezenční**

Téma práce: **Dekarboxylázová aktivita mikroorganismů
izolovaných v mlékárenských provozech**

Zásady pro vypracování:

I. Teoretická část

1. Charakteristika mikroorganismů vyskytujících se v mlékárenských provozech.
2. Produkce biogenních aminů mikroorganismy.

II. Praktická část

1. Chromatografické stanovení biogenních aminů a mikroorganismů izolovaných z mlékárenského provozů.
2. Vyhodnocení získaných výsledků.
3. Diskuze výsledků a formulace závěrů.

Rozsah bakalářské práce:

Rozsah příloh:

Forma zpracování bakalářské práce: tištěná/elektronická

Seznam odborné literatury:

[1] LINARES. D. M.; MARTÍN. M.; LADERO. V.; ALVAREZ. A. M. & FERNANDEZ. M.; Biogenic Amines in Dairy Products, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2011, 51:7, 691-703.

[2] STRNADOVÁ. E.; BORKOVCOVÁ. L.; VORLOVÁ. L.; The occurrence of biogenic amines in dairy products on the Czech market, 2008, 7:4, 35-42.

[3] DEGUCHI, Y. & MORISHITA. T.; Nutritional requirements in multiple auxotrophic lactic acid bacteria: genetic lesions affecting amino acid biosynthetic pathways in *Lactococcus lactis*, *Enterococcus faecium*, and *Pediococcus acidilactici*, 1992, 56, 913-918.

[4] BOLOTIN, A., MAUGER. S., MALARME. K., ERLICH. S. D., SOROKIN. A.; Low-redundancy sequencing of the entire *Lactococcus lactis* IL1403 genome. *Antonie Leeuwenhoek*, 1999, 76, 27-76.

[5] CAVIN, J. F., DARTOIS. V., LABBARE. C. & Divies. C.; Cloning of branched chain amino acid biosynthesis genes and assays of -acetolactate synthase activities in *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris*. *Res. Microbiol.* 1999, 150, 189-198.

Vedoucí bakalářské práce:

Ing. Eva Lorencová

Ústav technologie potravin

Datum zadání bakalářské práce:

16. ledna 2013

Termín odevzdání bakalářské práce:

2. května 2013

Ve Zlíně dne 4. února 2013



doc. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan



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

Příjmení a jméno: HŮDOVA ANNA

Obor: OHP

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

- beru na vědomí, že odevzdáním diplomové/bakalářské práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, bez ohledu na výsledek obhajoby¹⁾;
- beru na vědomí, že diplomová/bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému dostupná k nahlédnutí, že jeden výtisk diplomové/bakalářské práce bude uložen na příslušném ústavu Fakulty technologické UTB ve Zlíně a jeden výtisk bude uložen u vedoucího práce;
- byl/a jsem seznámen/a s tím, že na moji diplomovou/bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3²⁾;
- beru na vědomí, že podle § 60³⁾ odst. 1 autorského zákona má UTB ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- beru na vědomí, že podle § 60³⁾ odst. 2 a 3 mohu užít své dílo – diplomovou/bakalářskou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- beru na vědomí, že pokud bylo k vypracování diplomové/bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tedy pouze k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové/bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- beru na vědomí, že pokud je výstupem diplomové/bakalářské práce jakýkoliv softwarový produkt, považují se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Ve Zlíně13.5.2013

.....
Hůdová Anna

¹⁾ zákon č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, § 47 Zveřejňování závěrečných prací:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ABSTRAKT

Tato práce se týká problematiky výskytu biogenních aminů v mlékárenském provozu, což jsou látky přirozeně se vyskytující v buněčných strukturách rostlin nebo mohou vznikat při skladování a výrobě potravin jako produkt metabolismu mikroorganismů. Teoretická část se zabývá chemickým složením a mikrobiologií mléka z hlediska produkce biogenních aminů. Část práce je vymezena pro základní informace o biogenních aminech o jejich vzniku, toxicitě a biologickém účinku. V experimentální části byla na základě výsledků chromatografického stanovení posouzena dekarboxylázová aktivita mikroorganismů vyskytujících se v sýrech zrajících v solném nálevu, v samotném solném nálevu a mikroorganismů izolovaných ze stěrů z výrobních prostor mlékárenského závodu.

Klíčová slova: biogenní aminy, mlékárenský provoz, chromatografické stanovení, dekarboxylázová aktivita, sýry zrající v solném nálevu

ABSTRACT

This thesis deals with the biogenic amines in dairy industry. Biogenic amines are substances naturally occurring in plant cell or may occur in food production and storage, as a product of the microbial metabolism. A theoretical part is concerned with chemical composition and microbiology of milk in terms of formation of biogenic amines. Part of this work is defined for basic information about biogenic amines on their formation, toxicity and biological effects. In the experimental part was by chromatography determined decarboxylase activity of microorganisms occurring in white cheeses, in the brine and microorganisms obtained from dairy.

Keywords: biogenic amines, dairy, decarboxylase activity, chromatography, white cheese

Ráda bych poděkovala vedoucí mé bakalářské práce doc. RNDr. Leoně Buňkové, Ph. D. za odborný dohled a cenné rady ke zpracování mé práce a Ing. Evě Lorencové za pomoc v laboratořích.

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

OBSAH

ÚVOD.....	10
I TEORETICKÁ ČÁST.....	11
1 VÝSKYT MIKROORGANIZMŮ V MLÉKARENSKÝCH PROVOZECH.....	12
1.1 MLÉKO	12
1.2 CHEMICKÉ SLOŽENÍ MLÉKA.....	12
1.2.1 Bílkoviny.....	13
1.2.2 Enzymy	13
1.2.3 Tuky	14
1.2.4 Sacharidy.....	14
1.2.5 Minerální látky	14
1.2.6 Vitaminy.....	14
1.3 PATOGENNÍ MIKROORGANIZMY OBSAŽENÉ V MLÉCE	14
1.4 TEPelné OŠETŘENÍ MLÉKA A INAKTIVACE MIKROORGANIZMŮ	15
1.4.1 Pasterace.....	15
1.4.2 UHT sterilace	16
1.5 BAKTERIE MLÉČNÉHO KVAŠENÍ.....	16
1.5.1 Rozdělení bakterií mléčného kvašení.....	17
2 BIOGENNÍ AMINY.....	19
2.1 AMINY.....	19
2.1.1 Charakteristika aminů	19
2.1.2 Fyzikální vlastnosti aminů	19
2.1.3 Fyziologické vlastnosti aminů, přírodní aminy.....	20
2.2 AMINOKYSELINY	20
2.2.1 Vznik aminů a dalších sloučenin z aminokyselin	21
2.3 BIOGENNÍ AMINY	22
2.3.1 Toxicita biogenních aminů.....	23
2.3.2 Biologické účinky	24
2.3.3 Dekarboxylázová aktivita a vznik biogenních aminů	24
2.3.4 Mikroorganismy produkující biogenní aminy	27
3 SÝRY ZRAJÍCÍ V SOLNÉM NÁLEVU.....	28
3.1 CHARAKTERISTIKA A ROZDĚLENÍ SÝRŮ.....	28
3.2 SÝRY ZRAJÍCÍ V SOLNÉM NÁLEVU	29
3.2.1 Technologie výroby sýru Feta.....	29
II PRAKTICKÁ ČÁST	31
4 CÍLE PRÁCE	32
5 MATERIÁL A METODY STANOVENÍ	33
5.1 PŘÍPRAVA VZORKŮ K ANALÝZE.....	33
5.2 POUŽITÉ PŘÍSTROJE, CHEMIKÁLIE, SLOŽENÍ A PŘÍPRAVA POUŽITÝCH ŽIVNÝCH MÉDIÍ.....	37
5.2.1 Přístroje	37
5.2.2 Chemikálie	37
5.2.3 Živná média.....	38

5.3	POSTUP DERIVATIZACE.....	39
5.4	VYSOKOÚČINNÁ KAPALINOVÁ CHROMATOGRFIE HPLC.....	39
6	VÝSLEDKY A DISKUZE.....	41
6.1.1	Produkce biogenních aminů u mikroorganismů izolovaných ze stěrů z výrobních prostor	41
6.1.2	Produkce biogenních aminů mikroorganizmy izolovanými ze sýrů Akawi	43
6.1.3	Produkce biogenních aminů mikroorganizmy izolovanými ze solných nálevů.....	44
6.1.4	Souhrnná diskuze	46
	ZÁVĚR	49
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	50
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....	56
	SEZNAM OBRÁZKŮ	57
	SEZNAM TABULEK.....	58

ÚVOD

Cílem práce bylo posoudit dekarboxylázovou aktivitu mikroorganismů, které byly izolovány v mlékárenském provozu. Dekarboxylázová aktivita byla stanovena na základě produkce biogenních aminů, jejichž výskyt v potravinách je neustále aktuálním tématem.

Biogenní aminy jsou základní dusíkaté sloučeniny s nízkou molekulovou hmotností, které jsou v potravinách a nápojích tvořeny převážně mikrobiální dekarboxylací aminokyselin pomocí příslušných enzymů. Mezi nejčastější producenty biogenních aminů patří druhy mikroorganismů rodu *Pseudomonas*, *Photobacterium*, dále rody čeledi *Enterobacteriaceae*, a to *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Escherichia*, *Proteus*, *Salmonella* a *Shigella* a čeleď *Micrococcaceae*, a to *Staphylococcus*, *Micrococcus* a *Kocuria*. Mezi významné producenty biogenních aminů se řadí mnoho bakterií mléčného kvašení. Často se vykytují v mléčných výrobcích, první kapitola tedy pojednává o chemickém složení a mikrobiologické čistotě mléka.

Vysoké hodnoty biogenních aminů v potravinách mohou mít nežádoucí účinky na lidské zdraví, které jsou mnohdy spojené s otravami. Proto další část práce se zaměřuje na vznik a výskyt biogenních aminů, jejich toxicitu a biologické účinky. Praktická část se zabývala dekarboxylázovou aktivitou mikroorganismů, kdy byla vyhodnocena dekarboxylázová aktivita u 108 mikroorganismů, které byly izolovány ze sýrů zrajících v solném nálevu, ze stěrů výrobních prostor mlékárny a solného nálevu. Biogenní aminy byly detekovány pomocí metody HPLC s UV detektorem. Na základě analýzy bylo zjištěno, že mezi izoláty mikroorganismů převažovaly Gramnegativní bakterie, u nichž je větší pravděpodobnost výskytu biogenních aminů.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 VÝSKYT MIKROORGANIZMŮ V MLÉKARENSKÝCH PROVOZECH

1.1 Mléko

Mléko můžeme popsat jako sekret mléčné žlázy, bílé a nažloutlé barvy, nasládlé chuti a typické vůně [1]. Podle vyhlášky 77/2003 Sb. Oddíl 1 § 1 mléko musí podle předpisů Evropských společenství splňovat požadavky ošetřené zvláštními právními předpisy [2]. Obsahuje všechny živiny potřebné pro novorozence. Je bohatým zdrojem ochranných látek (např. imunoglobulinů), enzymů a růstových faktorů. Splňuje požadavky novorozenců a nutriční význam spotřebitelů všech věkových kategorií [3].

1.2 Chemické složení mléka

Mléko vyprodukované v prvních několika dnech po porodu označujeme jako mlezivo. Obsahuje velké množství bílkovin, imunoglobulinů, které chrání novorozence před infekcí. Mlezivo se ale neuvádí do výroby [4]. Zralé mléko je komplex skládající se z koloidních kuliček mléčného tuku, suspenzujících ve vodném roztoku. Složení mléka u různých savců se liší druhem a množstvím jejich komponentů [5].

Tabulka 1: Chemické složení mléka (g/100g) z odlišných druhů savců [3]

Druh	tuky	bílkoviny	laktóza	Minerální látky	Počet pevných látek
antilopa	1,3	6,9	4	1,3	25,2
bizon	1,7	4,8	5,7	0,96	13,2
buvol	10,4	5,9	4,3	0,8	21,5
velbloud	4,9	3,7	5,1	0,7	14,4
kráva (Holštejn)	3,5	3,1	4,9	0,7	12,2
kráva (Guernesy)	5	3,8	4,9	0,7	14,4
kráva (Jersey)	5,5	3,9	4,9	0,7	15
Koza	3,5	3,1	4,6	0,79	12
Osel	1,2	1,7	6,9	0,45	10,2
Kůň	1,6	2,7	6,1	0,51	11
člověk	4,5	1,1	6,8	0,2	12,6
prase	8,2	5,8	4,8	0,63	19,9
Ovce	5,3	5,5	4,6	0,9	16,3
velryba	34,8	13,6	1,8	1,6	51,2

Kravske mléko tvoří hlavní surovinu při výrobě mléčných výrobků. Skládá se hlavně z vody (70-90 %) a sušiny, která obsahuje přibližně 4,8 % laktózy, 3,2 % bílkovin, 3,7 % tuku, 0,19 % nebílkovinných dusíkatých látek a 0,7 % popela [5,6].

1.2.1 Bílkoviny

Mezi hlavní bílkoviny v mléce patří kaseiny, syrovátkové bílkoviny a imunoglobuliny. Asi 80 % bílkovin tvoří kaseiny (α_{s1} , α_{s2} , β , κ - kasein), zbylých 20 % tvoří syrovátkové bílkoviny, které se liší fyziologickými a biologickými vlastnostmi. Jsou bohatým zdrojem prekurzorů biologicky aktivních peptidů, které se tvoří enzymatickou hydrolýzou bílkovin nebo proteolytickou aktivitou bakterií mléčného kvašení. Mají vysokou nutriční hodnotu s biologickou hodnotou a z hlediska výživy se svou plnohodnotností blíží 100 % [5].

Hlavní strukturální bílkovina mléka, kasein, se účastní tzv. sladkého i kyselého srážení mléka, což závisí na schopnosti koagulace s vápenatými ionty. Zastoupení jednotlivých druhů kaseinů závisí na distribuci fosfátu (fosfoserinových zbytků). Fosfát váže vápník za vzniku fosforečnanu vápenatého. Obecně platí, že α_{s1} -kasein, α_{s2} -kasein, β -kasein tvoří v přítomnosti vápenatých iontů nerozpustné soli již při malých koncentracích, na rozdíl od κ -kaseinu, který není citlivý na přítomnosti vápníku a slouží jako jejich stabilizátor [6]. Kaseiny se soustřeďují do tzv. micel. Jsou velmi hydratované a obsahují anorganické minerální složky (především vápník, fosfor, ale také hořčík, citrát a společně tvoří koloidní fosforečnan vápenatý) [3].

