

# **Možnosti snížení obsahu biogenních aminů během zrání sýrů použitím protektivní kultury**

Bc. Barbora Řezníčková

---

Diplomová práce  
2019



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická

---

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav technologie potravin

akademický rok: 2018/2019

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Barbora Řezníčková**  
Osobní číslo: **T17242**  
Studijní program: **N2901 Chemie a technologie potravin**  
Studijní obor: **Technologie potravin**  
Forma studia: **prezenční**

Téma práce: **Možnosti snížení obsahu biogenních aminů během zrání sýrů  
použitím protektivní kultury**

Zásady pro vypracování:

### I. Teoretická část

1. Charakterizujte význam biogenních aminů, zaměřte se na negativní dopady na lidské zdraví.
2. Charakterizujte nejběžnější producenty biogenních aminů v přírodních sýrech, popište cesty kontaminace či výskytu v mléčných výrobcích.
3. Charakterizujte možnosti použití ochranných opatření pro zlepšení kvality mléčných výrobků, podrobněji se zaměřte na výrobu přírodních sýrů.

### II. Praktická část

1. Vytvořte modelové vzorky sýrů s vybranými kmeny producentů a degradérů biogenních aminů.
2. V rámci skladovacího experimentu sledujte vybrané vlastnosti modelových sýrů.
3. Porovnejte obsah biogenních aminů v modelových šaržích v průběhu zrání.
4. Vyhodnoťte výsledky, diskutujte je s literaturou a vyvoďte závěry.

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

[1] DONNELLY, C. 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, D. M., DEL RÍO, B., LADERO, V., MARTÍNEZ, N., FERNÁNDEZ, M., MARTÍN, M. C., ÁLVAREZ, M. A. **Factors Influencing Biogenic Amines Accumulation in Dairy Products**, 2012. *Frontiers in Microbiology*.

[4] ZULJAN, F. A., MORTERA, P., ALARCÓN, S. H., BLANCATO, V. S., ESPARIZ, M., MAGNI, CH. **Lactic acid bacteria decarboxylation reactions in cheese**, 2016. *International Dairy Journal*. 62, 53-62.

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

Datum zadání diplomové práce: **2. února 2019**

Termín odevzdání diplomové práce: **3. května 2019**

Ve Zlíně dne 2. února 2019

L.S.

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

doc. Ing. Jiří Mižek, Ph.D.  
*ředitel ústavu*

Příjmení a jméno: .....

Obor: .....

## PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

- beru na vědomí, že odevzdáním diplomové/bakalářské práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, bez ohledu na výsledek obhajoby <sup>1)</sup>;
- beru na vědomí, že diplomová/bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému dostupná k nahlédnutí, že jeden výtisk diplomové/bakalářské práce bude uložen na příslušném ústavu Fakulty technologické UTB ve Zlíně a jeden výtisk bude uložen u vedoucího práce;
- byl/a jsem seznámen/a s tím, že na moji diplomovou/bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3 <sup>2)</sup>;
- beru na vědomí, že podle § 60 <sup>3)</sup> odst. 1 autorského zákona má UTB ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- beru na vědomí, že podle § 60 <sup>3)</sup> odst. 2 a 3 mohu užít své dílo – diplomovou/bakalářskou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- beru na vědomí, že pokud bylo k vypracování diplomové/bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tedy pouze k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové/bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- beru na vědomí, že pokud je výstupem diplomové/bakalářské práce jakýkoliv softwarový produkt, považují se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Ve Zlíně .....

.....

<sup>1)</sup> 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 nevdělečně 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.

<sup>2)</sup> 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, užíje-li nikoli za účelem přímého nebo nepřímého hospodářského nebo obchodního prospěchu k výuce nebo k vlastní potřebě dílo vytvořené žákem nebo studentem ke splnění školních nebo studijních povinností vyplývajících z jeho právního vztahu ke škole nebo školskému či vzdělávacímu zařízení (školní dílo).

<sup>3)</sup> 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). Odporčí-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 užit 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 výdělků 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 přihlídá k větší výdělků dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

## ABSTRAKT

Cílem práce bylo sledovat současný vliv dekarboxyláza-pozitivního kmene *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 946 a degradujících kmenů mikroorganismů na obsah biogenních aminů v modelových vzorcích přírodních sýrů v průběhu 84 dní zrání. Ke zkoumání degradace biogenních aminů byl zvolen kmen *Lactobacillus casei* CCDM 422, *Lactobacillus plantarum* CCDM 187, *Lactobacillus plantarum* CCDM 198 a *Lactobacillus casei* CCDM 198. U modelových vzorků byl v průběhu zrání sledován vývoj mikroorganismů pomocí kultivačního vyšetření, dále byla prováděna chemická a texturní analýza. Během experimentu byly u modelových vzorků zjištěny vysoké koncentrace biogenních aminů, čemuž pravděpodobně přispěly i non-startérové mikroorganismy. *Lactobacillus casei* CCDM 198 byl prokázán jako nejúčinnější kmen pro výrazné snížení obsahu histaminu, putrescinu, kadaverinu a fenylethylaminu.

Klíčová slova: protektivní kultura, biogenní aminy, sýry holandského typu

## ABSTRACT

The aim of the study was to observe the current effect of decarboxylase-positive strain *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 946 and degrading strains of microorganisms to content of biogenic amines in model samples during 84 days ripening. The strain *Lactobacillus casei* CCDM 422, *Lactobacillus plantarum* CCDM 187, *Lactobacillus plantarum* CCDM 198 and *Lactobacillus casei* CCDM 198 was chosen to examine biogenic amines degradation. Microflora of cheese, textural analysis and chemical analysis was observed during ripening. High concentrations of biogenic amines were found in the model samples, which non-starter microorganisms probably contributed to. The results show that the *Lactobacillus casei* CCDM 198 is the most potent strain to significantly reduce histamine, putrescine, cadaverine, and phenylethylamine.

Keywords: protective culture, biogenic amines, Dutch-type cheeses

Mé upřímné poděkování patří vedoucí diplomové práce doc. Ing. Vendule Pachlové, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady, vstřícný přístup, čas a za pomoc, kterou mi v průběhu celého zpracování věnovala.

Dále bych ráda poděkovala Ing. et Ing. Ludmile Zálešákové, Ing. Olze Vlčkové a Bc. Veronice Kučabové za ochotu a pomoc při práci v laboratořích. Poděkování patří také Mgr. Richardovi Adámkovi za spolupráci při získávání údajů pro praktickou část diplomové práce.