1.2.2 Enzymy

V kravském mléce je přítomno asi 60 enzymů, z nichž bylo charakterizováno 20. Mohou pocházet z různých zdrojů – z krve, somatických buněk, mléčného tuku, z membrán nebo cytoplazmy buněk. Všechny jsou spojeny s různými frakcemi mléka, např. s kaseinovými micelami. Mezi technologicky důležité enzymy patří plazmin, lipoproteinové lipázy, alkalické fosfatázy, laktoperoxidázy. Plazmin je důležitý u sýrařské technologie, v sýru přispívá k primární proteolýze (přeměně kaseinu na polypeptidy). Lipázy hydrolyzují esterové vazby esterů na rozhraní oleje a vody. Jsou syntetizovány prsní sekreční žlázou. Lipoproteinová lipáza je glykoprotein skládající se ze 450 aminokyselinových zbytků a je optimálně aktivní při pH 9,2 a teplotě 37 °C. Vede k uvolnění volných mastných kyselin, které mohou mít za následek hydrolytické žluknutí mléka. Alkalická fosfatáza také pochází ze sekreční žlázy. Má technologický význam pro většinu mléčných výrobků.

Slouží jako indikátor správně provedené pasterace. Optimálně je účinná při pH 9,0-10,5 a teplotě 37 °C. Laktoperoxidáza je peroxidáza katalyzující oxidaci peroxidu vodíku na molekulární kyslík a vodu. V mléce zastává antimikrobiální funkci v přítomnosti peroxidu vodíku a tiokyanatanu [3].

1.2.3 Tuky

Mléčný tuk je komplex lipidů, většinou se jedná o triacylglyceroly nebo estery mastných kyselin v kombinaci s glycerolem (97-98 %), dále to jsou fosfolipidy, volné steroly a stopová množství volných mastných kyselin [5].

1.2.4 Sacharidy

Hlavním sacharidem v mléce je laktóza. Tvoří zhruba 54 % z celkové tukuprosté mléčné sušiny. Poskytuje 30 % energie mléka [5].

1.2.5 Minerální látky

Mléko je zdrojem zejména vápníku, fosforu, hořčíku, ale také draslíku a stopových prvků, jako je např. zinek. Vápník se ve formě rozpustných komplexů s bílkovinami dobře vstřebává [5].

1.2.6 Vitaminy

Mléko je zdrojem vitaminů zásadních pro člověka. Obsahuje vitaminy rozpustné v tucích D, E, K, dále vitaminy rozpustné ve vodě, jako jsou kyselina askorbová, vitamin B1, B2, B3, B6, B12, kyselina pantotenová, kyselina listová v proměnlivých množstvích [5].

1.3 Patogenní mikroorganismy obsažené v mléce

Mléko a mléčné výrobky jsou vysoce živným médiem, ve kterém se mikroorganismy mohou množit a způsobit jejich kažení. Tyto mikroorganismy jsou závislé na mikrobiální kvalitě surovin, které zahrnují, za jakých podmínek byly produkty vyráběny, a při jaké teplotě a jak dlouho byly skladovány [5].

Mezi nejběžnější původce kažení mléka a mléčných výrobků patří Gramnegativní tyčinkovité bakterie (např. *Pseudomonas* spp., koliformní bakterie), Grampozitivní sporotvorné bakterie (např. *Bacillus* spp., *Clostridium* spp.), bakterie produkující kyselinu mléčnou (např. *Lactococcus* spp.) a v neposlední řadě kvasinky a plísně [5]. Teoreticky by mléko získané nadojením z vemene od zdravé dojnice mělo být sterilní [7].

Nicméně i v čerstvě nadojeném mléku jsou přítomny mikroorganismy. Mohou pocházet ze strukového kanálu při dojení. Obecně se jedná u zdravých krav o hodnotu < 100 CFU/ml. Směrnice 92/46 (EU, 1992) uvádí, že syrové mléko musí pocházet od zdravých zvířat a nemělo by ohrožovat lidské zdraví prostřednictvím infekčních chorob nebo cizorodými látkami z mléka přenosnými na člověka [7]. Avšak konzumací nepasterovaného mléka nebo výrobků z něj mohou být v omezeném rozsahu spojeny s alimentárními onemocněními [3].

Jak bylo zmíněno výše, mikroorganismy mohou vstoupit mléčnou žlázou prostřednictvím strukového kanálu v průběhu dojení, konkrétně z jeho znečištěného povrchu fekáliemi, ale také z jiných zdrojů včetně půdy, podestýlky, krmiva a dojícího zařízení [4,5]. Nicméně pokud je počáteční úroveň kontaminace nízká, následné správné podmínky skladování mléka (při určité hygieně a teplotě) mohou růst bakterií minimalizovat [7].

Mléko se zpracovává mnoha způsoby na různé výrobky, jako jsou smetana, sýry, máslo a další mléčné výrobky [8]. Různé fáze řetězce při zpracování mléka, musí být pod kontrolou, aby byla zajištěna kvalita a bezpečnost. Prvním krokem dosažení tohoto cíle je dodržování základní správné výrobní praxe, dále dodržování podmínek hygieny a zavedení různých systémů zabezpečení, např. HACCP jako nástroje k posuzování rizika se zaměřením na preventivní opatření. V závislosti na zemi původu, druhu, klimatických a hygienických podmínkách se v syrovém mléce může vyskytovat jeden nebo více z uvedených patogenů *Mycobacterium* spp., *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Campylobacter jejuni*, *Yersinia enterocolitica*, patogenní *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter* spp., *Pseudomonas* spp. nebo *Flavobacterium* spp. [5].

1.4 Tepelné ošetření mléka a inaktivace mikroorganismů

1.4.1 Pasterace

Pasterace je definována jako zahřev každé částice mléka či mléčného výrobku na určitou teplotu po určitou dobu, aniž by došlo k opětovné dekontaminaci [9].

Cíl pasterace [9]:

- 1) Veřejné zdraví – zaručení bezpečnosti a zdravotní nezávadnosti
- 2) Udržení kvality a prodloužení trvanlivosti

Kombinace času a teploty pasteračního procesu jsou vysoce regulovatelné. Příkladem je kombinace teploty 63 °C po dobu nejméně 30 minut, nebo 72 °C po dobu 15 sekund. Výrobky s vysokým obsahem tuku mají obecně vyšší pasterační normy z důvodu špatného vedení tepla tukem [9]. Hlavní úlohou je tedy zničení mikroorganismů vegetativních forem mikroorganismů způsobujících onemocnění. Pasterace však není účinná k inaktivaci termorezistentních spor a k organismům přispívajících ke kažení mléka, např. *Clostridium sporogenes*, *Bacillus cereus* [8].

1.4.2 UHT sterilace

Termín sterilace se týká úplného odstranění mikroorganismů odpovědných za kažení mléka. UHT záhřev ničí nesporetné patogeny v mléce a navíc snižuje i počty většiny sporetných patogenů. Mléko se zahřívá při teplotě 135-140 °C po dobu několika sekund. Mléko je tedy sterilní a musí být baleno do aseptických obalů. Sterilací se inaktivuje většina Gramnegativních mikroorganismů (zejména psychotrofních), ale také Grampozitivních patřících do rodů *Enterococcus*, *Streptococcus* (*S. thermophilus*), *Microbacterium*, *Lactobacillus*, *Mycobacterium*, *Corynebacterium*. Avšak některé druhy psychotrofních bakterií rodu *Bacillus* mohou přežívat [8].

1.5 Bakterie mléčného kvašení

Bakterie mléčného kvašení tvoří velkou skupinu nepohyblivých, nesporelujících Grampozitivních koků a tyčinek, které fermentují sacharidy za fakultativně anaerobních (mikroaerofilních) podmínek [10].

Jedná se o organismy v současnosti zařazované do rodů *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, *Weissella* a dalších [11]. Tvoří různorodou skupinu obligátně fermentativních mikroorganismů, produkujících kyselinu mléčnou jako hlavní produkt degradace sacharidů [12].

Nevyskytují se pouze v mléce a ve fermentovaných mléčných produktech, ale také v rozkládajících se rostlinách, ve střevech lidí a zvířat [10]. V dnešní době představují předmět intenzivního výzkumu pro jejich základní roli ve většině fermentovaných potravin. Mají schopnost tvořit antimikrobiální látky a rovněž mohou podporovat probiotické vlastnosti [13].

Produkují látky, jako je peroxid vodíku, slabé organické kyseliny, bakteriociny a metabolity s nízkou molekulovou hmotností, které inhibují patogenní organizmy ve fermentovaných potravinách, čímž zajišťují jejich bezpečnost [14].

Některé kmeny bakterií mléčného kvašení se používají k výrobě různých fermentovaných výrobků. Další skupiny, zejména laktobacily, které kolonizují gastrointestinální trakt lidí a zvířat, jsou považovány za tzv. health-promoting mikroorganizmy, neboli probiotika [15].

Metabolismus aminokyselin u bakterií mléčného kvašení je sledován z důvodu dopadu na kvalitu a bezpečnost potravin, protože aminokyseliny mohou být prekurzory sloučenin, které se významně podílejí nejen na charakteristické chuti některých potravin, ale také na vzniku biogenních aminů [15].

1.5.1 Rozdělení bakterií mléčného kvašení

Podle konečného produktu fermentace můžeme bakterie mléčného kvašení rozdělit [10]:

- 1) Homofermentativní: z 90 % je téměř jediným konečným produktem kyselina mléčná
- 2) Heterofermentativní: kromě kyseliny mléčné (50 %) produkují kyselinu octovou, CO₂ a za určitých podmínek i etanol

Tabulka 2: Homofermentativní bakterie mléčného kvašení [5]

HOMOFERMENTATIVNÍ		
rod <i>Lactobacillus</i> <i>L. acetotolerans</i> <i>L. acidophilus</i> <i>L. alimentarius</i> <i>L. casei</i> <i>L. coryniformis</i> <i>L. curvatus</i> subsp. <i>curvatus</i> subsp. <i>melibiosus</i> <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> subsp. <i>delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> <i>L. fuchuensis</i> <i>L. helveticus</i> <i>L. jensenii</i> <i>L. kefiranofaciens</i> subsp. <i>kefiranofaciens</i> subsp. <i>kefirgranum</i>	rod <i>Lactococcus</i> <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> subsp. <i>hordniae</i> <i>L. garvieae</i> <i>L. plantarum</i> <i>L. raffinolactis</i>	rod <i>Streptococcus</i> <i>S. bovis</i> <i>S. salivarius</i> subsp. <i>salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i>
		rod <i>Tetragenococcus</i> <i>T. halophilus</i> <i>T. muriaticus</i>
	rod <i>Paralactobacillus</i> <i>P. selangorensis</i>	rod <i>Vagococcus</i> <i>V. fluvialis</i> <i>V. salmoninarum</i>
	rod <i>Pediococcus</i> <i>P. acidilactici</i> <i>P. claussenii</i> <i>P. pentosaceus</i> <i>P. damnous</i> <i>P. dextrinicus</i> <i>P. inopinatus</i> <i>P. parvulus</i>	

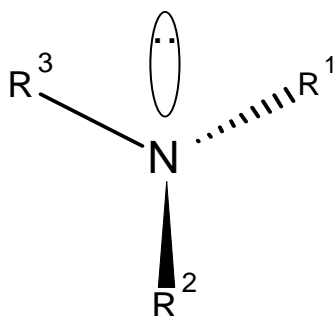
Tabulka 3: Heterofermentativní bakterie mléčného kvašení [5]

HETEROFERMENTATIVNÍ		
rod <i>Lactobacillus</i>	rod <i>Leuconostoc</i>	rod <i>Oenococcus</i>
<i>L. brevis</i>	<i>L. argentinum</i>	<i>O. oeni</i>
<i>L. buchneri</i>	<i>L. citreum</i>	
<i>L. cellobiosus</i>	<i>L. fallax</i>	rod <i>Weissella</i>
<i>L. fermentum</i>	<i>L. carnosum</i>	<i>W. cibaria</i>
<i>L. hilgardii</i>	<i>L. gelidum</i>	<i>W. confusa</i>
<i>L. sanfranciscensis</i>	<i>L. inhae</i>	<i>W. hellenica</i>
<i>L. trichoides</i>	<i>L. kimchii</i>	<i>W. halotolerans</i>
<i>L. pontis</i>	<i>L. lactis</i>	<i>W. kandleri</i>
<i>L. fructivorans</i>	<i>L. mesenteroides</i>	<i>W. kimchii</i>
<i>L. kimchii</i>	subsp. <i>cremoris</i>	<i>W. minor</i>
<i>L. paralimentarius</i>	subsp. <i>dextranicum</i>	<i>W. thialandensis</i>
<i>L. panis</i>	subsp. <i>mesenteroides</i>	<i>W. paramesenteroides</i>
<i>L. sakei</i>		<i>W. viridescens</i>
subsp. <i>sakei</i>	rod <i>Carnobacterium</i>	<i>W. koreensis</i>
subsp. <i>carnosus</i>	<i>C. divergens</i>	
	<i>C. gallinarum</i>	
	<i>C. mobile</i>	
	<i>C. piscicola</i>	
	<i>C. viridans</i>	

2 BIOGENNÍ AMINY

2.1 Aminy

Aminy jsou organické sloučeniny obsahující dusík ve formě aminoskupiny [16]. Jsou to deriváty amoniaku a podobají se mu svou strukturou. Vazebné úhly v amoniaku i v aminech se blíží uspořádání tetraedru, přičemž čtvrtý orbital zaplňuje volný elektronový pár (Obr. 1) [17].



Obr. 1. Vazebné úhly aminu [17]

2.1.1 Charakteristika aminů

Aminy mohou obsahovat jednu či více alkylových skupin (alkylaminy) nebo arylových skupin (arylaminy). Ačkoliv v mnohém je chemické chování obou typů podobné, existují mezi nimi významné rozdíly v reaktivitě. Podle počtu uhlíkatých substituentů připojených k atomu dusíku dělíme aminy na primární (RNH_2), sekundární (R_2NH) a terciární (R_3N). Např. metylamin CH_3NH_2 je primární amin, dimethylamin $(\text{CH}_3)_2\text{NH}$ je sekundární amin a trimethylamin $(\text{CH}_3)_3\text{N}$ je amin terciární. Aminy se často vyskytují v přírodních materiálech, jak v rostlinných tak i v živočišných organizmech. Například trimethylamin se vyskytuje v živočišných tkáních a je z části příčinou výrazného rybího zápachu. Nikotin je obsažen v tabáku a kokain, který je znám svými povzbudivými účinky, se nachází v keřích koky rostoucích v Jižní Americe [18].

2.1.2 Fyzikální vlastnosti aminů

Vlastnosti aminů jsou závislé na stupni substituce na dusíku. Významnou vlastností primárních a sekundárních aminů je jejich schopnost tvořit intermolekulární vodíkové vazby. Asociace molekul primárních a sekundárních aminů se projevuje sníženou těkavostí těchto látek [16].

Podobně jako alkoholy jsou i aminy s méně než pěti atomy uhlíku obvykle rozpustné ve vodě. A stejně jako alkoholy, primární a sekundární aminy vytvářejí intermolekulární vazby a jsou proto silně asociované. Důsledkem je skutečnost, že aminy mají vyšší teploty varu než alkany o podobné molekulové hmotnosti [17].

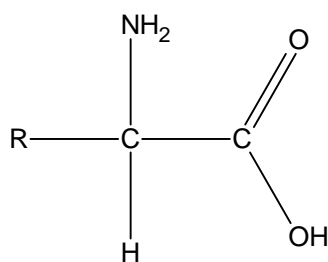
2.1.3 Fyziologické vlastnosti aminů, přírodní aminy

Nižší alifatické aminy mají nepříjemný zápach a ani aromatické aminy nevynikají příjemnou vůní. Příčinou charakteristického zápachu při rozkladu organismů je hlavně vznikající 1,4-butandiamin (putrescin) a 1,5-pentadiamin (kadaverin), které vznikají dekarboxylací aminokyselin. Aromatické aminy jsou většinou toxické a nebezpečí otravy je zvyšováno tím, že jsou snadno vstřebávány pokožkou. Některé aminy jsou karcinogenní (např. betafenylalanin, benzidin) [16]. Analogicky jako při enzymově katalyzovaných dekarboxylacích dochází k dekarboxylaci aminokyselin působením vyšších teplot a to za vzniku příslušných aminů. Jako produkty enzymové činnosti vznikají některé složky, udávající aroma sýrů. Histamin, který je považován za tkáňový hormon, má i patogenní účinky v podobě otrav. Může se ve zvýšených koncentracích vyskytovat v mase některých nevhodně skladovaných ryb (až 3 g.kg⁻¹), kde vzniká bakteriální dekarboxylací z histidinu [18].

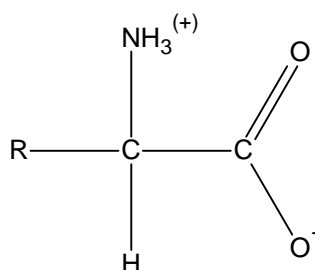
2.2 Aminokyseliny

Aminokyseliny jsou organické sloučeniny obsahující karboxylovou skupinu a aminoskupinu, uhlík, vodík, kyslík a dusík (eventuelně síru). Existuje 21 základních α -aminokyselin, které v čtených kombinacích tvoří základ proteinů a peptidů, v nichž jsou spojeny peptidovou vazbou. Z aminokyselin se kromě proteinů a peptidů tvoří i další látky důležité pro činnost organismu (např. tyroxin, katecholaminy, melanin, histamin aj.). Popisován je rovněž přímý specifický farmakodynamický účinek aminokyselin vázaný na určité funkce (např. funkce glycinu a alaninu jako neurotransmiterů). Dělí se na aminokyseliny neesenciální (nepostradatelné), které si lidský organizmus umí sám vyrobit, např. z cukrů nebo z jednodušších látek, a na aminokyseliny esenciální (postradatelné), u nichž je člověk odkázán na jejich přívod z potravy, zejména z živočišných bílkovin. Kromě aminokyselin, které jsou součástí peptidů, existují i další aminokyseliny (např. ornitin, citrulin, taurin) [16].

Přirozené aminokyseliny vázané v proteinech mají aminovou (někdy iminovou) skupinu vázanou na uhlíku bezprostředně sousedícím s karboxylem (Obr. 2). Mají tedy (s výjimkou glycinu) jeden asymetrický uhlíkový atom v molekule, takže se mohou vyskytovat ve dvou prostorových modifikacích. Aminokyseliny vázané v proteinech mají vesměs L-konfiguraci, i když se v přírodě některé D-aminokyseliny také ojediněle vyskytují, a to buď volné, nebo vázané v peptidech. Vzhledem k přítomnosti ionizovatelné bazické aminoskupiny a kyselé karboxylové skupiny mohou tvořit vnitřní soli (Obr. 3) [19].



Obr. 2. Neionizovaná aminokyselina [19]



Obr. 3. Vnitřní sůl aminokyseliny [19]

2.2.1 Vznik aminů a dalších sloučenin z aminokyselin

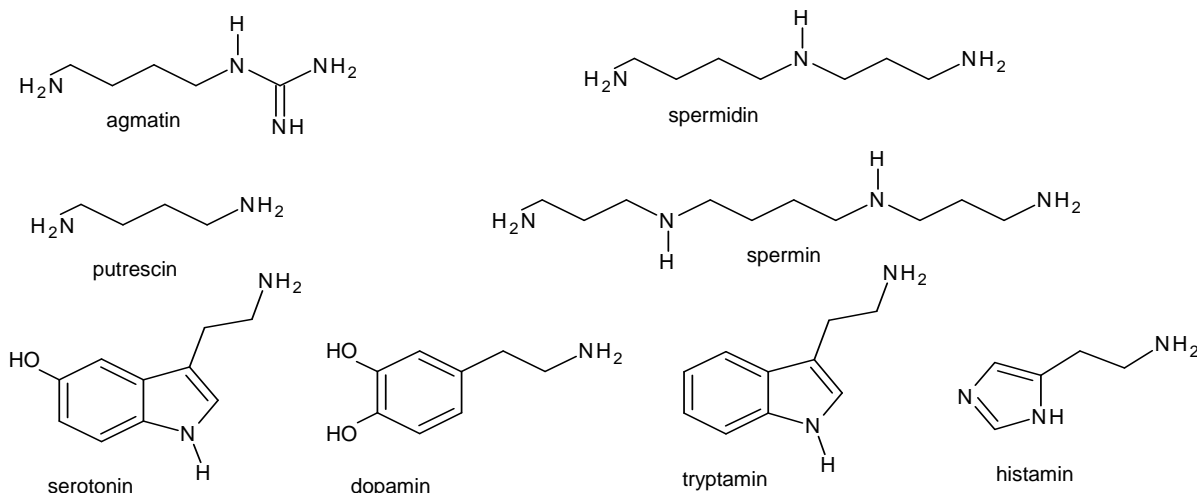
K termické degradaci aminokyselin a ke vzniku aminů, popřípadě dalších sloučenin, dochází i při relativně nízkých teplotách, které je možno v mnohých tepelně opracovaných potravinách očekávat, zvláště pak v jejich povrchových vrstvách. Degradací serinu a treoninu při 280 °C vzniká např. řada derivátů pyrrolu a pyrazinu a propionaldehydu, ze serinu navíc acetaldehyd, amoniak, etylamin a etanolamin. Z cystinu a cysteinu vzniká vedle mnoha sirných sloučenin opět acetaldehyd, amoniak a etylamin. Z metioninu se tvoří acetaldehyd, aceton, propanal, isobutanal, etyl-, amyl- a krotylamin. Senzoricky významné produkty termické degradace fenylalaninu a tryptofanu lze prokázat již při teplotě 150 °C, u tyrozinu při 300 °C [19].

Kromě alkylderivátů benzenu z fenylalaninu a derivátů indolu z tryptofanu vzniká z fenylalaninu acetaldehyd, z tyrozinu amoniak, metylamin a tyramin, z tryptofanu metylamin, etylamin a tryptamin [19]. Aminokyseliny jsou prekurzory biogenních aminů. Jejich stanovení je důležité zejména pro kontrolu biogenních aminů se známými toxickými účinky [20].

2.3 Biogenní aminy

Biogenní aminy jsou základní, dusíkaté sloučeniny s biologickou aktivitou [21]. Popisují se jako organické báze s alifatickými, aromatickými a heterocyklickými strukturami (Obr. 4) [22]. Patří k přirozeným antinutričním faktorům, hygienicky významným ve výživě. Jsou potřebné pro řadu základních funkcí, jako je například regulace nukleových kyselin, syntéza bílkovin, stabilizace membrán, kontrola krevního tlaku. Na druhé straně jejich vysoké koncentrace mohou způsobit toxické efekty. Biogenní aminy v potravinách mohou pocházet ze dvou zdrojů. Jsou přirozenou součástí buněčných struktur rostlin nebo mohou vznikat při procesu výroby a skladování potravin jako výsledek metabolického působení mikroorganismů. Stávají se tak indikátorem mikrobiální kontaminace a jejich koncentrace může být jedním z ukazatelů kvality potravin [23].

Mezi nejběžnější biogenní aminy nalezené v potravinách patří histamin, tyramin, kadaverin, 2-fenyletylamin, spermin, spermidin, putrescin, tryptamin a agmatin. Tyto polyaminy jsou přirozeně přítomné v potravinách a podílí se na růstu a buněčné proliferaci [24]. Jsou to složky vyskytující se v mikrobiálních, rostlinných i živočišných buňkách. Jejich biosyntéza je velmi silně regulovaná činností dvou klíčových enzymů ornitindekarboxylázou a s-adenozylmetionindekarboxylázou. Tvoří se z metioninu a argininu [25]. Pozornost se především soustřeďuje na stanovení histaminu, putrescinu, kadaverinu, tyraminu, tryptaminu, sperminu, spermidinu v rybích produktech, sýrech, fermentovaných masových a zeleninových výrobcích, v pivu a víně [23].



Obr. č. 4: Vzorce biogenních aminů [26]

2.3.1 Toxicita biogenních aminů

Je velmi obtížné určit toxikologickou úroveň biogenních aminů, protože závisí na individuálních vlastnostech a přítomnosti jiných aminů v potravinách [27]. Lidské střevo za normálních okolností během příjmu potravy, metabolizuje malé množství biogenních aminů na fyziologicky méně aktivní rozkladné produkty. K tomu slouží detoxifikační systém, který využívá specifické enzymy. Biogenní aminy jsou ve střevech, ledvinách, v plicích a v jiných orgánech oxidovány a detoxikovány pomocí mono- a diaminoxidáz [10]. Pokud se však přijímané množství týká vysokých dávek, systém není schopen biogenní aminy odbourávat dostatečně a detoxikace je neefektivní. Biogenní aminy se pak rychle vstřebávají do krevního oběhu, což vede k intoxikaci [28]. Obecně bylo zjištěno, že například 500 mg/kg histaminu a 100-800 mg/kg tyraminu v potravinách jsou nebezpečné pro lidský organizmus [29]. Histamin způsobuje intoxikaci projevující se bolestí hlavy, nevolností, návaly horka, kožními vyrážkami, pocením, dušností, střevními problémy [28]. Vysoká hladina tyraminu je hlavním mutagenním prekurzorem. Způsobuje nevolnost, úzkost, návaly horka pocení, bušení srdce, bolesti hlavy, vyrážku, pálení v ústech a zvyšuje krevní tlak. Dále současný výskyt polyaminů, včetně putrescinu, kadaverinu, spermidinu, sperminu a agmatinu, inhibuje činnost střeva při metabolizování histaminu pomocí enzymů (diaminoxidáza, histamin-N-metyltransferáza), které posilují otravu histaminem [29].

Kromě toho mají biogenní aminy i další negativní fyziologické účinky, a to karcinogenní, při reakci s nitrózosloučeninami [30]. Tryptamin způsobuje např. deprese, schizofrenii [31].

2.3.2 Biologické účinky

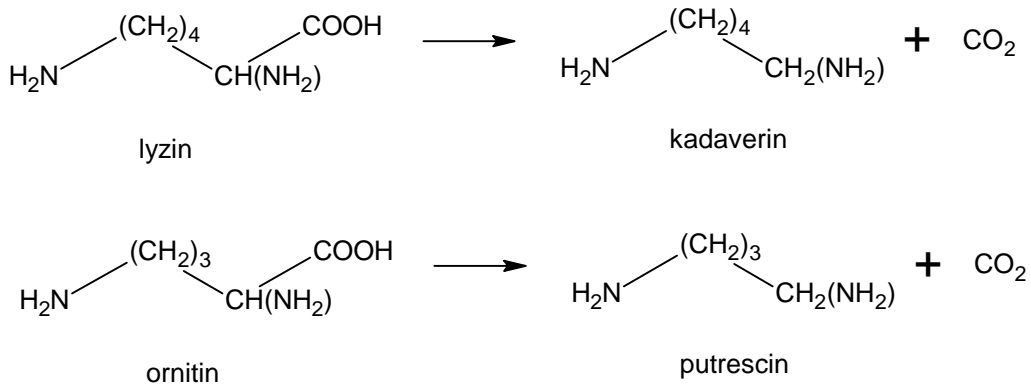
Primární nebo sekundární aminy patří mezi důležité neurotransmitery, které jsou odvozeny od aminokyselin. Například polyaminy tvořící komplexy s DNA jsou odvozeny od aminokyseliny ornitinu a jsou meziprodukty cyklu močoviny. Tyrozin vede ke vzniku katecholaminů, mezi které lze zahrnout dopamin, noradrenalin a adrenalin. Adrenalin a noradrenalin jsou hormony vylučované z dřeně nadledvin. Adrenalin zvyšuje krevní tlak, tepové frekvence a rozšiřuje plicní průchody. Noradrenalin se rovněž podílí na zvýšení krevního tlaku a přenáší nervový vzruch z jednoho konce nervového vlákna na další vlákno. Dalším důležitým neurotransmiterem je serotonin odvozený od tryptofanu. Serotonin spolu také s dopaminem patří mezi důležité přenašeče vzruchu v mozku, kde nedostatek dopaminu souvisí s mnoha psychiatrickými poruchami, včetně Parkinsonovy choroby. Nadbytek dopaminu může být spojen s psychickými poruchami, jako je schizofrenie [32,33].