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

# OBSAH

ÚVOD.....	10
<b>I TEORETICKÁ ČÁST.....</b>	<b>11</b>
<b>1 PŘÍRODNÍ SÝRY .....</b>	<b>12</b>
1.1 HISTORIE VÝROBY SÝRŮ .....	12
1.2 DĚLENÍ PŘÍRODNÍCH SÝRŮ .....	12
1.3 TECHNOLOGIE VÝROBY SÝRŮ S NÍZKODOHŘÍVANOU SÝŘENINOU.....	14
1.3.1 Výběr mléka jako suroviny pro výrobu sýrů.....	14
1.3.2 Úprava mléka .....	15
1.3.3 Startérové kultury .....	15
1.3.4 Non – startérové mikroorganismy.....	16
1.3.5 Protektivní kultury .....	18
1.3.6 Srážení mléka a zpracování sýřeniny .....	19
1.3.7 Zrání sýrů .....	21
<b>2 BIOGENNÍ AMINY.....</b>	<b>23</b>
2.1 VZNIK BIOGENNÍCH AMINŮ .....	23
2.2 ROZDĚLENÍ BIOGENNÍCH AMINŮ.....	24
2.3 VÝZNAM BIOGENNÍCH AMINŮ .....	24
2.3.1 Pozitivní vliv na zdraví .....	24
2.3.2 Toxicita nejdůležitějších biogenních aminů.....	25
2.3.3 Vliv biogenních aminů na hygienu potravin.....	25
2.3.4 Biogenní aminy jako indikátory kvality potravin .....	26
2.4 DEGRADACE BIOGENNÍCH AMINŮ.....	27
2.5 NEJBĚŽNĚJŠÍ PRODUCENTI BIOGENNÍCH AMINŮ V SÝRECH .....	28
2.6 BIOGENNÍ AMINY V SÝRECH ZE SYROVÉHO MLÉKA .....	29
<b>3 MOŽNOSTI POUŽITÍ OCHRANNÝCH OPATŘENÍ PRO ZAJIŠTĚNÍ KVALITY SÝRŮ .....</b>	<b>30</b>
3.1 HLAVNÍ POŽADAVKY NA KVALITU A BEZPEČNOST MLÉKA .....	30
3.2 ZLEPŠENÍ BEZPEČNOSTI A KVALITY MLÉKA A SÝRŮ.....	31
3.2.1 Správná výrobní a hygienická praxe .....	31
3.2.2 Možné způsoby zajištění bezpečnosti sýrů pomocí přírodních látek.....	32
3.2.3 Možné budoucí trendy v udržení bezpečnosti sýrů.....	33
<b>II PRAKTICKÁ ČÁST .....</b>	<b>35</b>
<b>4 METODIKA .....</b>	<b>36</b>
4.1 VÝROBA MODELOVÝCH VZORKŮ.....	36
4.1.1 Materiál a pomůcky.....	36
4.1.2 Postup výroby modelových vzorků.....	37
4.2 ZÁKLADNÍ CHEMICKÁ ANALÝZA .....	38
4.2.1 Stanovení obsahu sušiny .....	38
4.2.2 Stanovení obsahu tuku .....	38



4.2.3	Stanovení pH .....	39
4.2.4	Stanovení obsahu soli .....	39
4.3	TEXTURNÍ PROFILOVÁ ANALÝZA .....	39
4.4	MIKROBIOLOGICKÝ ROZBOR .....	39
4.5	STANOVENÍ OBSAHU BIOGENNÍCH AMINŮ .....	40
<b>5</b>	<b>VÝSLEDKY A DISKUZE .....</b>	<b>42</b>
5.1	ZÁKLADNÍ CHEMICKÁ ANALÝZA .....	42
5.1.1	Stanovení obsahu sušiny .....	42
5.1.2	Stanovení obsahu tuku .....	43
5.1.3	Stanovení pH .....	44
5.1.4	Stanovení soli .....	45
5.2	TEXTURNÍ PROFILOVÁ ANALÝZA .....	46
5.3	MIKROBIOLOGICKÝ ROZBOR .....	49
5.4	STANOVENÍ OBSAHU BIOGENNÍCH AMINŮ .....	54
	<b>ZÁVĚR .....</b>	<b>62</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....</b>	<b>64</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK .....</b>	<b>69</b>
	<b>SEZNAM OBRÁZKŮ .....</b>	<b>70</b>
	<b>SEZNAM TABULEK .....</b>	<b>72</b>

## ÚVOD

Sýry patří mezi mléčné výrobky, které svou konečnou podobu získávají hlavně díky činnosti bakterií a díky bohatému komplexu reakcí, které probíhají v průběhu zrání. Jednou ze základních chemických reakcí je proteolýza, kdy dochází k rozkladu bílkovin na menší peptidy, dipeptidy až na aminokyseliny. Aminokyseliny a produkty jejich degradace jsou zodpovědné za tvorbu chuti a vůně a jejich obsah se v průběhu zrání sýrů stále zvyšuje. Představují však také prekurzory pro vznik biogenních aminů, které vznikají působením enzymů dekarboxyláz. Tyto enzymy se v potravíně buď přirozeně nacházejí, nebo jsou produkovány mikroorganismy.

Biogenní aminy jsou látky, které jsou běžnou součástí lidského organismu a podílejí se na mnoha fyziologických procesech. Jsou to však také sloučeniny, které ve vysokých koncentracích mohou působit toxicky. V organismu se biogenní aminy přirozeně nacházejí jako lokální hormony a ovlivňují například sekreci žaludečních šťáv, kontrakce hladkého svalstva nebo se účastní hojení a regenerace tkání. Vysoký obsah po příjmu nadměrných koncentrací, může vyvolat akutní otravu, která se projevuje vyrážkou, nevolností, zvracením, křečemi, závratěmi nebo horečkami. V sýrech se nejčastěji vyskytují vysoké hladiny tyraminu, které způsobují vysoký krevní tlak a bolesti hlavy. Aby biogenní aminy v potravinách vznikly, je nutná přítomnost mikroorganismů s dekarboxylační aktivitou, dostupnost volných aminokyselin a vhodné prostředí pro růst bakterií. Sýry tvoří ideální prostředí pro vznik biogenních aminů, jelikož vlivem proteolýzy obsahují dostatek aminokyselin, obsahují bakterie a také poskytují dostatek živin pro jejich růst. Z tohoto důvodu je nutné hledat cesty ke snížení obsahu biogenních aminů v sýrech.