2.3.3 Dekarboxylázová aktivita a vznik biogenních aminů

Faktory ovlivňující tvorbu biogenních aminů v potravinách [34]:

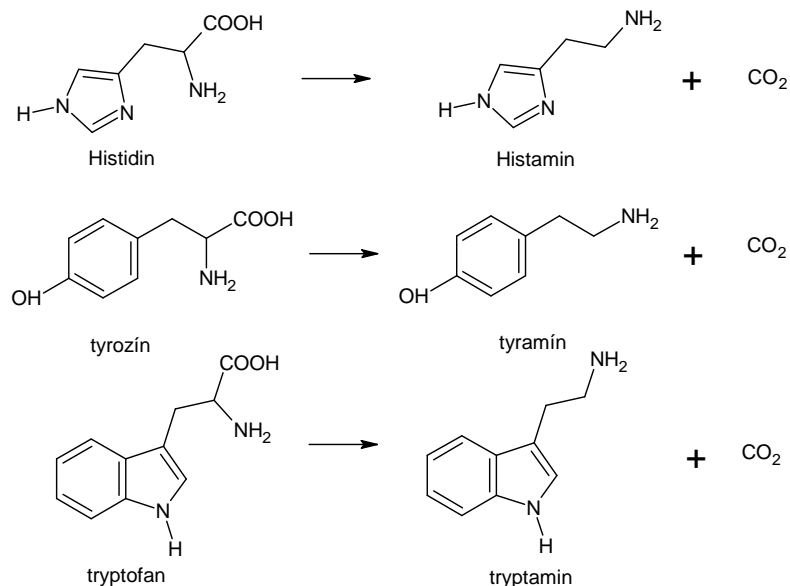
- 1) Přítomnost volných aminokyselin
- 2) Přítomnost pyridoxalfosfátu
- 3) Příznivé podmínky pro růst mikroorganismů produkujících dekarboxylázy

Mikroorganismy, které produkují dekarboxylázy, mohou být přirozeně přítomné v produktech, anebo jsou vnesené před technologickým zpracováním, během anebo po ukončení výroby [8]. Produkce aminů bakteriemi je velmi ovlivněna teplotou prostředí vzhledem ke skutečnosti, že ovlivňuje nejen růst mikroorganismů, ale i aktivitu dekarboxylačních enzymů. Mezi další doplňkové faktory ovlivňující vznik aminů patří přítomnost kyslíku, pH prostředí, obsah glukózy a redoxní potenciál [34]. Biogenní aminy se tvoří mikrobiální dekarboxylací aminokyselin a jsou závislé na konkrétním bakteriálním kmeni [24]. Dekarboxylací aminokyselin dekarboxylázami vzniká oxid uhličitý a některé toxické primární aminy nepříjemné chuti. Z diaminokyselin lyzinu a ornitinu vznikají toxické primární aminy kadaverin a putrescin (Obr. 5) [10].



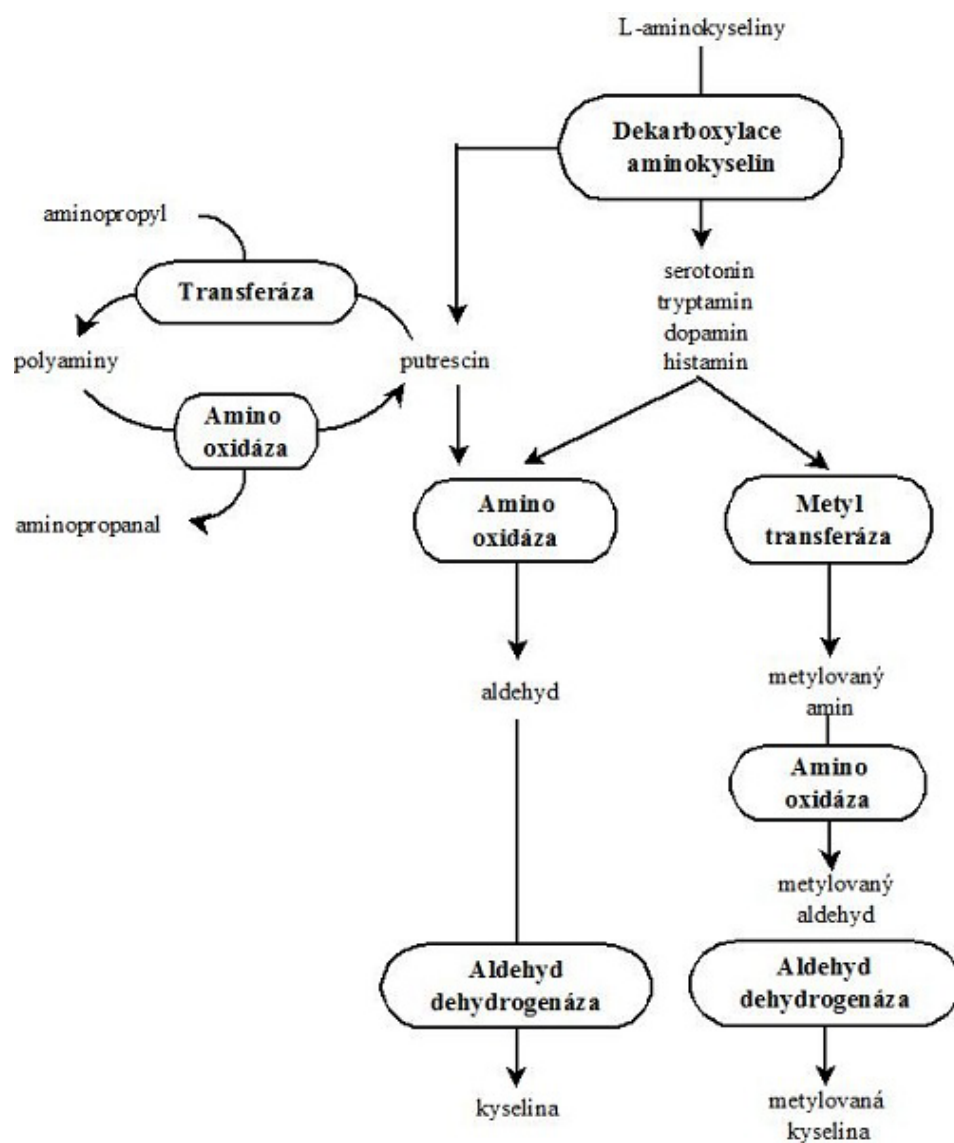
Obr. 5. Dekarboxylace diaminokyselin [10]

Biogenní aminy mohou vznikat i během chladírenského skladování vakuovaného masa. Jejich producenty lze zařadit zejména mezi bakterie z čeledi *Enterobacteriaceae* a z rodu *Pseudomonas*. Dekarboxylací aromatických aminokyselin, histidinu, tyrozinu a tryptofanu vznikají toxické primární aminy histamin, tyramin a tryptamin (Obr. 6). Tyto aminy vznikají i při technologicky potřebných procesech, jako je např. fermentace sýrů, salámů, ale také potravin rostlinného původu nebo při alkoholovém kvašení, při kvašení zelí. Významnou schopnost dekarboxylovat aminokyseliny na příslušné biogenní aminy, mají enterokoky [10].



Obr. 6. Dekarboxylace aromatických aminokyselin [10]

Funkce biogenních aminů vyprodukovaných mikroorganismy je považována za ochranný mechanismus, který slouží k udržování intracelulárního pH v kyselém prostředí. Stejně jako kyselé prostředí jsou dekarboxylázové enzymy vyvolané přítomností specifických aminokyselin. Při dekarboxylační reakci se spotřebuje proton za následného zvýšení pH v cytoplasmě, kdy dekarboxylázy spolupracují s aminokyselinami systémem aktivního transportu. Dochází k výměně aminu za extracelulární aminokyselinu přesunutím protonu ven z buňky [35,36]. Následující obrázek 7 shrnuje společné vlastnosti metabolických drah aminů.



Obr. 7. Metabolické cesty aminů a polyaminů u savců [26]

2.3.4 Mikroorganismy produkující biogenní aminy

V mnohých potravinách jsou přítomny mikroorganismy obsahující dekarboxylační enzymy aminokyselin. Jedná se o druhy rodů *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Photobacterium*, dále rody čeledi *Enterobacteriaceae*, a to *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Escherichia*, *Proteus*, *Salmonella* a *Shigella* a čeledi *Micrococcaceae* a *Staphylococcaceae*, a to *Staphylococcus*, *Micrococcus* a *Kocuria* [37].

Mezi významné producenty biogenních aminů se řadí i četné bakterie mléčného kvašení (BMK). Rody *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Carnobacterium*, *Pediococcus*, *Lactococcus* a *Leuconostoc* mají schopnost dekarboxylace aminokyselin. Navíc u fermentovaných výrobků bylo zjištěno, že vysoké množství bílkovin, které jsou zde přítomny a následně degradovány činností bakterií mléčného kvašení, které vykazují během zrání proteolytickou aktivitu a poskytují tak prekurzory pro činnost dekarboxyláz BMK a volně žijící mikroflóry [37].

3 SÝRY ZRAJÍCÍ V SOLNÉM NÁLEUVU

3.1 Charakteristika a rozdělení sýrů

Sýr tvoří obecný název pro skupinu fermentovaných mléčných výrobků mnoha typů a příchutí po celém světě. Podle vyhlášky 77/2003 Sb. je sýr je mléčný výrobek vyrobený vysrážením mléčné bílkoviny z mléka působením syřidla či jiných vhodných koagulačních činidel, prokysáním a oddělením podílu syrovátky [2]. V dnešní době považujeme sýr za velmi výživnou potravinu. Existuje více než 1000 typů sýrů (tabulka 4) [38].

Tabulka 4: Rozdělení sýrů [10]

sladké sýry	
čerstvé, nezrající, solené	měkký tvaroh a čerstvé krémové sýry
čerstvé, zrající, solené	imperiál, smetanový, máslový sýr
plísňové s plísní na povrchu	brie, camembert, hermelín, encián
zrající pod mazem	limburský, romadúr, pivní sýr
plísňové s plísní v těstě	rokfór, gorgonzola, stilton, niva
pařené	mozzarella, zlato, parenica
s nízko dohřívanou a lisovanou sýřeninou	tylžský
s nedohřívanou, mletou a lisovanou sýřeninou	kantal
s nízko dohřívanou, mletou, lisovanou sýřeninou	čedar
s nízko dohřívanou, drobenou a lisovanou sýřeninou	holandské sýry - gouda, eidamská koule, eidamský blok, salámový sýr
s vysoko dohřívanou, lisovanou sýřeninou a s tvorbou ok v těstě	ementál, moravský bochník
s vysoko dohřívanou, lisovanou sýřeninou bez tvorby ok v těstě	parmezán, grana
2) kyselé sýry	
čerstvé	tučný tvaroh
zrající	olomoucké tvarůžky
plísňové	plísňový sýr s ušlechtilou plísní
3) tavené sýry	
	druhé
	smíšené
	ochucené

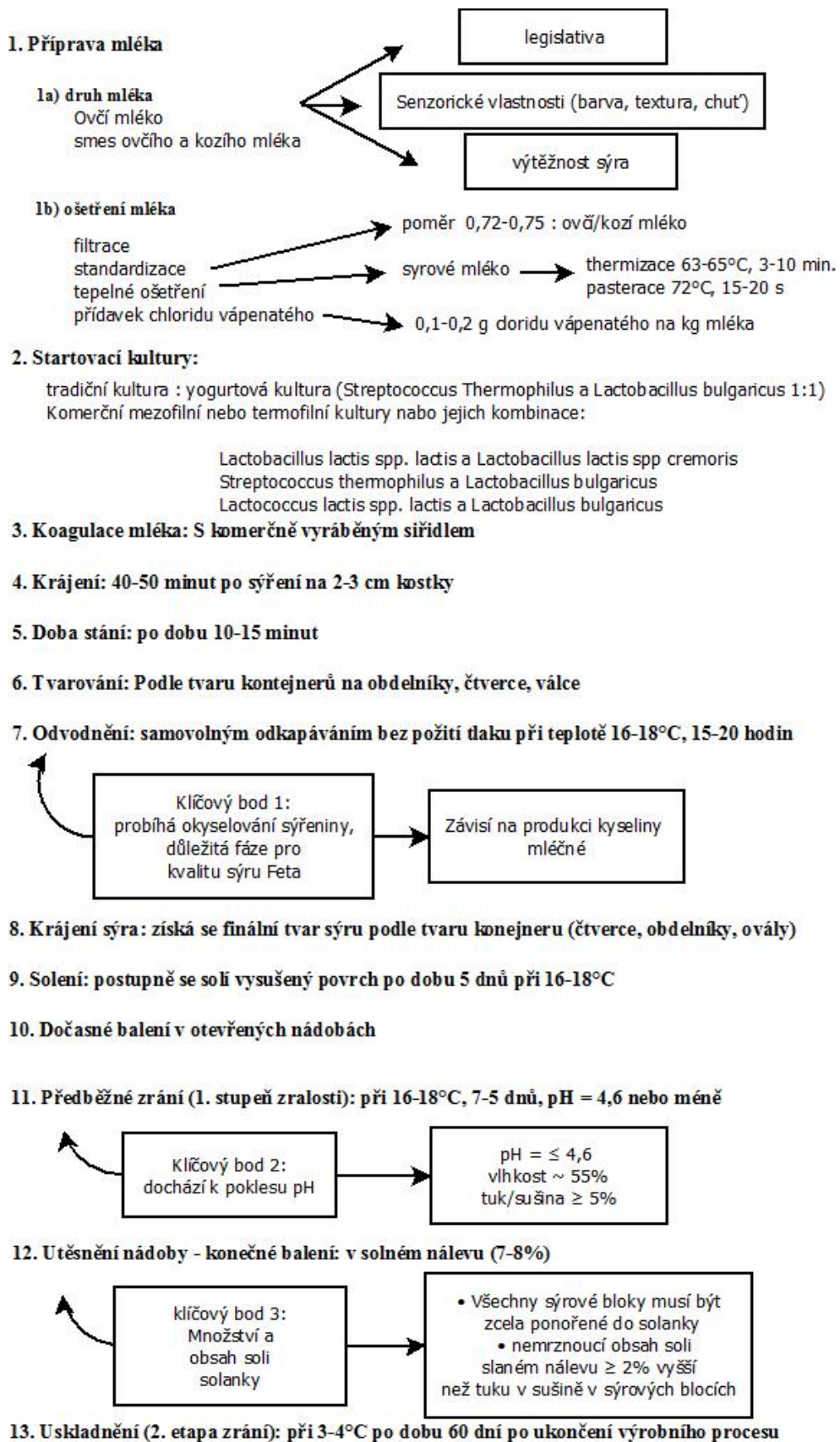
Technologie výroby sýrů má dva důležité cíle, stanovit parametry pro daný sýr (o určité chuti, tvaru, konzistenci) a rozvíjet výrobu a podmínky zrání tak, aby se tento proces mohl použít pro opakovanou výrobu. Jedná se o jednoduchý postup zahrnující komplexní chemické a fyzikální parametry, které určují výrobní proces. Mezi ovlivňující faktory patří pH, rozpustnost koloidního fosforečnanu vápenatého, průběh proteolýzy, teplota a složení sýra (zejména jeho tučnost a obsah kaseinu) [7].

3.2 Sýry zrající v solném nálevu

Podle vyhlášky 77/2003 Sb. je zrající sýr sýrem, u kterého po prokysání došlo k dalším biochemickým a fyzikálním procesům [2]. Jedná se o tradičně vyráběné sýry v oblasti Balkánu, jejichž rozdílné technologie jsou uzpůsobeny místním klimatickým podmínkám a stravovacím zvyklostem [3]. Vyrábí se v různých tvarech a velikostech, ale obvykle v kusech menších než 1kg. Sýry zrající v solném nálevu jsou čisté, mírně kyselé a slané chuti, mohou mít i ostrou pikantní příchut' [38]. Zrání probíhá při nízkých teplotách po určitý čas v solném nálevu o koncentraci 12 až 18 % za činnosti bakterií mléčného kvašení [39]. Jejich charakteristika vyplývá z intenzivního, kyselého mléčného kvašení v průběhu prvních dnů po výrobě. Tradičně se vyrábějí z plnotučného ovčího mléka, ale v současné době i z kozího nebo směsi kravského a ovčího mléka [3]. Právě použitím ovčího mléka získávají sýry svou typickou bílou barvu. Při výrobě se většina sýrů ukládá do uzavřených nádob, ale některé do nádob propustných pro plyny kde proběhnou biochemické změny během zrání. Mezi nejvýznamnějšího zástupce sýrů zrajících v solném nálevu, uznávané v mezinárodních trzích, patří sýry Feta a Domiati [38].

3.2.1 Technologie výroby sýru Feta

Sýr Feta je jedním z nejvýznamnějších sýrů vyráběných v Řecku. Vyrábí se z ovčího mléka nebo ze směsi ovčího a kozího mléka, které nesmí překročit 30 % jeho celkového objemu. Použití barviv, konzervačních látek a mléčných bílkovin při výrobě je zakázáno. Maximální sušina by měla být 44 %, minimální obsah tuku v sušině 43 % a doba zrání nejméně 60 dní. Technologie je založena na tradiční metodě popsanou Alichanidisem a Polychroniadou [40].



Obr. 8. Schéma technologie výroby sýru Feta [40]

II. PRAKTICKÁ ČÁST

4 CÍLE PRÁCE

Cílem bakalářské práce bylo posoudit dekarboxylázovou aktivitu mikroorganismů izolovaných v mléčném provozu:

- mikroorganismů ze stěrů v mlékárenských provozech,
- sýrů zrajících v solném nálevu,
- samotného solného nálevu

Decarboxylázová aktivita byla posouzena na základě produkce biogenních aminů metodou HPLC po derivatizaci pomocí dansylchloridu.

5 MATERIÁL A METODY STANOVENÍ

5.1 Příprava vzorků k analýze

Vzorky bakterií určené pro analýzu byly dodány z Výzkumného ústavu mlékárenského (VÚM) na Petriho miskách na příslušných živných půdách (CASO, GTK, BHI a MRS). Celkem bylo analyzováno 108 vzorků, a to 33 vzorků ze stěrů z výrobních prostor (jednalo se o stěry z tvarohárny: plachetky po vyprání v pračce, vnitřní stěny solné lázně, plastového podnosu pod sýry, nerezového stolu), 30 vzorků ze sýru Akawi a 45 vzorků ze solného nálevu (tabulky 6-8). Některé izolované mikroorganismy byly dodány, aniž by byly identifikovány (v tabulkách označeny ND).

Tabulka 5: Rozdělení identifikovaných mikroorganismů

Grampozitivní mikroorganismy	Gramnegativní mikroorganismy	Kvasinky
<i>Enterococcus faecalis</i>	koliformní bakterie	<i>Candida</i> sp.
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	<i>Aeromonas</i> sp	<i>Debaryomyces hansenii</i>
<i>Staphylococcus epidermidis</i>		
<i>Lactococcus lactis</i>	<i>Escherichia coli</i>	
<i>Bacillus</i> sp.	<i>Serratia marcescens</i>	
<i>Rothia amarae</i>	<i>Enterobacter</i> sp.	
<i>Kocuria</i> sp.	<i>Klebsiella oxytoca</i>	
<i>Micrococcus luteus</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	
<i>Staphylococcus equorum</i>		
<i>Rhodococcus erythropolis</i>		
<i>Staphylococcus</i> sp.		

Tabulka 6: Testované mikroorganismy izolované ze stěrů z výrobních prostor

č. vzorku	živné médium	zdroj	identifikace
101	CASO	stěr z výrobních prostor	koliformní bakterie
102	CASO	stěr z výrobních prostor	ND
103	CASO	stěr z výrobních prostor	<i>Enterococcus faecalis</i>
104	CASO	stěr z výrobních prostor	<i>Enterococcus faecalis</i>
105	CASO	stěr z výrobních prostor	<i>Aeromonas</i> sp.
106	CASO	stěr z výrobních prostor	koliformní bakterie
107	CASO	stěr z výrobních prostor	<i>Enterococcus faecalis</i>
108	CASO	stěr z výrobních prostor	ND
109	CASO	stěr z výrobních prostor	ND
110	CASO	stěr z výrobních prostor	<i>Escherichia coli</i>
111	CASO	stěr z výrobních prostor	G+ koky
112	CASO	stěr z výrobních prostor	<i>Escherichia coli</i>
113	CASO	stěr z výrobních prostor	<i>Bacillus cereus</i>
114	CASO	stěr z výrobních prostor	<i>Serratia marcescens</i>
115	CASO	stěr z výrobních prostor	ND
116	CASO	stěr z výrobních prostor	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>
117	CASO	stěr z výrobních prostor	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>
118	CASO	stěr z výrobních prostor	<i>Lactococcus lactis</i>
119	CASO	stěr z výrobních prostor	<i>Bacillus cereus</i>
120	CASO	stěr z výrobních prostor	ND
211	CASO	stěr z výrobních prostor	<i>Enterobacter</i> sp.
212	CASO	stěr z výrobních prostor	<i>Enterobacter</i> sp.
213	CASO	stěr z výrobních prostor	<i>Enterobacter</i> sp.
214	CASO	stěr z výrobních prostor	<i>Enterobacter</i> sp.
215	CASO	stěr z výrobních prostor	<i>Enterobacter</i> sp.
216	CASO	stěr z výrobních prostor	<i>Serratia marcescens</i>
217	CASO	stěr z výrobních prostor	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
218	CASO	stěr z výrobních prostor	<i>Serratia marcescens</i>
219	CASO	stěr z výrobních prostor	<i>Enterobacter</i> sp.
220	CASO	stěr z výrobních prostor	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
221	CASO	stěr z výrobních prostor	<i>Serratia marcescens</i>
222	CASO	stěr z výrobních prostor	<i>Escherichia coli</i>
223	CASO	stěr z výrobních prostor	<i>Escherichia coli</i>

Tabulka 7: Testované mikroorganizmy izolované ze sýrů Akawi

č. vzorku	živné médium	zdroj	identifikace
148	GTK	sýr - Akawi	ND
152	BHI- BROTH	sýr - Akawi	ND
153	BHI- BROTH	sýr - Akawi	ND
154	BHI- BROTH	sýr - Akawi	ND
155	BHI- BROTH	sýr - Akawi	ND
156	BHI- BROTH	sýr - Akawi	ND
157	BHI- BROTH	sýr - Akawi	Kvasinka
158	BHI- BROTH	sýr - Akawi	ND
159	BHI- BROTH	sýr - Akawi	ND
160	BHI- BROTH	sýr - Akawi	Kvasinka
161	BHI- BROTH	sýr - Akawi	Kvasinka
162	BHI- BROTH	sýr - Akawi	ND
163	BHI- BROTH	sýr - Akawi	ND
167	BHI- BROTH	sýr - Akawi	ND
168	BHI - BROTH	sýr - Akawi	ND
169	BHI - BROTH	sýr - Akawi	ND
170	BHI - BROTH	sýr - Akawi	ND
181	BHI-BROTH	sýr - Akawi	<i>Debaryomyces hansenii</i>
182	Nutrient broth	sýr - Akawi	<i>Candida lusitanae</i>
183	GTK	sýr - Akawi	ND
184	GTK	sýr - Akawi	<i>Bacillus</i> sp.
185	Nutrient broth	sýr - Akawi	ND
186	GTK	sýr - Akawi	<i>Bacillus</i> sp.
187	GTK	sýr - Akawi	<i>Bacillus licheniformis</i>
188	GTK	sýr - Akawi	<i>Bacillus</i> sp.
189	GTK	sýr - Akawi	ND
190	Nutrient broth	sýr - Akawi	<i>Candida</i> sp.
191	GTK	sýr - Akawi	<i>Bacillus</i> sp.
209	GTK	sýr - Akawi	<i>Klebsiella oxytoca</i>
210	GTK	sýr - Akawi	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>

Tabulka 8: Testované mikroorganismy izolované ze solného nálevu

č. vzorku	živné médium	zdroj	Identifikace
122	GTK	nálev	G- tyčinka
127	GTK	nálev	ND
128	GTK	nálev	ND
129	GTK	nálev	ND
130	GTK	nálev	G- tyčinka
131	GTK	nálev	<i>Rothia amarae</i>
132	GTK	nálev	ND
133	GTK	nálev	<i>Kocuria sp.</i>
135	GTK	nálev	<i>Staphylococcus warneri</i>
136	GTK	nálev	ND
137	GTK	nálev	ND
138	GTK	nálev	<i>Micrococcus luteus</i>
139	GTK	nálev	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
140	GTK	nálev	<i>Rhodococcus erythropolis</i>
141	GTK	nálev	ND
142	GTK	nálev	ND
143	GTK	nálev	ND
144	GTK	nálev	ND
145	GTK	nálev	ND
146	GTK	nálev	ND
147	GTK	nálev	ND
164	BHI- BROTH	nálev	ND
165	BHI- BROTH	nálev	ND
166	BHI- BROTH	nálev	ND
177	GTK	nálev	ND
178	BHI-BROTH	nálev	ND
179	GKCH	nálev	<i>Candida guilliermondii</i>
180	BHI-BROTH	nálev	<i>Staphylococcus hominis</i>
192	Nutrient broth	nálev	<i>Debaryomyces hansenii</i>
193	Nutrient broth	nálev	<i>Candida sp.</i>
194	Nutrient broth	nálev	<i>Debaryomyces hansenii</i>
195	Nutrient broth	nálev	ND
196	Nutrient broth	nálev	<i>Debaryomyces hansenii</i>
197	Nutrient broth	nálev	<i>Debaryomyces hansenii</i>
198	GTK	nálev	<i>Kocuria sp.</i>
199	GTK	nálev	<i>Staphylococcus sp.</i>
200	GTK	nálev	<i>Staphylococcus equorum</i>
201	Nutrient broth	nálev	<i>Debaryomyces hansenii</i>
202	GTK	nálev	ND
203	GTK	nálev	ND
204	BHI BROTH	nálev	ND
205	GTK	nálev	<i>Serratia marcescens</i>
206	GTK	nálev	<i>Serratia marcescens</i>
207	GTK	nálev	ND
208	BHI BROTH	nálev	<i>Staphylococcus hominis</i> subsp. <i>Novob.</i>

Před analýzou byly vzorky uchovány při chladírenské teplotě. Před vlastní analýzou byl každý izolát trojnásobně přeočkován do příslušného tekutého bujónu. Dekarboxylázová aktivita mikroorganismů se posuzovala pomocí přidaných aminokyselin, které posloužily jako prekurzory jednotlivých biogenních aminů. Aminokyseliny (lyzin, histidin, ornitin, tyrozin, arginin, fenylalanin) byly přidány do příslušných tekutých pūd (CASO broth, Nutrient broth, BHI broth a MRS broth) v koncentraci 2 g/l. Po následné kultivaci při 30 °C po dobu 48 hodin byly vzorky centrifugovány (4000 g; 22±1 °C; 20 minut) čímž byly připraveny pro následnou derivatizaci [41].

Získaný supernatant byl zředěn v poměru 1:1 s kyselinou chloristou (0,6 mol/l) a dvojnásobně derivatizován. Jako interní standard byl použit 1,7- heptandiamin (Sigma).

5.2 Použité přístroje, chemikálie, složení a příprava použitých živných médií

5.2.1 Přístroje

Chromatografické stanovení

- Laboratorní třepačka LT2, LABINA spol. s.r.o., Česká republika
- Odstředivka EBA 21 (Hettich)
- pH metr EUTECH INSTRUMENTS, Bio Tech, s.r.o., Česká republika
- termoblok BENCHMARK DIGITAL BLOCK, LABICOM, s.r.o., Česká republika
- systém HPLC (binární pumpa LabAlliance, autosampler LabAlliance, kolona s termostatem; UV/VIS DAD detektor ($\lambda = 254$ nm); a degaser 1260 Infinity, Agilent Technologies).

5.2.2 Chemikálie

- Standardy biogenních aminů: histamin, fenyletylamin, tyramin, putrescin, kadaverin, agmatin, spermidin, spermin (Sigma)
- Kyselina chloristá (Merck)
- Hydrogenuhličitan sodný (Merck)
- Uhličitan sodný bezvodý (Merck)
- Uhličitan draselný (Merck)
- Dansylchlorid (SIGMA – ALDRICH)
- L-Prolin (Merck)

- Heptan (SIGMA – ALDRICH)
- Acetonitril (SIGMA – ALDRICH)

5.2.3 Živná média

- CASO
 - Složení:
 - Kasein pepton 15g/l
 - Soja pepton 5g/l
 - NaCl 20g/l
 - AMK 2g/l

Postup přípravy:

Po navážení jednotlivých složek půdy byly přidány aminokyseliny lyzin, histidin, ornitin, tyrozin, arginin, fenylalanin (každá v koncentraci 0,2 % (w/v)). Jednotlivé složky byly rozpuštěny v 1000 ml destilované vody. Poté byla rozpuštěná směs dávkovačem o objemu 4,5 ml dávkována do zkumavek a sterilizována v termostatu při teplotě 121 °C po dobu 30 minut. U dalších půd byl použit stejný postup přípravy.

- GTK
 - Trypton 5g/l
 - Kvasničný extra 3g/l
 - Glukóza 1g/l
 - AMK 2g/l
- BHI Broth
 - BHI Broth 37g/l
 - AMK 2g/l
- Nutrient Broth
 - Nutrient Broth 25g/l
 - AMK 2g/l
- MRS
 - MRS 55g/l
 - AMK 2g/l

5.3 Postup derivatizace

Ze supernatantu (bujón smíchaný s kyselinou chloristou) byl odpipetován 1 ml do derivatizační nádobky. Nejprve byl přidán standard a následně byla směs zneutralizována přidáním čerstvého karbonátového pufru (pH = 11,1-11,2) v objemu 1,5 ml.

Ke směsi byl přidán čerstvě připravený dansylchlorid (5 g/l v acetonu) v objemu 2 ml a po uzavření derivatizační nádobky byly vzorky třepány po dobu 20 hodin v temnu. Derivatizace byla ukončena přidáním 200 μ l prolinu. Po uzavření derivatizačních nádobek byly vzorky opět třepány 1 hodinu. Vzniklý dansylderivát byl získán vytřepáním do 3 ml heptanu po dobu 3 minut. Nakonec byl 1 ml heptanové vrstvy odpipetován do vialky a odpařen do sucha při 60 °C pod proudem dusíku. Suchý odparek byl zředěn 1,5 ml acetonitrilu a do doby analýzy byl uchován při -18 °C. Bezprostředně před analýzou byly vzorky přefiltrovány přes stříkačkový filtr s porozitou 0,22 μ m [41].