## **I. TEORETICKÁ ČÁST**

# 1 PŘÍRODNÍ SÝRY

## 1.1 Historie výroby sýrů

Sýry patří mezi mléčné produkty, které jsou vyráběny již od pradávna a na celém světě existuje více než tisíc různých druhů. Již v pravěku mohl člověk první náznaky sýru pozorovat, jelikož mléko, které měl snahu si skladovat, v průběhu měnilo své vlastnosti a sráželo se. S příchodem neolitické revoluce a domestikace zvířat, si lidé mléko začali skladovat v kožených vacích, které se vyráběly z čerstvých žaludků jehňat a později i telat. Působením enzymů, které se z žaludků vyextrahovaly, došlo ke srážení mléka na sýr. Později začali sražené mléko skladovat v otevřených nádobách vydlabaných ze dřeva, vypálených z hlíny či odlitých z kovu. V otevřených nádobách bylo pozorovatelné, jak se stárnutím mléka tvoří sraženina a pak také, že se celý proces srážení dá urychlit opatrným mícháním (Selecký, 2013). Jelikož se nepoužívalo syřidlo, byly tyto sýry určitě velmi ostré a kyselé (Ridgwayová, 1999). Proces odstranění syrovátky se prováděl původně stlačením sýřeniny v rukách a později v závěsných pytlích, či lisováním. Velký krok dopředu při výrobě sýru udělali Římané, kteří poprvé vědomě začali používat syřidlo. To pravděpodobně získávali ze čtvrtého žaludku mladé kozy nebo jehněte. Tehdy se syřidlo nazývalo „coagulum“ a takový sýr představoval velmi ceněné a důležité zboží (Callec, 2002).

Ve starém Řecku byl sýr dokonce považován za magický. Dával sílu mužům, kteří táhli do války, byl také obětován bohům a dokonce byl považován jako afrodisiakum (Iburg, 2004).

Nakonec se člověk naučil sýry solit a udit, aby prodloužil jejich trvanlivost (Selecký, 2013). Vyrábět sýry ve velkém umožnila v padesátých letech 19. století pasterace, kterou vynalezl francouzský mikrobiolog Louis Pasteur. Mléko z různých oblastí a různých stád se mohlo smíchat, bylo možné získat standardní výrobek s delší trvanlivostí a také výrobek, který je zdravotně nezávadný (Ridgwayová, 1999).

## 1.2 Dělení přírodních sýrů

Sýrem se dle vyhlášky 397/2016 Sb. o požadavcích na mléko a mléčné výrobky, mražené krémy a jedlé tuky a oleje, rozumí mléčný výrobek vyrobený vysrážením mléčné bílkoviny z mléka působením syřidla nebo jiných vhodných koagulačních činidel, oddělením podílu syrovátky a následným prokysáním nebo zráním.

Sýr je tedy bílkovinný koncentrát, který se vyrábí odstraněním vody ze sraženiny a podléhá chemickým a fyzikálním změnám, které jsou vyvolány přítomnými mikroorganismy. Oddělením syrovátky ze sýřeniny se odstraní podstatná část mléčného cukru, ve vodě rozpustných vitamínů a také rozpustné syrovátkové bílkoviny. V sýřenině se naopak koncentrují základní složky sušiny mléka, tedy kasein, mléčný tuk, vitamíny rozpustné v tucích a minerální látky (Drdák, 1996).

Sýry se dají rozdělit do dvou velkých skupin, na přírodní sýry a na tavené sýry. Přírodní sýry si poté můžeme rozdělit podle obsahu tuku v sušině, podle konzistence a dle způsobu zrání. Jelikož během zrání sýr ztrácí vodu a mění se jeho hmotnost, nelze obsah tuku vztáhnout k celkové hmotnosti sýru, ale udává se jako obsah tuku v sušině (Iburg, 2004).

Dělení sýrů dle obsahu tuku v sušině (t. v s.), (Iburg, 2004):

- Vysokotučný sýr, minimálně 60 % t. v s.
- Smetanový sýr, minimálně 50 % t. v s.
- Plnotučný sýr, minimálně 45 % t. v s.
- Tučný sýr, minimálně 40 % t. v s.
- Třičtvrteční sýr, minimálně 30 % t. v s.
- Polotučný sýr, minimálně 20 % t. v s.
- Čtvrteční sýr, minimálně 10 % t. v s.
- Netučný sýr, méně než 10 % t. v s.

Dělení sýrů dle konzistence ve vztahu k obsahu vody v tukuprosté hmotě sýru (Kadlec, 2012):

- Extra tvrdé, maximálně 47 % vody
- Tvrdé, mezi 47,0 – 54,9 % vody
- Polotvrdé, mezi 55 – 61,9 % vody
- Poloměkké, mezi 62 – 67 % vody
- Měkké, více než 68 % vody

Dělení sýrů dle způsobu zrání (Kadlec, 2012):

- Nezrající sýry (čerstvé tvarohové sýry, smetanové sýry, termizované sýry, pařené sýry, bílé sýry např. Balkánský sýr, Jadel apod.)
- Zrající sýry (sýry zrající pod mazem, sýry s anaerobním zráním v celé hmotě, které se dále dělí na sýry s nízkodohříváním a vysokodohříváním sýřeninou)

- Plísňové sýry (sýry s plísní na povrchu, sýry s plísní v těstě)

Modelové vzorky v praktické části diplomové práce byly tvořeny sýry eidamského typu, které spadají do sýrů s nízkodohřívanou sýřeninou. Jsou to sýry původem z Holandska, a proto se jim také říká sýry holandského typu. Při výrobě těchto sýrů se používá pro praní a dohřívání sýrového zrna teplot okolo 40 °C a délka zrání sýrů pro dosažení požadovaných vlastností by měla být minimálně 2 měsíce (Kadlec, 2012).

### 1.3 Technologie výroby sýrů s nízkodohřívanou sýřeninou

Sýry s nízkodohřívanou sýřeninou patří mezi zrající sýry a zrání probíhá v celé hmotě sýru bez přístupu kyslíku.

#### 1.3.1 Výběr mléka jako suroviny pro výrobu sýrů

Pro výrobu sýrů v mlékárenském průmyslu je vhodné a nejčastěji používané mléko kravské, ovčí a kozí. Pro produkci mléka, které se využívá pro výrobu sýru, se však chová daleko více zvířat. Nejčastěji jsou to buvoly, jejichž mléko obsahuje více bílkovin než mléko kravské a vyrábí se z něj známý sýr mozzarella di bufala. K produkci mléka se mohou využívat i jakové, zebu, sobi či velbloudi. (Calec, 2002). Složení a kvalita mléka je kromě druhu zvířete, také závislá na plemeni zvířete, na zdravotním stavu, na potravě, a také na období dojení. Mléko získané ke konci dojení je bohatší na tuky, než mléko získané na počátku. Také je rozdíl mezi mlékem ranním a večerním, a také mezi mlékem letním a zimním. Mléko letní obsahuje více živin a také více tuku, a proto se z něj dá vyrobit i lepší sýr. Toho využívají hlavně malovýrobci, kteří musejí brát v úvahu všechny tyto faktory (Ridgwayová, 1999).