5.4 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie HPLC

Princip chromatografického stanovení sestává z rozdělování složek směsi mezi mobilní a stacionární fázi. Chromatografie je jednak separační ale současně i analytická fyzikálně chemická metoda. Kvalitativním stanovením zjistíme, jaké látky jsou ve směsi obsaženy a kvalitativním v jaké koncentraci se ve směsi vyskytují. Před kvantitativní analýzou se nejdříve musí složky od sebe oddělit [42].

K monitoringu dekarboxylázové aktivity biogenních aminů byla použita metoda vysokoúčinné kapalinové chromatografie s UV detekcí po derivatizaci (HPLC). Jedná se o zařízení, které se skládá z binární pumpy/čerpádky, autosamplerů (automatického dávkovače spojeného se zásobníkem, kde jsou uloženy vialky), kolony a termostatu, UV/VIS DAD detektoru ($\lambda = 254$ nm) a odplyňovacího automatu (1260, Agilent Technologies, USA). Technologie, pro chromatografickou separaci – Agilent Eclipse Plus C18 (velikost částic 18 μ m), 5 cm x 3 mm x 50 mm, Agilent Technologies [41,43].

Derivatizované vzorky se po rozpouštění v mobilní fázi acetonitrilu, aplikovaly na kolonu. Na vyhodnocování byl použit software Clarity, který poskytuje grafické vyhodnocení ve tvaru píků. Eluce mobilní fáze probíhala při 30 °C a průtoku 0,45 ml/ min. Průběh eluce různě koncentrovaného acetonitrilu a časy jsou uvedené v tabulce 9.

Tabulka 9: Eluce mobilní fáze v průběhu času

čas [min]	10% ACN	100% ACN
0,0	39	61
0,1	39	61
1,4	30	70
3,5	17	83
4,0	0	100
9,5	0	100
11,5	39	61
15,5	39	61

6 VÝSLEDKY A DISKUZE

Dekarboxylázová aktivita mikroorganismů izolovaných z mlékárenského provozu (tabulky 10 - 11) byla posouzena na základě jejich produkce 8 biogenních aminů: tryptaminu (TR), fenyletylaminu (PHE), putrescinu (PU), kadaverinu (CA), histaminu (HI), tyraminu (TY), spermidinu (SD) a spermin (SM). Alespoň vždy u jednoho vzorku byl detekován jeden z biogenních aminů.

6.1.1 Produkce biogenních aminů u mikroorganismů izolovaných ze stěrů z výrobních prostor

Ze stěrů z výrobních prostor byly izolovány koliformní bakterie (včetně *Escherichia coli*, *Enterobacter* sp., *Klebsiella pneumoniae*), *Enterococcus faecalis*, *Aeromonas* sp., *Bacillus cereus*, *Serratia marcescens*, *Staphylococcus saprophyticus* *Lactococcus lactis* a 6 neidentifikovaných mikroorganismů, které byly dle VÚM zařazeny mezi Grampozitivní koky. Nejvíce produktivním kmenem byl *Enterococcus faecalis*, vzorek č. 103, který vyprodukoval $6,8 \pm 0,7$ mg/l tryptaminu, $24,1 \pm 1,4$ mg/l fenyletylaminu, $1016,6 \pm 6,6$ mg/l putrescinu, $164,9 \pm 7,2$ mg/l kadaverinu, $1,8 \pm 0,1$ mg/l histaminu, $1196,9 \pm 4,4$ mg/l tyraminu (tabulka 10). Produkce spermidinu a sperminu se neprokázala, jejich hladina byla pod prahem detekce HPLC. Nejméně produktivním kmenem byl mikroorganismus, který se nezdařilo identifikovat, vzorek č. 102, který vyprodukoval $1,5 \pm 0,1$ mg/l tryptaminu, $0,4 \pm 0,1$ mg/l fenyletylaminu, $1,5 \pm 1,1$ mg/l putrescinu a $10,3 \pm 0,3$ mg/l tyraminu. Kadaverin, histamin, spermidin a spermin nebyl detekován. Z hlediska sledování produkce jednotlivých biogenních aminů byl tyramin nejvíce produkován kmenem *Enterobacter* sp. (vzorek č. 212) v množství $20,1 \pm 1,3$ mg/l. Fenyletylamin byl nejvíce produkován kmenem *Enterococcus faecalis* (vzorek č. 107) v množství $34,5 \pm 1,8$ mg/l. Putrescin byl nejvíce produkován u *Enterobacter* sp. (vzorek č. 219) v množství $1131,5 \pm 0,3$ mg/l.

Kadaverinu nejvíce vyprodukovala *Klebsiella pneumoniae* (vzorek č. 220) v množství $1057,8 \pm 1,2$ mg/l. Nejvíce histaminu taktéž produkovala *Klebsiella pneumoniae* (vzorek č. 217) v množství $970,6 \pm 1,4$ mg/l. Blíže neurčená koliformní bakterie (vzorek č. 101) vyprodukovala nejvíce tyraminu v množství $970,6 \pm 1,4$ mg/l. Spermin nejvíce produkovala *Escherichia coli* v množství $11,3 \pm 0,7$ mg/l. Mikroorganismy ze stěrů z výrobních prostor nejvíce produkovaly kadaverin, histamin a tyramin. Spermidin v této skupině vzorků nebyl detekován (tabulka 10).

Tabulka 10: Produkce biogenních aminů (mg/l) u mikroorganismů izolovaných ze stěrů z výrobních prostor

č. vzorku	TR	PHE	PU	CA	HI	TY	SD	SM
101	ND	23,2±1,0	4,0±0,3	ND	ND	970,6±1,4	ND	2,1±0,2
102	1,5±0,1	0,4±0,1	1,5±1,1	ND	ND	10,3±0,3	ND	8,0±0,2
103	6,8±0,7	24,1±1,4	1016,6±6,6	164,9±7,2	1,8±0,1	1196,9±4,4	ND	ND
104	4,0±0,2	20,1±0,3	549,4±6,0	1,3±0,1	ND	1428,4±8,3	ND	ND
105	ND	1,3±0,0	23,1±1,8	93,8±4,3	2,4±0,2	11,2±0,9	ND	ND
106	4,3±0,3	2,6±0,2	563,1±5,6	223,6±9,9	3,3±0,3	5,7±0,4	ND	9,0±0,6
107	5,1±0,3	34,5±1,8	425,7±7,8	59,7±3,1	2,0±0,2	1378,9±8,6	ND	2,9±0,2
108	3,9±0,0	ND	523,6±4,2	531,2±6,9	3,4±0,2	8,6±0,2	ND	8,9±0,8
109	ND	ND	590,1±3,2	245,3±6,1	4,1±0,1	23,0±0,3	ND	7,2±0,5
110	ND	ND	388,4±3,5	66,4±2,8	5,0±0,3	11,3±0,8	ND	11,3±0,7
111	ND	8,6±0,6	ND	ND	ND	1085,9±9,0	ND	3,5±0,3
112	ND	ND	420,4±6,3	98,7±6,1	3,2±0,2	13,4±1,1	ND	5,6±0,4
113	ND	19,6±1,0	472,0±3,5	72,6±2,5	ND	706,6±45,8	ND	1,8±0,9
114	ND	7,6±0,6	399,8±3,8	84,7±5,3	1,8±0,0	545,1±1,4	ND	11,1±0,8
115	ND	19,3±0,8	4,1±0,4	1,6±0,1	1,6±0,1	749,8±2,9	ND	2,5±0,1
116	ND	16,3±1,5	354,9±6,7	32,9±1,5	ND	849,7±3,6	ND	ND
117	ND	34,0±0,1	2,0±0,1	ND	ND	908,4±4,5	ND	ND
118	ND	19,6±0,5	392,2±6,3	53,5±4,2	1,9±0,1	767,2±2,8	ND	1,1±0,1
119	ND	19,9±0,7	1,8±0,0	ND	1,4±0,1	842,5±8,2	ND	3,0±0,0
120	ND	23,3±1,5	2,2±0,2	ND	ND	805,6±0,9	ND	3,1±0,1
211	2,6±0,1	ND	1126,7±6,2	241,0±9,3	8,2±0,5	ND	ND	ND
212	20,1±1,3	1,8±1,3	1098,6±9,1	18,4±1,0	7,0±0,3	ND	ND	ND
213	5,6±0,4	ND	962,1±0,3	14,8±0,7	7,7±0,4	ND	ND	ND
214	5,2±0,1	1,3±0,0	1092,3±0,5	15,6±1,0	2,2±0,1	ND	ND	ND
215	7,7±0,4	3,1±0,0	6,9±0,6	1031,1±4,9	4,7±0,3	ND	ND	ND
216	9,5±0,3	ND	640,5±2,0	694,7±8,0	12,3±0,4	ND	ND	ND
217	ND	ND	12,5±0,4	889,9±8,0	970,6±1,4	89,1±2,3	ND	ND
218	8,6±0,6	1,2±0,0	530,6±8,4	647,0±8,6	10,9±0,5	ND	ND	ND
219	5,5±0,3	1,9±0,1	1131,5±0,3	21,1±0,6	5,6±0,4	10,3±0,1	ND	ND
220	ND	ND	12,1±0,1	1057,8±1,2	4,5±0,4	ND	ND	ND
221	3,1±0,0	ND	588,4±5,8	84,6±1,9	3,6±0,2	6,1±0,5	ND	ND
222	4,5±0,2	ND	582,3±8,3	289,4±9,1	13,1±0,4	ND	ND	ND
223	3,6±0,2	ND	623,8±6,0	225,1±9,5	12,1±0,8	1,2±0,0	ND	ND

ND - nedetekován: daný biogenní amin byl pod prahem detekce HPLC.

6.1.2 Produkce biogenních aminů mikroorganizmy izolovanými ze sýrů Akawi

Ve 30 vzorcích mikroorganizmů izolovaných ze sýrů Akawi se vyskytovala 6 x kvasinka (identifikovány byly pouze tři *Debaryomyces hansenii*, *Candida lusitanae*, *Candida* sp.), 5 x *Bacillus* sp., (z toho 1 x *Bacillus licheniformis*), 1 x *Klebsiella oxytoca*, 1 x *Staphylococcus saprophyticus*. Ostatních 17 vzorků nebylo dle VÚM identifikováno.

Tabulka 11: Produkce biogenních aminů (mg/l) mikroorganizmy izolovanými ze sýru

č. vzorku	TR	PHE	PU	CA	HI	TY	SD	SM
148	ND	ND	4,6±0,3	ND	ND	2,4±0,2	ND	ND
152	3,8±0,4	ND	9,4±0,9	1,3±0,3	1,8±0,1	9,5±0,3	ND	6,1±0,5
153	4,4±0,3	ND	7,9±0,5	1,6±0,1	1,3±0,1	12,3±1,1	ND	5,4±0,1
154	2,0±0,0	ND	6,6±0,3	1,4±0,1	ND	8,1±0,6	ND	9,3±0,8
155	2,4±0,2	ND	8,1±0,6	1,1±0,0	1,6±0,1	7,0±0,3	ND	7,6±0,3
156	4,7±0,4	ND	8,6±0,7	1,3±0,1	ND	8,0±0,7	ND	5,9±0,1
157	5,4±0,2	ND	8,0±0,4	2,0±0,1	1,2±0,1	6,9±0,0	ND	6,2±0,6
158	2,4±0,2	ND	7,0±0,5	1,4±0,1	1,5±0,1	6,7±0,2	ND	7,4±0,3
159	3,4±0,2	ND	7,9±0,5	1,5±0,1	1,5±0,1	7,6±0,4	ND	4,4±0,2
160	3,3±0,2	ND	8,0±0,2	1,8±0,1	1,8±0,0	8,2±0,7	ND	7,6±0,2
161	2,2±0,1	ND	3,5±0,2	1,1±0,1	1,4±0,1	6,4±0,4	ND	7,3±0,4
162	2,5±0,0	ND	3,4±0,1	1,3±0,0	1,3±0,1	6,3±0,4	ND	4,9±0,4
163	ND	ND	8,5±0,3	1,7±0,1	1,8±0,1	10,5±0,7	ND	ND
167	ND	1,4±0,1	13,7±0,9	2,4±0,2	1,7±0,1	9,1±0,6	ND	ND
168	ND	4,2±0,3	711,4±11,5	1,6±0,1	2,1±0,1	293,3±5,4	ND	ND
169	ND	ND	9,3±0,7	1,6±0,1	1,6±0,1	8,6±0,0	ND	ND
170	ND	ND	10,4±0,2	1,6±0,0	1,8±0,1	10,6±0,5	ND	ND
181	ND	ND	1,8±0,0	1,1±0,1	ND	3,1±0,1	ND	ND
182	ND	1,5±0,1	596,2±7,5	121,7±7,8	3,8±0,3	ND	ND	ND
183	ND	ND	3,7±0,2	ND	ND	ND	ND	ND
184	11,3±0,5	5,0±0,1	10,3±0,9	2,1±0,2	1,1±0,1	8,9±0,6	ND	ND
185	ND	1,4±0,1	11,8±0,8	ND	ND	1,4±0,0	1,6±0,1	ND
186	ND	5,5±0,2	5,4±0,2	2,0±0,1	ND	2,3±0,1	ND	ND
187	ND	4,4±0,4	5,1±0,3	1,6±0,0	1,1±0,1	1,5±0,1	ND	ND
188	ND	4,2±0,3	8,1±0,1	1,8±0,1	ND	7,3±0,3	ND	ND
189	14,2±0,6	1,8±0,2	4,8±0,2	12,9±1,0	1,0±0,1	ND	ND	22,3±1,2
190	ND	1,5±0,0	13,9±1,3	ND	ND	ND	1,3±0,1	ND
191	ND	4,8±0,4	4,9±0,3	2,1±0,2	ND	8,6±0,1	ND	ND
209	ND	588,7±8,8	9,0±0,8	261,5±4,8	2,5±0,1	1269,6±4,4	ND	ND
210	ND	ND	4,6±0,1	ND	ND	ND	ND	ND

ND - nedetekován: daný biogenní amin byl pod prahem detekce HPLC.

Nejvíce produktivním kmenem byla *Klebsiella oxytoca* (vzorek č. 209), která vyprodukovala 588,7±8,8 mg/l fenyletylaminu, 9,0±0,8 mg/l putrescinu, 261,5±4,8 mg/l kadaverinu, 2,5±0,1 mg/l histaminu, 1269,6±4,4 mg/l tyraminu. Tryptamin, spermidin a spermin nebyly detekovány (tabulka 11). Nejméně produktivním kmenem byl mikroorganismus, který se nezdařilo identifikovat (vzorek č. 183). Produkoval pouze 3,7±0,2 mg/l putrescinu, ostatní biogenní aminy nebyly u tohoto izolátu detekovány.

Z hlediska produkce jednotlivých biogenních aminů nejvíce tyraminu vyprodukoval taktéž neidentifikovaný mikroorganismus (vzorek č. 189) v množství 14,2±0,6 mg/l. Nejvíce fenyletylaminu produkovala *Klebsiella oxytoca* (vzorek č. 209) v množství 588,7±8,8 mg/l. Putrescin nejvíce produkoval mikroorganismu, který nebyl identifikován (vzorek č. 168) v množství 711,4±11,5 mg/l. Kadaverin byl nejvíce produkován opět vzorkem č. 209 (*Klebsiella oxytoca*), a to v množství 261,5±4,8 mg/l. Histamin byl nejvíce produkován taktéž vzorkem č. 209 a to v množství 2,5±0,1 mg/l, také tyramin v množství 1269,6±4,4 mg/l. Spermidin byl nejvíce produkován mikroorganizmem (vzorek č. 185), který nebyl identifikován v množství 1,6±0,1 mg/l, to samé spermin (vzorek č. 189) v množství 22,3±1,2 mg/l. Mikroorganismy ze solného sýru Akawi, celkově nejvíce produkovaly putrescin a tyramin (tabulka 11).

6.1.3 Produkce biogenních aminů mikroorganizmy izolovanými ze solných nálevů

Ve 45 vzorcích ze solného nálevu se vyskytovaly mikroorganizmy identifikované jako Gramnegativní tyčinky, 2 x *Serratia marcescens*, 1 *Rothia amarae*, 2 x *Kocura* sp., 6 x *Staphylococcus* sp. (*S. warneri*, *S. epidermidis*, *S. equorum*, *S. hominis*, *S. hominiss* subsp. *novobiosepticus*, *Staphylococcus* sp.), 1 *Microroccus luteus*, 1 *Rhodococcus erythropolis* a 7 x kvasinka (5 x *Debaryomyces hansenii*, 1 x *Candida guilliermondii*, 1 x *Candida* sp.), Zbývajících 23 mikroorganizmů se nezdařilo identifikovat.

Tabulka 12: Produkce biogenních aminů (mg/l) mikroorganismy izolovanými ze solného nálevu

č. vzorku	TR	PHE	PU	CA	HI	TY	SD	SM
122	ND	ND	10,7±1,0	314,1±7,1	3,0±0,2	3,8±0,4	ND	7,5±0,2
127	ND	ND	9,2±1,0	ND	ND	6,1±0,6	ND	7,2±0,1
128	ND	ND	18,8±1,3	2,9±0,2	ND	10,6±0,6	ND	6,1±0,4
129	2,3±0,0	1,3±0,1	31,4±2,0	3,3±0,3	ND	26,7±0,9	ND	5,2±0,4
130	2,2±1,3	0,7±0,2	29,8±10,6	630,8±47,5	3,8±1,0	8,9±0,8	0,9±1,8	3,4±1,1
131	ND	ND	11,0±0,5	3,4±0,3	ND	5,9±0,1	ND	1,9±0,1
132	ND	ND	20,3±0,7	2,3±0,1	ND	11,4±0,5	ND	3,7±0,3
133	1,3±0,0	ND	21,8±0,7	590,8±0,4	ND	22,2±2,0	ND	5,6±0,5
135	ND	ND	7,9±0,7	2,8±0,2	ND	2,3±0,2	ND	1,4±0,1
136	ND	ND	6,3±0,6	1,3±0,1	ND	4,7±0,1	ND	2,3±0,2
137	ND	1,4±0,0	16,1±0,8	1,7±0,1	ND	5,5±0,2	ND	ND
138	ND	ND	9,9±0,8	1,3±0,1	ND	5,1±0,1	ND	ND
139	ND	ND	10,3±0,8	1,1±0,1	2,4±0,2	3,7±0,2	ND	ND
140	ND	ND	12,4±0,4	1,4±0,1	ND	4,7±0,0	ND	ND
141	ND	1,1±0,1	19,5±0,7	1,5±0,1	ND	6,5±0,6	ND	ND
142	ND	ND	19,5±0,1	1,2±0,1	ND	3,7±0,1	ND	ND
143	ND	ND	14,7±0,7	2,2±0,2	ND	6,3±0,3	ND	ND
144	ND	ND	21,3±1,3	1,5±0,1	ND	4,2±0,2	ND	ND
145	ND	ND	7,4±0,7	502,7±8,7	3,1±0,3	1,4±0,0	ND	ND
146	ND	ND	17,2±1,3	539,5±9,5	2,7±0,3	5,2±0,5	ND	ND
147	ND	ND	7,1±0,7	3,2±0,1	ND	1,9±0,0	ND	ND
164	ND	26,4±1,0	15,8±1,2	1,6±0,1	57,0±2,1	4,8±0,5	ND	ND
165	ND	ND	9,3±0,7	1,6±0,1	1,6±0,1	11,4±0,5	ND	ND
166	ND	ND	10,8±0,6	1,6±0,2	1,7±0,1	9,9±0,8	ND	ND
177	ND	2,9±0,2	10,6±0,3	1,3±0,1	2,9±0,1	9,8±1,0	ND	ND
178	ND	ND	ND	1,2±0,1	ND	128,9±6,3	ND	ND
179	ND	1,2±0,1	528,8±3,0	63,9±5,4	2,3±0,1	ND	ND	ND
180	ND	4,7±0,4	5,3±0,5	ND	1,2±0,0	ND	ND	ND
192	3,9±0,2	1,8±0,2	15,0±0,7	1,9±0,1	ND	1,6±0,0	1,3±0,0	ND
193	1,1±0,1	652,4±3,6	3,6±0,2	1,4±0,8	ND	ND	1,1±0,1	ND
194	ND	1,1±0,1	13,0±1,1	ND	1,4±0,1	1,1±0,1	1,2±0,0	ND
195	ND	1,1±0,1	13,6±0,9	ND	1,4±0,1	1,2±0,1	1,2±0,0	ND
196	13,6±0,8	1,6±0,0	541,5±2,3	4,2±0,4	2,9±0,1	ND	ND	ND
197	7,7±0,4	1,7±0,1	861,2±73,0	36,3±3,6	4,6±0,4	6,9±0,1	ND	ND
198	6,8±0,7	2,6±0,2	13,0±0,7	2,3±0,1	3,6±0,3	8,8±0,7	ND	ND
199	ND	2,5±0,2	11,9±1,0	1,4±0,0	4,9±0,1	7,5±0,6	ND	ND
200	8,5±0,5	1,1±0,1	11,3±1,0	1,4±0,2	3,6±0,2	9,5±0,7	ND	ND
201	12,7±0,0	1,1±0,1	13,7±1,1	ND	ND	ND	1,1±0,1	ND
202	ND	2,7±0,2	11,0±0,7	1,7±0,1	3,2±0,2	10,6±0,8	ND	ND
203	ND	2,3±0,1	9,3±0,1	1,8±0,1	3,0±0,2	10,6±0,8	ND	ND
204	ND	ND	5,7±0,2	ND	ND	ND	ND	ND
205	ND	1,1±0,0	340,9±7,3	407,4±4,3	6,8±0,5	4,7±0,4	ND	ND
206	ND	1,2±0,0	557,3±7,9	109,7±9,3	3,6±0,2	6,1±0,3	ND	ND
207	ND	2,5±0,1	377,2±0,3	265,0±4,8	8,3±0,5	5,0±0,5	ND	ND
208	ND	3,7±0,1	5,1±0,5	2,6±0,1	2,8±0,0	13,6±1,2	ND	ND

ND - nedetekován: daný biogenní amin byl pod prahem detekce HPLC.

Nejvíce produktivním kmenem izolovaným ze solného nálevu byla kvasinka *Debaryomyces hansenii* (vzorek č. 197), který produkoval $7,7 \pm 0,4$ mg/l tryptaminu, $1,7 \pm 0,1$ mg/l fenyletylamin, $861,2 \pm 73,0$ mg/kg putrescinu, $36,3 \pm 3,6$ mg/l kadaverinu, $4,6 \pm 0,4$ mg/kg histaminu, $6,9 \pm 0,1$ mg/l tyraminu, produkce spermidinu a sperminu byla pod prahem detekce (tabulka 12). Nejméně produktivním kmenem byl vzorek, který se nezdařilo identifikovat (vzorek č. 147), který produkoval $7,1 \pm 0,7$ mg/l putrescinu, $3,2 \pm 0,1$ mg/l kadaverinu, $1,9 \pm 0,0$ mg/l tyraminu. Tryptamin, fenyletylamin, histamin, spermidin a spermin nebyly detekovány.

Nejvíce tryptaminu a fenyletylaminu produkovala kvasinka *Candida* sp. (vzorek č. 193) v množství $13,6 \pm 0,8$ mg/l (tryptamin) a $652,4 \pm 3,6$ mg/l (fenyletylamin). Putrescin nejvíce produkovala opět kvasinka *Debaryomyces hansenii* (vzorek č. 197) v množství $861,2 \pm 73,0$ mg/l. Kadaverin byl nejvíce produkován mikroorganizmem, o kterém víme, že patří mezi Gramnegativní tyčinky (vzorek č. 130), a to v množství $630,8 \pm 47,5$ mg/l. Histamin byl nejvíce produkován mikroorganizmem (vzorek č. 164), který se opět nezdařilo identifikovat a to v množství $57,0 \pm 2,1$ mg/l. Tyramin byl nejvíce produkován mikroorganizmem (vzorek č. 178), který se taktéž nezdařilo identifikovat a to v množství $128,9 \pm 6,3$ mg/l. Spermidin nejvíce produkovala kvasinka *Debaryomyces hansenii* (vzorek č. 192) v množství $1,3 \pm 0,0$ mg/l. Spermin byl nejvíce produkován mikroorganizmem (vzorek č. 122), o kterém víme, že patří mezi Gram negativní tyčinky, a to v množství $7,5 \pm 0,2$ mg/l. Mikroorganismy izolované ze solného nálevu nejvíce produkovaly putrescin a tyramin (tabulka 12).

6.1.4 Souhrnná diskuze

Na stanovení biogenních aminů v různých druzích sýrů byly již provedeny mnohé studie. Při přípravě fermentovaných potravin lze očekávat přítomnost mnoha druhů mikroorganismů, z nichž některé jsou schopny produkovat biogenní aminy. Většina produktů, ve kterých rostou bakterie mléčného kvašení, může obsahovat vyšší množství putrescinu, kadaverinu, histaminu a tyraminu. Sýry jsou (hned po rybách) nejčastější potraviny spojené s otravou histaminem.

Mnohé mikroorganismy jako jsou např. zástupci rodů *Bacillus*, *Citrobacter*, *Clostridium*, *Klebsiella*, *Escherichia*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Shigella*, *Photobacterium* a mléčné mikroorganismy *Lactobacillus*, *Pediococcus* a *Streptococcus* jsou schopné dekarboxylovat jednu či více aminokyselin [44].

Zkoumané vzorky mikroorganismů byly rozděleny do tří kategorií (Gramnegativní bakterie, Grampozitivní bakterie a kvasinky). Z enterobakterií byla produkce biogenních aminů zkoumána u *Escherichia coli*, *Serratia marcescens*, *Enterobacter* sp., *Klebsiella oxytoca*. Tyto mikroorganismy a také *Aeromonas* sp., řadíme mezi Gramnegativní bakterie. Převážně se vyskytovaly ve vzorcích ze stěrů z výrobních prostor mlékárenského provozu a nejvíce produkovaly putrescin a kadaverin. Gramnegativní bakterie jsou v sýru považovány za mikroorganismy způsobující kažení sýrů, zodpovědné za vady textury a chuti. Hlavně vysoké počty enterobakterií jsou považovány za indikátory špatné hygieny při dojení nebo při samotné technologii výroby sýru a jedním z aspektů je právě schopnost tvorby biogenních aminů [45].

Další mikroorganismy jako jsou *Enterococcus faecalis*, *Bacillus* spp., *Staphylococcus* spp., *Lactococcus lactis*, *Rothia amarae*, *Kocuria* sp., *Micrococcus luteus*, *Rhodococcus erythropolis* řadíme mezi Grampozitivní bakterie. Tyto bakterie byly izolovány ze sýrů, nálevu i ze stěrů z mlékárenského provozu téměř rovnoměrně a nejvíce produkovaly biogenní aminy tyramin a putrescin.

Zbývající část identifikovaných testovaných mikroorganismů byla zařazena mezi kvasinky (převážně *Debaryomyces hansenii*, *Candida* spp.), které se vyskytovaly ve vzorcích sýru a solného nálevu. Nejvíce produkovaly biogenní aminy putrescin a kadaverin. V tomto experimentu bylo dokázáno, že mikroorganismy vykazující největší dekarboxylázovou aktivitu jsou Gramnegativní bakterie. Z testovaných Gramnegativních bakterií alespoň 1 izolovaný kmen produkoval minimálně 1 biogenní amin. Podle studie Ten Brink a kol. [46] a Pircher a kol. [47] Gramnegativní bakterie jako *Escherichia coli*, *Serratia marcescens* a *Klebsiella pneumoniae* produkují hlavně histamin a zástupci čeledi *Enterobacteriaceae* tvoří převážně putrescin a kadaverin. Publikované výsledky jsou tedy v souladu s výsledky této studie, protože mezi mikroorganismy, které nejvíce produkovaly putrescin a kadaverin, byly zařazeny právě enterobakterie *Escherichia coli*, *Serratia marcescens*, zatímco histamin byl u těchto izolátů produkován v poměrně nízkých hodnotách.

O něco méně produktivní byly Grampozitivní bakterie s největší produkcí tyraminu kmenem *Enterococcus* sp (vzorek č. 104). Produkce spermidinu nebyla detekována u žádné Grampozitivní bakterie. Ke stejným výsledkům dospěli ve své studii i Joosten a Northolt [48], kdy se přítomnost enterokoků v mléce ve vysokém množství následně projevila v sýrech produkcí velkého množství tyraminu. Mezi mikroorganismy s nejmenší dekarboxylázovou aktivitou lze zařadit kvasinky. V této práci bylo zjištěno, že kvasinky mají potenciál k poměrně vysoké produkci putrescinu, což bylo prokázáno i studií Gardini a kol. [49], kdy bylo potvrzeno, že kvasinky mají velký potenciál tvořit alifatické aminy (putrescin a kadaverin).

ZÁVĚR

Mléčné výrobky, zejména sýry, mohou obsahovat velké množství biogenních aminů. Cílem této bakalářské práce bylo zhodnotit dekarboxylázovou aktivitu mikroorganismů izolovaných z mlékárenského provozu, kde se rovněž vyrábí i sýry zrající v solném nálevu. Aby mohla být dekarboxylázová aktivita jednotlivých izolátů posouzena, byly při kultivaci mikroorganismů do živného média přidány prekurzory pro vznik biogenních aminů (aminokyseliny lyzin, histidin, ornitin, tyrozin, arginin, fenylalanin). Vyhodnocení bylo provedeno pomocí metody HPLC s UV detektorem. Celkem byla hodnocena produkce 8 biogenních aminů u 108 vzorků, z toho 33 vzorků ze stěrů z výrobních prostor, 30 vzorků ze sýru Akawi a 45 vzorků ze solného nálevu. U každého z testovaných vzorků byl detekován jeden z biogenních aminů, takže dekarboxylázová aktivita byla prokázána u každého mikroorganismu.