Ať už mléko pochází z různých zdrojů, vždy musí být uchováváno v dokonalé čistotě a po nadojení se musí okamžitě zchladit. Dle nařízení Evropského Parlamentu a Rady (ES) č. 853/2004, kterým se stanoví zvláštní hygienická pravidla pro potraviny živočišného původu, se mléko po nadojení musí okamžitě zchladit na teplotu 8 °C nebo nižší v případě denního svozu, nebo na teplotu 6 °C nebo nižší, v případě, že svoz mléka není prováděn každý den.

Z mléka se dále odebírá vzorek pro případné stanovení obsahu antibiotik a somatických buněk k zajištění nemocných zvířat. Dále také ke stanovení složení mléka, obsahu bakterií, přidané vody (z důvodu falšování mléka) a cizích příměsí (Johnson, 2011).

### 1.3.2 Úprava mléka

Mezi základní operace úpravy mléka před plněním do výrobniku sýrů patří filtrace, k odstranění nežádoucího materiálu (např. seno, sláma, hmyz) a dále standardizace mléka. K odstranění spor *Clostridium botulinum*, které mohou způsobovat pozdní duření sýrů, se používá baktofugace (Johson, 2011).

Jako tepelné ošetření se pro polotvrdé a tvrdé sýry volí šetrná pasteurace, tedy teplot do 75 °C po dobu asi 20 sekund. Při vyšších teplotách se již zvyšuje denaturace sérových bílkovin, které se zadržují v sýřenině a zvyšuje se tak i vazba vody. Také se zhorší syřitelnost mléka (Šnirc, 2015). V takto pasterovaném mléce mohou přežívat pouze sporotvorné mikroorganismy a některé termorezistentní druhy bakterií. Chuť a vlastnosti mléka jsou ovlivněny pouze minimálně (Kadlec, 2012).

Tepelně ošetřené mléko se převede do výrobniku sýrů a zahřeje se na teplotu sýření (30 – 33°C), (Kadlec, 2012). Pak jsou přidány kyselé kultury, syřidlo a další aditiva pro podpoření sýření. Mezi ně patří chlorid vápenatý, který zvyšuje pevnost vzniklého gelu a také snižuje přirozenou variabilitu v syřitelnosti (Šnirc, 2015). Dále se může přidávat dusičnan draselný, který se používá z důvodu zamezení duření. Mohou se také přidávat některá barviva, např. anatto nebo karoten. Pro výrobu ochucených sýrů se mohou přidávat další složky, například koření, zelenina či ořechy (Kadlec, 2012).

### 1.3.3 Startérové kultury

Úkolem počáteční startérové kultury je hlavně přeměnit substrát na metabolity, které ovlivní vlastnosti výsledného produktu a také vyvolat rychlé okyselení systému. Použití známé kultury umožňuje řízení fermentačního procesu a získání standardizovaného produktu. Tyto kultury v počátečních fázích zrání převládají a jsou schopny potlačit růst nežádoucích mikroorganismů (Papademas, 2018).

Nejvíce využívané jsou bakterie mléčného kvašení (LAB), jejichž použití při výrobě fermentovaných potravin má dlouhou historii. Jejich hlavním úkolem je fermentace laktózy, dále přispívají k tvorbě textury, chuti a aroma konečného produktu. Zajišťují také delší trvanlivost a jsou schopné potlačit růst nežádoucích bakterií, např. producentů biogenních aminů (Donnelly, 2014). Nejvíce využívané LAB, jako startérové kultury jsou bakterie rodu *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* a *Enterococcus*. Mezi mezofilními druhy patří například *Lactococcus lactis* a *Leuconostoc* spp., mezi termofilními napří-

klad *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbruecki* spp. *bulgaricus* a *Lactobacillus helveticus* (Papademas, 2018).

*Lactococcus lactis* tvoří hlavní složku směsi mléčných kultur, které se používají po celém světě. Lidé údajně zkonsumují asi až  $10^{18}$  laktokokových buněk za rok prostřednictvím fermentovaných mléčných výrobků (Papademas, 2018). Jejich výhodou je hlavně vysoká rezistence vůči bakteriofágům či antibiotikům a účinné využití laktózy. *Streptococcus thermophilus* je považován za druhý nejdůležitější startér (Donnelly, 2014).

Kromě startérové kultury se do mléka mohou přidávat také tzv. doplňkové sekundární kultury, které vytváří charakteristickou chuť a aroma sýru. Patří sem například propionová kultura, která rozkládá laktózu na kyselinu propionovou, kyselinu octovou a oxid uhličitý. Kyselina propionová je zodpovědná za nasládlou oříškovou chuť sýru a oxid uhličitý zase za tvorbu ok. Tato kultura je charakteristická pro švýcarské sýry, tedy pro sýry s vysokodohřívanou sýřeninou (Kadlec, 2012).

Při výrobě sýrů se také mohou využívat např. koryneformní bakterie (*Brevibacterium*, *Corynebacterium*, *Microbacterium*) a kvasinky (*Candida*, *Debaromyces*), které se používají hlavně pro zrání měkkých a polotvrdých sýrů s mazem na povrchu (Olomoucké tvarůžky, Romadúr). Jsou zodpovědné za typický žlutooranžový pigment a díky schopnosti rozložit aminokyseliny až na methanthiol, také za velmi výraznou vůni (Kadlec, 2012).

Plísňové kultury se používají pro zrání plísňových sýrů, nejznámější je *Penicillium camemberti* pro výrobu sýrů s plísní v těsně a *Penicillium roqueforti* pro výrobu sýrů s plísní na povrchu (Papademas, 2018).

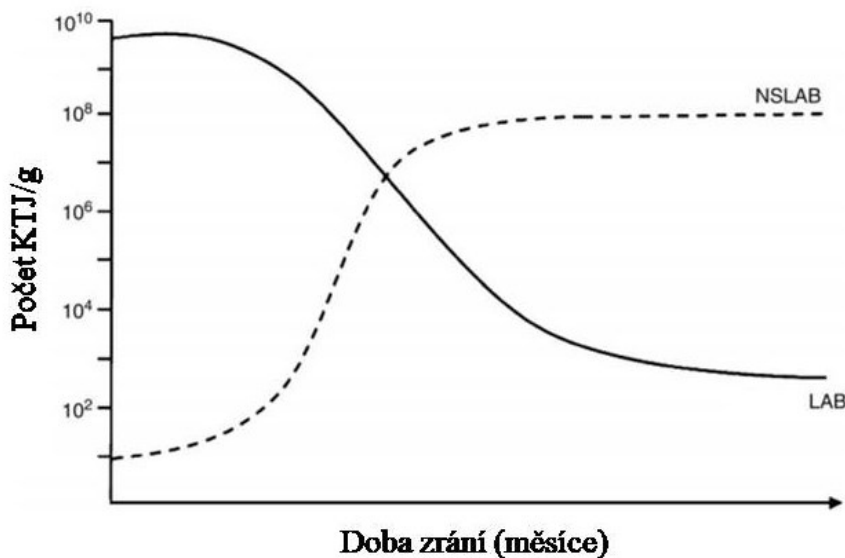
#### 1.3.4 Non – startérové mikroorganismy

Non-startérové bakterie (NSLAB) mohou být součástí autochtonní mikroflóry mléka, nebo se do mléka dostanou jako kontaminanty z prostředí (Kadlec, 2012). Přestože jsou považovány za kontaminující mikroorganismy, většinou se díky moderním hygienickým postupům nejedná o patogenní druhy, které by mohly představovat hrozbu pro poškození zdraví konzumentů (Broadbent, 2016).

Na počátku zrání se v mladém sýru nachází velmi nízké hladiny NSLAB, které se však v průběhu zrání zvyšují, až dosáhnou vysokého počtu. Tento jev je viditelný na obrázku níže (Obrázek č. 1). Počáteční počet bakterií LAB v sýru běžně překročí  $10^9$  kolonií tvořících jednotek na gram (KTJ/g). V průběhu zrání se však mění prostředí sýru (klesá obsah



laktózy, prostředí je kyslejší) a startovací kultury postupně ztrácejí životaschopnost. Zároveň stoupá populace NSLAB, která na počátku nepřekročí hranici  $10^2$  KTJ/g (při správných podmínkách výroby). V průběhu zrání se začínají více množit, a po 3-4 měsících mohou dosáhnout hodnot  $10^7 - 10^8$  KTJ/g (Broadbent, 2016).



Obrázek č. 1: Změna v populacích startérové LAB a NSLAB v průběhu zrání.

Převzato a přeloženo podle Broadbent, 2016

NSLAB tvoří vysoce heterogenní skupinu mikroorganismů, patří sem nejčastěji laktobacily, laktokoky a pediokoky. Mezi nejčastější bakterie, které patří do rodu laktobacilů, jsou *Lactobacillus buchneri*, *L. paracasei*, *L. bulgaricus* a *L. plantarum* spolu s *L. curvatus*, *L. rhamnosus* a *L. casei* (Papademas, 2018).

Tyto bakterie mohou ovlivnit vlastnosti sýru nejméně třemi způsoby. Mohou zesílit či urychlit tvorbu typické chuti či aroma, mohou poskytovat rozvoj atypické, nicméně požadované chuti a aroma, nebo mohou podporovat vývoj nežádoucích příchutí. Ovšem jak již bylo zmíněno, kmeny, které konzistentně způsobují žádoucí změny chuti, se nazývají doplňkové či sekundární kultury. Mnoho komerčně používaných doplňkových kultur však bylo původně izolováno právě jako NSLAB z vysoce kvalitních sýrů (Broadbent, 2016). NSLAB jsou také často předmětem zkoumání, ve snaze identifikovat nové kultury, které by mohly splnit požadavky spotřebitelů na různorodější chuť. Takové kmeny je možné

izolovat ze syrového mléka či z prostředí a jsou kolektivně označovány jako „divoké typy“ (Papademas, 2018).

Kromě ovlivnění chuti a aroma mohou mít NSLAB také možný dopad na vady sýrů. Produkci plynu mohou způsobovat duření sýrů, či mohou způsobovat krystalizaci laktátu vápenatého, který může být mylně zaměňován za kontaminaci plísněmi (Broadbent, 2016). Mnoho non-startérových bakterií také dokáže v sýru přežít i za nízkých koncentrací laktózy a k získání energie využívají hlavně aminokyseliny, které se v sýřenině nacházejí, což vede ke vzniku biogenních aminů (Zuljan, 2016).

### 1.3.5 Protektivní kultury

Protektivní kultury se skládají z konkrétních bakterií a do potravin se přidávají pro svoji schopnost inhibovat růst patogenních mikroorganismů, nebo kontaminujících bakterií, které mohou způsobit kažení potravin. Některé LAB produkují řadu látek, které omezují vývoj konkurenčních bakteriálních populací a mohou tak být považovány za přírodní konzervační látky pro celou řadu potravin (Baines, 2012). Biologická konzervace se praktikovala již od starověku, i když nejprve jen instinktivně, později již se stále silnějším vědeckým podkladem. To, že některé kmeny laktokoků mají antimikrobiální účinek i na jiné bakterie mléčného kvašení, bylo zjištěno v roce 1928 (Lacroix, 2011).

Existuje celá škála mechanismů, kdy jeden mikroorganismus může narušit růst ostatních. Většinou je konzervační účinek u fermentovaných potravin dán vyšším obsahem kyselin (hlavně kyselinou octovou, mléčnou a propionovou), což vede ke snížení pH. Dalším mechanismem je produkce malého množství inhibičních látek například peroxidu vodíku, diacetylu, acetoinu, hypothiokyanátu či reuterinu (Kilcast, 2011). K inhibici nežádoucích mikroorganismů také přispívá mikrobiální interference, kdy populace mezi sebou soutěží o prostor a základní živiny.

Protektivní kultury musí splňovat následující požadavky. Musí být schopny růstu v potravine, musí inhibovat či omezovat růst nežádoucí mikroflóry, nesmí vytvářet nežádoucí změny produktu a nesmí produkovat látky, které mohou být pro člověka škodlivé (Baines, 2012).

Mezi další antimikrobiální produkty, které bakterie vylučují, patří bakteriociny, což jsou látky bílkovinného původu. V roce 1947 byl popsán nejznámější bakteriocin nisin, který je dnes běžně používán jako bezpečná konzervační látka do mnoha potravin.