Na základě Chromatografického stanovení bylo zjištěno:

- Nejvíce byly produkovány biogenní aminy kadaverin, putrescin a tyramin
- Dekarboxylázová aktivita byla prokázána u všech izolovaných mikroorganismů
- Každý mikroorganismus produkoval alespoň jeden z 8 biogenních aminů
- Nejvyšší dekarboxylázovou aktivitu vykazovaly Gramnegativní bakterie
- Nejčastější se vyskytující Gramnegativní bakterie *Serratia marcescens*, *Enterobacter* sp. a *Escherichia coli* produkovaly nejvíce putrescin a kadaverin
- Nejčastější Grampozitivní bakterie *Enterococcus faecalis*, *Bacillus cereus* a *Staphylococcus* sp. produkovaly nejvíce tyramin
- Žádná z izolovaných Grampozitivních bakterií neprodukovala spermidin
- Kvasinky vykazovaly nejmenší dekarboxylázovou aktivitu

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] Agroweb: *Mléko a klasické mléčné krmné směsi* [online]. [cit. 10-04-2013]. Dostupný z WWW: http://www.agroweb.cz/Mleko-a-klasicke-mlecne-krmne-smesi_s251x31603.h.
- [2] Vyhláška 77/2003 Sb.: *Mléko a mléčné výrobky* [online]. [cit. 10-04-2013]. Dostupný z WWW: <http://vfu-www.vfu.cz/vetleg/CD/predpisy/Potraviny/77-2003.htm>.
- [3] TAMINE A. Y., *Brined Cheeses, Society of dairy technology*. Blackwell, c2006, ISBN-10: 1-4051-2460-1.
- [4] FERNANDES R., *Dairy Products*. Cambridge, Leatherhead Publishing, c2009, xiii, 173 s. ISBN 978-1-9052-2462-3.
- [5] SMIT G., *Dairy Processing – Improving Quality*. Woodhead publishing, c2003, 536 s. ISBN 978-1-85573-676-4.
- [6] Agropress: *Mléko* [online]. [cit. 10-04-2013]. Dostupný z WWW: <http://www.agropress.cz/mleko.php>.
- [7] BARRY A. L., TAMINE A. Y., *Technology of cheesmaking, Society of Dairy*. 2nd ed., Blackwell, c2010, ISBN 978-1-4051-8298-0.
- [8] JAY J. M., LOESSNER A. D., *Modern food microbiology*. Springer science, c2005, ISBN 0-387-23180-3.
- [9] FARNWORTH E. R., *Handbook of fermented functional foods*. 2nd ed. Boca Raton: CRC Press, c2008, xviii, 581 s. ISBN 978-1-4200-5326-5.
- [10] GÖRNER F., VALÍK L., *Aplikovaná mikrobiológia požívatin: princípy mikrobiológie požívatin, potravinársky významné mikroorganizmy a ich skupiny, mikrobiológia potravinárskych výrob, ochorenia mikrobiálneho povodu, ktorých*

zárodky sú prenášané požívatinami. 1. vyd. Bratislava: Malé centrum, 2004, 528 s. ISBN 8096706497.

- [11] STILES M. E., HOLZAPFEL W. H., *Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy*. International Journal of Food Microbiology, 1997, 36: 1-29.
- [12] DUNNE C., MURPHY L., FLYNN S., O'MAHONY L., O'HALLORAN S., FEENEY M., MORRISSEY D., THORNTON G., FITZGERALD G., DALY C., KIELY B., QUIGLEY E. M., O'SULLIVAN G. C., SHANAHAN F., COLLINS J. K., *Probiotics: from myth to reality. Demonstration of functionality in animal models of disease and in human clinical trials*. Antonie Van Leeuwenhoek, 1999, 76: 279-292.
- [13] KHEDID K., FAID M., MOKHTARI A., SOULAYMANI A., ZINEDINE A., *Characterization of lactic acid bacteria isolated from the one humped camel milk produced in Morocco*. Science Direct, 2009, 81-91.
- [14] ESMERAY K., ÖZOGUL F., ÖZOGUL Y., AKYOL I., *The function of lactic acid bacteria and brine solutions on biogenic amine formation by foodborne pathogens in trout Fillem*. Food Chemistry, 2011, 129: 1211-1216.
- [15] FERNANDÉZ M., ZÚÑIGA M., *Amino Acid Catabolic Pathways of Lactic Acid Bacteria*. Critical Reviews in Microbiology, 2006, 32: 155-183.
- [16] VOKURKA M., HUGO J., *Velký lékařský slovník*. 9., aktualiz. vyd. Praha: Maxdorf, c2009, xv, 1159 s. ISBN 978-80-7345-202-5.
- [17] ČERVINKA O., *Chemie organických sloučenin*. 1. vyd. Praha: SNTL - Nakladatelství technické literatury, 1985, 1136 s.
- [18] MCMURRY J., *Organická chemie*. Vyd. 1. V Brně: VUTIUM, 2007, xxv, 1176, 61, 31 s. ISBN 978-80-214-3291-8.

- [19] DAVÍDEK J., JANÍČEK G., POKORNÝ J., *Chemie potravin*. Vyd. 1. Praha: SNTL, 1983, 629 s.
- [20] PEREIRA V., PONTES M., CAMARA J. S., & MARQUES, J. C., *Simultaneous analysis of free amino acids and biogenic amines in honey and wine samples using in look orthophthalaldehyde derivatization procedure*, *Journal of Chromatography A*, 2008, 435-443.
- [21] LINARES D. M., MARTÍN M., LADERO V., ALVAREZ A. M. & FERNANDEZ M., *Biogenic Amines in Dairy Products*, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2011, 51: (7): 691-703.
- [22] LORENZO J. M., MARTINEZ S., FRANCO I., CARBALLO J., *Biogenic amine content during the manufacture of dry-cured lacón, a Spanish traditional meat product: Effect of some additives*. *Meat Science*, 2007, 77 (2): 28-93.
- [23] GREIF G., GREIFOVÁ M., DVORAN J., KAROVIČOVÁ J., BUCHTOVÁ V., *Štúdium rastu a produkcie biogenných amínov niektorými mikroorganizmami za modelových podmienok*. *Czech Journal of Food Science*, 1999, 17: 15-21.
- [24] NAILA A., FLINT S., FLETCHER G., BREMER P., MEERDINK G., *Control of Biogenic Amines in Food - Existing and Emerging Approaches*. *Journal of Food Science*, 2010, 75 (7): 139-150.
- [25] KALAČ P., KRAUSOVÁ P., *A review of dietary polyamines: Formation, implications for growth and health and occurrence in foods*. *Food Chemistry*, 2005, 90: 219-230.
- [26] MEDINA M. Á., URDIALES J. L., RODRÍGUES-CASO C., RAMÍREZ F. J., SÁNCHEZ-JIMÉNEZ F., *Biogenic Amines and Polyamines: Similar Biochemistry for Different Physiological Missions and Biomedical Applications*. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 2003, 38 (1): 23-59.

- [27] LADERO V., FERNANDEZ M., ALVAREZ A. M., *Effect of post-ripening processing on the histamine and histamine-producing bacteria contents of different cheeses*. International Dairy Journal, 2009, 19, 759-762.
- [28] BODMER S., IMARK C., KNEUBÜHL M., *Biogenic amines in foods: histamine and food processing.*, 1994, 48: 296-300.
- [29] JAE-HUNG M., YOUNG J., K., HAN-YOON H., *Inhibitory effects of garlic and other spices on biogenic amine production in Myeolchi-jeot, Korean salted and fermented anchovy product*. Food control, 2009, 20: 449-454.
- [30] JAE-HUNG M., HAN-YOON H., *Inhibition of biogenic amine formation in a salted and fermented anchovy by Staphylococcus xylosus as a protective culture*. 2009, 20: 796-801
- [31] PREMONT R. T., GAINETGINOV R. R., CARON M. G., *Following the trace of elusive amines*. Proceedings of the National Academy of Science U S A, 2001, 98: 9474-9475.
- [32] NELSON D. L., COX M. M., LEHNINGER A. R., *Lehninger principles of biochemistry*. 5th ed. New York: W. H. Freeman, 2008, xxix, 1158 s. ISBN 978-0-7167-7108-1.
- [33] SOLOMONS T., FRYHLE C. B., *Organic chemistry*. 8th ed. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, c2004, 1 sv. (různé stránkování). ISBN 0471417998.
- [34] GREIF G., GREIFOVÁ M., KAROVIČOVÁ J., *Cadaverine and amonia production by some bacteria under model conditions*. Czech Journal of Food Science, 1998, 16: 53-56
- [35] MOLENAAR D., BOSSCHER J. S., BRINK B. T., DRIESSEN A. J. M., KONINGS W. N., *Generation of a proton motive force by, histidine*

- decarboxylation and electrogenic histidine/histamine antiport in Lactobacillus buchneri*. Journal Bacteriology, 1993, 175 (10): 2864-2870.
- [36] BEARSON S., BEARSON B., FOSTER J., *Acid stress responses in enterobacteria*. FEMS Microbiology Letters, 1997, 147 (2): 173-180.
- [37] SUZZI G., GARDINI F., *Biogenic amines in dry fermented sausages. A review* International Journal of Food Microbiology, 2003, 88: 41-54.
- [38] FOX P. F., MCSWEENEY P. L. H., COGAN M. T., GUINEE P. T., *Cheese Chemistry, Physics and Microbiology*. c2004, volume 1 ISBN 0-1226-3652-X.
- [39] HAYALOGLU A. A., OZER B. H., FOX P. F., *Cheeses of Turkey: 2. Varieties ripened under brine*. Dairy Science and Technology, 2008, 88: 225-244.
- [40] MOATSOU G., GOVARIS A., *White brined cheeses: A diachronic exploitation of small ruminants*. Small Ruminant Research, 2011, 101: 113-121.
- [41] DADÁKOVÁ E., KŇÍŽEK P., PELIKÁNOVÁ, T.: *Determinaton oí biogenic amines in Íoods using ultra performance liquid chromatogramy (UPLC)*. Food Chen, 2009, 116: 365-370.
- [42] Chromatografie: *Chromatografie* [online]. [cit. 08-04-2013]. Dostupný z WWW: http://old.lf3.cuni.cz/chemie/cesky/materialy_B/chromatografie.doc.
- [43] SMĚLÁ D., PECHOVÁ P., KOMPRDA T., KLEJDUS B., KUBÁŇ V.: *Chromatographic determination of biogenic amines in dry salamiduring the fermentation and storage* (in Czech). Chem Paper, 2004, 98: 432-437.
- [44] SILLA SANTOS H. M., *Biogenic amines: their importace in foods*. Food Microbiology, 1996, 29: 213-231.

- [45] DELBÉS-PAUS C., POCHET S., HELINCK S., VEISSEIRE P., BORD C., LEBECQUE A., COTON M., DESMASURES N., COTON E., IRLINGER F., MONTEL M. C., *Impact of Gramnegative bacteria in interaction with a complex microbial consortium on biogenic amine content and sensory characteristics of an uncooked pressed cheese*. Food Microbiology, 2012, 30: 74-82.
- [46] BRINK B. T., DAMINK C., JOOSTEN H. M. L. J., HUIS IN'T VELD J. H. J., *Occurrence and formation of biologically active amines in foods*. International Journal of Food Microbiology, 1990, 11: 73-84.
- [47] PIRCHER A., BAUER F., PAULSEN P., *Formation of cadaverine, histamine, putrescine and tyramine, by bacteria isolated from meat, fermented sausages and cheeses*. European Food Reserch and Technology, 2007, 226: 225-231.
- [48] JOOSTEN H. M. L. J., NORHOLT M. D., *Conditions allowing the formation of biogenic amines in cheese 2. Decarboxylative properties of some non starter bacteria*. Netherlands Milk and Dairy Journal, 1987, 41: 259-280.
- [49] GARDINI F., TOFALO R., BELLETI N., IUCCI L., SUZII G., TORRIANY S., GUERZONI M. E., LANCIOTTI R. *Characterization of yeasts involved in the ripening of Pecorino Crotonese cheese*. Food Microbiology, 2006, 23: 641-648.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

BHI broth	Brain heart infusion, mozkosrdcová infúze
CA	Kadaverin
CASO	Agar s kaseinem a sojovým extraktem
CO ₂	Oxid uhličitý
DAD	Detektor diodového pole
GTK	Agar s glukózou, kvasničným extraktem a tryptonem
HI	Histamin
HPLC	Vysokoučinná kapalinová chromatografie
MRS	De Man Rogosa Sharpe agar
Nutrient broth	Živný bujón
PHE	Fenyletylamin
PU	Putrescin
SD	Spermidin
SM	Spermin
TR	Tryptamin
TY	Tyramin
UV	Ultrafialové záření
VIS	Oblast viditelného světla
VÚM	Výzkumný ústav mlékárenský

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1. Vazebné úhly aminu [17]	19
Obr. 2. Neionizovaná aminokyselina [19]	21
Obr. 3. Vnitřní sůl aminokyseliny [19]	21
Obr. č. 4: Vzorce biogenních aminů [26]	23
Obr. 5. Dekarboxylace diaminokyselin [10]	25
Obr. 6. Dekarboxylace aromatických aminokyselin [10]	25
Obr. 7. Metabolické cesty aminů a polyaminů u savců [26]	26
Obr. 8. Schéma technologie výroby sýru Feta [40]	30

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Chemické složení mléka (g/100g) z odlišných druhů savců [3].....	12
Tabulka 2: Homofermentativní bakterie mléčného kvašení [5]	17
Tabulka 3: Heterofermentativní bakterie mléčného kvašení [5]	18
Tabulka 4: Rozdělení sýrů [10]	28
Tabulka 5: Rozdělení identifikovaných mikroorganismů	33
Tabulka 6: Testované mikroorganismy izolované ze stěrů z výrobních prostor.....	34
Tabulka 7: Testované mikroorganismy izolované ze sýrů Akawi	35
Tabulka 8: Testované mikroorganismy izolované ze solného nálevu.....	36
Tabulka 9: Eluce mobilní fáze v průběhu času.....	40
Tabulka 10: Produkce biogenních aminů (mg/l) u mikroorganismů izolovaných ze stěrů z výrobních prostor.....	42
Tabulka 11: Produkce biogenních aminů (mg/l) mikroorganismy izolovanými ze sýru	43
Tabulka 12: Produkce biogenních aminů (mg/l) mikroorganismy izolovanými ze solného nálevu.....	45