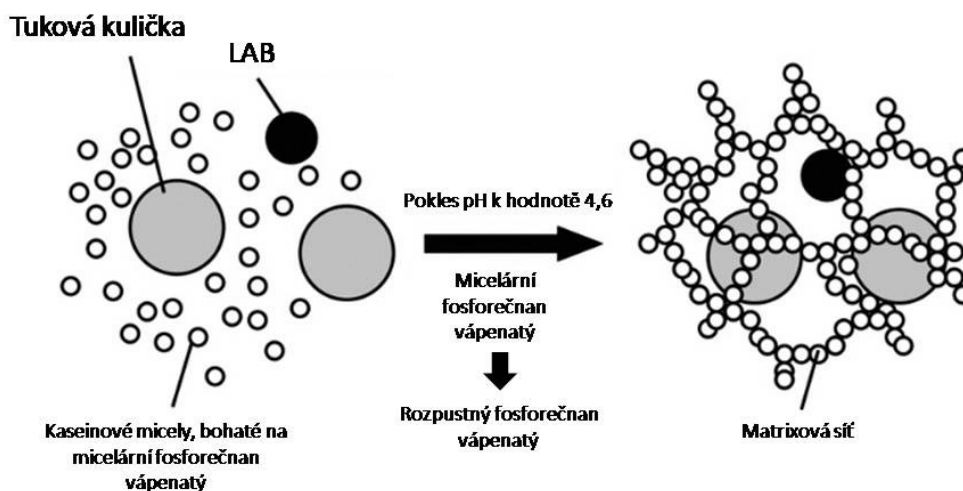
Působí hlavně na grampozitivní bakterie (tedy ostatní mléčné bakterie, rod *Bacillus*, *Clostridium*, *Listeria* a *Streptococcus*). Nisin se jako konzervant používá nejčastěji v tavených sýrech, či jiných výrobcích ze sýrů, konzervované zelenině a ovoci, v pudincích apod., (Lacroix, 2011). U sýrů je potřeba optimalizovat kompozici počátečních kultur, které produkují nisin v kombinaci s jinými kulturami s žádoucími vlastnostmi, které jsou vůči nisinu rezistentní. Použití nisinu totiž může mít za následek snížení růstu technologicky významných kultur.

Použití nisinu v sýrech, či použití kultur, které produkují bakteriocin, může přinést řadu výhod. Může dojít ke zrychlení dozrávání sýrů, či k vývoji plnější chuti díky řízenému rozpadu výchozích kultur, kdy dojde k uvolňování intracelulárních enzymů (Baines, 2012). Použitím bakteriocinů se dá také předejít pozdnímu duření sýrů, či jiných změn, které jsou způsobené nežádoucími NSLAB.

Díky protektivním kulturám lze také dosáhnout zamezení tvorbě biogenních aminů, kdy může dojít k potlačení růstu některých startérových či doplňkových kultur s dekarboxylázovou aktivitou (Lacroix, 2011). Jako protektivní kultury můžeme i označit bakterie, které mají díky svým enzymům schopnost některé biogenní aminy degradovat (Tittarelli, 2019).

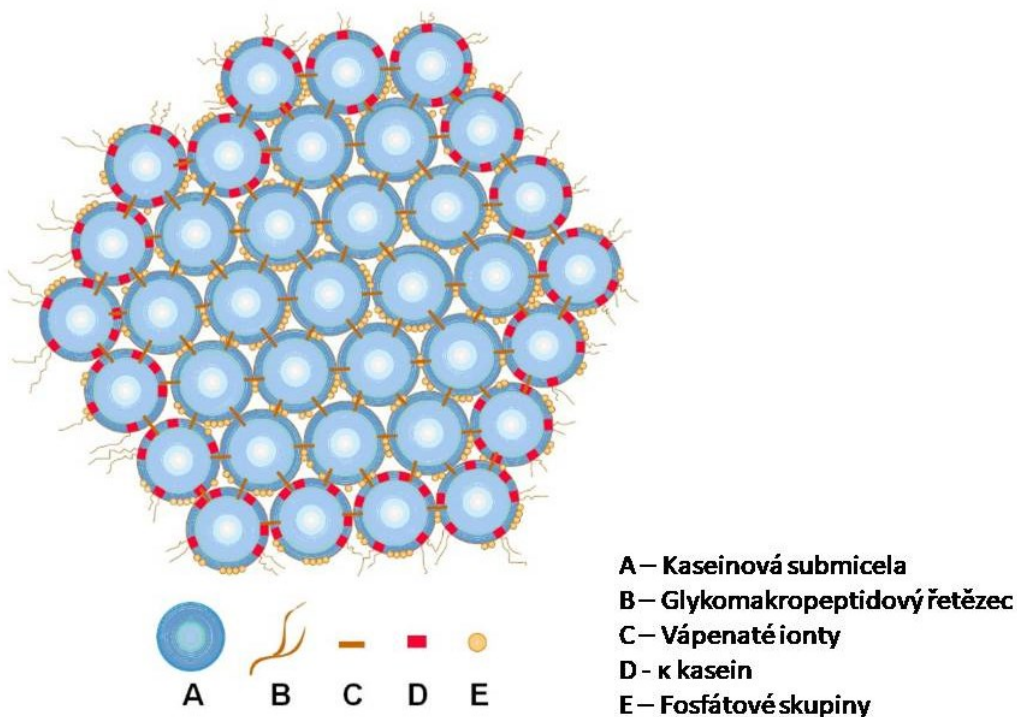
### 1.3.6 Srážení mléka a zpracování sýřeniny

Srážení mléka může probíhat pomocí kyselého a sladkého srážení. U kyselého srážení dochází k poklesu pH do oblasti blízké izoelektrickému bodu kaseinu, kdy dochází k uvolňování koloidního fosforečnanu vápenatého z kaseinových micel a tím dochází k jejich destabilizaci a následné agregaci (Donnelly, 2014). Kyselé srážení se používá spíše pro výrobu tvarohů nebo čerstvých sýrů jako je například Cottage. Kyselé srážení je popsáno na obrázku níže (Obrázek č. 2), kde jsou viditelné micely kaseinu bohaté na fosforečnan vápenatý, které při okyselení mléka tvoří síť.



Obrázek č. 2: Kyselé srážení mléka. Přezato a přeloženo podle Donnelly, 2014

Sladké srážení se provádí pomocí syřidla. Díky enzymu chymosinu dojde ke štěpení  $\kappa$  kaseinu, který je na povrchu micely a má ochrannou funkci. Štěpení probíhá na specifickém úseku mezi 105. a 106. aminokyselinou, čímž vznikne hydrofóbní para- $\kappa$ -kasein a hydrofilní glykomakropeptid (Šnirc, 2015). Tím dochází k odhalení ostatních kaseinových frakcí, které se sráží v přítomnosti vápenatých iontů a dochází k tvorbě gelu (Obrázek č. 3).



Obrázek č. 3: Sladké srážení mléka. Zdroj Wageningen University, 2017

Další fází je zpracování sraženiny, čímž se podpoří synereze gelu. Provádí se krájením, mícháním a dohříváním. Cílem je vytvořit sýrová zrna a oddělit určité množství syrovátky. Vše se musí provádět šetrně a zpočátku pomalu, aby nedošlo k rozbití zrn na jemné částice. U nízkodohřívavých sýrů se používá teplota pro dohřívání mezi 36 – 40°C. Dále se provádí praní sýrového zrna, kdy se odpustí část syrovátky a přidá se teplá voda. Tím se také snižuje obsah laktózy. Poté následuje lisování a solení sýrů (Kadlec, 2012).

### 1.3.7 Zrání sýrů

Zrání sýrů představuje bohatý komplex reakcí, které se podílejí na změnách textury a tvorbě aromatických složek. V sýru začínají probíhat změny, které jsou způsobeny syřidlovými enzymy, enzymovou činností kultur a také činností nezákysových bakterií. Primárními reakcemi, které probíhají při zrání sýrů je glykolýza, proteolýza a lipolýza (Bylund, 2015).

Rozklad laktózy je způsoben enzymem laktázou přítomných LAB, díky kterým se dá regulovat rychlost a rozsah fermentace. Jejich činností dochází ke snížení hodnoty pH, která dosáhne minima již během jednoho nebo dvou dnů (Randazzo, 2013). U většiny sýrů tedy dochází k fermentaci laktózy už během lisování, nebo nejpozději během prvního či druhého týdne zrání (Bylund, 2015).

Proteolýza primárně zahrnuje rozpad kaseinu pomocí syřidla a plazminu, což je enzym přirozeně obsažený v mléce. Kromě toho je rozklad bílkovin zajištěn také pomocí enzymů LAB a NSLAB na menší peptidy, dipeptidy až na aminokyseliny. Hlavním úkolem syřidla, je rozštěpit molekulu para- $\kappa$ -kaseinu na menší polypeptidy. Tento útok syřidlem poté umožňuje podstatně rychlejší rozklad kaseinu pomocí bakteriálních enzymů (McSweeney, 2017)

Aminokyseliny tedy představují konečné produkty proteolýzy v sýrech a jejich celkové množství se během dozrávání zvyšuje. Během zrání se mění také jejich složení, například obsah leucinu se většinou snižuje, ale naopak obsah prolinu a lysinu se zvyšuje více než u ostatních aminokyselin (Randazzo, 2013). Aminokyseliny jsou také zodpovědné za tvorbu chutí. Například aminokyseliny prolin, serin či alanin nesou sladkou chuť, naopak leucin, izoleucin či lysin zase chuť hořkou. Katabolismem aminokyselin dále vznikají aromatické sloučeniny, které jsou zodpovědné za aroma sýrů a nemusí být vždy jen příjemné. Například rozkladem metioninu na dimethyldisulfid získá sýr vůni po česneku, či kvěťáku a další příklady jsou uvedeny v tabulce (Tabulka č. 1), (Randazzo, 2013).

Degradací aminokyselin také mohou vznikat nežádoucí či škodlivé sloučeniny, jako je např. amoniak, močovina, kyselina máselná, vodík a biogenní aminy (Kadlec, 2002).

Aminokyselina	Aromatická sloučenina	Vůně / zápach
Leucin	3-methylbutanová kyselina 3-methylbutanal 3-methylbutanol	Shnilé ovoce, pot Tráva, slad, čokoláda Alkohol, vůně po ovoci
Valin	2-methylpropanové kyseliny	Žluklá, máselná
Fenylalanin	Fenyloctová kyselina Fenylacetaldehyd Fenethylalkohol Benzaldehyd	Květiny, růže, hyacinty Sýrová Růže, květinová Hořké mandle
Tyrosin	Fenol	Chemická
Tryptofan	Skatol	Fekální
Metionin	3-methylthio-propanal Methional Dimethyldisulfid Dimethylsulfid	Vařené brambory Brambory, zelí Květák, Česnek Vařené zelí, síra
Kyselina asparagová	Diacetyl	Máslo, karamel

Tabulka č. 1: Aromatické sloučeniny získané katabolismem aminokyselin.

Převzato a upraveno podle Randazzo, 2013

Lipolýza probíhá pomocí enzymů lipáz či esteráz a je důležitá hlavně u sýrů s plísní na povrchu, či s plísní v těstě. U těchto sýrů se také provádí homogenizace tuku při úpravě mléka a díky lipolýze dochází k uvolnění mastných kyselin a methylketonů (McSweeney, 2017)

## 2 BIOGENNÍ AMINY

Biogenní aminy (BA) jsou organické, netěkavé látky s nízkou molekulovou hmotností a podle chemické struktury se rozdělují na látky aromatické, heterocyklické a alifatické. Dříve byly biogenní aminy považovány za jedy a nazývaly se ptomainy, což byl název odvozený z řeckého slova “ptoma“, neboli mrtvola. Označovaly se tak tzv. kadaverické jedy, vytvořené z bílkovin v pokročilém stádiu kažení živočišných těl (Steglich, 2000). Biogenní aminy sice vznikají pomocí metabolické aktivity mikroorganismů, ale nemusí vznikat pouze při kažení potravin a pouze v potravinách živočišného původu (Kotzekidou, 2016). Jejich výskyt je tedy mnohem rozmanitější.

### 2.1 Vznik biogenních aminů

Biogenní aminy vznikají v potravinách pomocí dekarboxylace aminokyselin. Dekarboxylace je chemická reakce, kdy působením enzymů dekarboxyláz, dojde k odštěpení oxidu uhličitého z karboxylové skupiny aminokyseliny, za vzniku aminu. K dekarboxylaci může dojít pomocí dekarboxyláz, které se v potravině přirozeně nacházejí, nebo pomocí dekarboxyláz, které jsou produkovány mikroorganismy.

Nejdůležitějšími faktory pro vznik biogenních aminů je přítomnost mikroorganismů s dekarboxylační aktivitou, dostupnost substrátu (prekurzory volných aminokyselin) a dále záleží na podmínkách prostředí pro růst bakterií (Fox, 2004). Sýry tvoří ideální prostředí pro tvorbu biogenních aminů, protože obsahují mnoho bílkovin, enzymů, kofaktorů, vodu a také mikroorganismy. Akumulace aminů v sýru je ovlivněna hlavně mikrobiální kvalitou syrového mléka, hygienickými postupy, použitím startovacích kultur, podmínkami prostředí a dobou zrání.

Přestože syrové mléko obsahuje malé množství biogenních aminů, v sýru se již mohou nacházet vysoké koncentrace. Během zrání sýrů totiž dochází k proteolýze bílkovin, což vede k akumulaci volných aminokyselin, které mohou tvořit substrát pro aktivitu dekarboxylázy (Şanlı, 2015). Hlavními biogenními aminy, obsaženými v sýru je histamin, tyramin, tryptamin, fenylethylamin, putrescin a kadaverin (Fox, 2014).

Mezi další faktory, které ovlivňují tvorbu biogenních aminů, patří teplota a pH (optimum je 2,5 – 6,5). Dále také přítomnost kyslíku a soli, doba skladování potravin a dostupnost substrátu pro bakterie. Důležitá je také hygiena při zpracování a výrobě produktů (Fox, 2004).

## 2.2 Rozdělení biogenních aminů

Biogenní aminy se dělí na endogenní, které vznikají jako produkty metabolismu a jsou přirozenou složkou většiny potravin. Exogenní aminy vznikají v potravinách pomocí mikroorganismů při kvasných procesech, proto se ve vyšších koncentracích mohou vyskytovat právě v sýrech, dále v trvanlivých salámech, pivu, vínu a kysaném zelí (Şanlı, 2015). Působením kontaminující mikroflóry se nejčastěji biogenní aminy tvoří v rybách, v sýru, v mase, zelenině, ovoci a houbách (Velíšek, 2009).

Podle chemické struktury se aminy dělí na alifatické, kam patří putrescin a kadaverin. Mezi aromatické patří histamin a fenylethylamin. Mezi heterocyklické biogenní aminy patří tyramin a tryptamin.

Za samostatnou skupinu biogenních aminů by se dal označit putrescin a z něj vznikající spermidin a spermin. Zhruba od 90. let 20. století se řadí mezi polyaminy, jelikož mají specifické podmínky vzniku a mají také odlišné biologické účinky (Velíšek, 2009).

## 2.3 Význam biogenních aminů

Biogenní aminy nemusí vždy působit jen toxicky. Jsou běžnou součástí organismu a také hrají důležitou roli v mnoha fyziologických procesech. Ve větších koncentracích však mohou mít nežádoucí, až toxické účinky na organismus, hlavně u citlivých jedinců (Fox, 2014).

### 2.3.1 Pozitivní vliv na zdraví

Protože se podílejí téměř na každém kroku DNA a RNA syntézy a syntézy proteinů, jsou nezbytné pro růst a proliferaci buněk ve všech orgánech (Blackburn, 2006). Například histamin patří mezi lokální hormony a má vliv na sekreci žaludečních šťáv a také působí jako neurotransmitter v centrálním nervovém systému. Tyramin také patří mezi lokální tkáňové hormony a má vliv na kontrakce hladkého svalstva. Mezi další lokální hormony patří i tryptamin, který ovlivňuje peristaltiku střev a psychický stav. Putrescin a kadaverin je zase nezbytný pro regulaci buněčného růstu, diferenciaci buněk a také se účastní hojení a regenerace poraněných tkání (Velíšek, 2009). Tyto polyaminy se však podílí i na růstu nádorových buněk. Byly provedeny studie, kdy byly zjištěny mnohačetné abnormality v metabolismu putrescinu u lidí trpících rakovinou. Na základě toho byla dieta s omezeným obsahem biogenních aminů široce studována jako součást terapie u některých pacien-



tů s rakovinou (Kotzekidou, 2016). Naopak zvýšený příjem je žádoucí pro urychlené hojení ran, popálenin, vývoj, obnovu střevní mukózy apod. Fyziologická potřeba polyaminů pro člověka ve zdraví a při nemoci není však zatím známá (Velišek, 2009).

### 2.3.2 Toxicita nejdůležitějších biogenních aminů

Mezi nejvíce toxické biogenní aminy patří histamin a tyramin. Jsou spojovány hlavně s konzumací ryb, ve kterých se biogenní aminy nejvíce vyskytují. Jedná se hlavně o ryby čeledi makrelovití (Scombridae), jako je tuňák nebo makrela, nebo o ryby čeledi rohoretkovití (Scombereoscidae), (Hanel, 2009). Nejvyšší koncentrace biogenních aminů obsahují hlavně špatně skladované ryby, ovšem dekarboxylázovou aktivitu mají i některé psychrotrofní bakterie, proto může dojít k výskytu i u ryb skladovaných při chladničkových teplotách.

Při akutní otravě histaminem může docházet k řadě příznaků, které postihují kůži (vyrážka, kopřivka), gastrointestinální trakt (nevolnost, zvracení, průjem, břišní křeče), neurologické funkce (pocit brnění, závratě a bolesti hlavy), horečka a hypertenze (Fox, 2014). Patří totiž mezi biogenní aminy s vasodilatační funkcí a při nadměrném příjmu a nedostatečném odbourávání dochází ke změně kontraktility cév a ke snížení krevního tlaku (Blackburn, 2006). Tyramin zase naopak patří mezi vasokontraktibilní aminy a má za následek zvyšování krevního tlaku (Velišek, 2009).

Příznaky obvykle nastupují během několika minut a trvají v řádu hodin. Obecně je průběh otrav mírný a mnoho pacientů ani nevyhledá lékařskou pomoc. Byly však také hlášeny závažné příznaky a to většinou u starších pacientů (Kotzekidou, 2016).

Intoxikace biogenními aminy (hlavně tyraminem), která je spojena s konzumací sýru, se často nazývá „cheese reaction“. Vyznačuje se vysokým krevním tlakem a bolestmi hlavy (Şanlı, 2015).

### 2.3.3 Vliv biogenních aminů na hygienu potravin

Vedle nežádoucích účinků představují biogenní aminy také obavy z hlediska dodržení hygieny výroby a kvality potravin. Na obsah biogenních aminů nemá vliv tepelné ošetření, takže ani vaření ani mražení nesnižuje jejich koncentraci během zpracování potravin. Jedním z největších problémů, které ovlivňují potravinářský průmysl, patří tvorba biogenních aminů během skladování potravin, která je obtížně kontrolovatelná (Kotzekidou, 2016).

Toxikologická úroveň je obtížně určitelná, protože nezávisí jenom na koncentracích biogenních aminů, ale také na individuálních vlastnostech aminů, na přítomnosti inhibitorů, fyziologickém stavu jedince apod. Látky mezi sebou také mohou reagovat, například putrescin a kadaverin přispívají k synergickým účinkům a zvyšují toxicitu histaminu (Şanlı, 2015).

Přestože akumulace biogenních aminů v potravinách může způsobit zhoršení zdravotního stavu konzumenta, legislativně nejsou v České republice stanoveny regulační limity. Legislativa také výrobcům nenařizuje uvádět obsah biogenních aminů na obale potravin.

#### 2.3.4 Biogenní aminy jako indikátory kvality potravin

Biogenní aminy jsou přirozenou součástí mnoha potravin, ve větších koncentracích se ale nacházejí v potravinách, které jsou v pokročilém stádiu kažení. Přítomnost biogenních aminů tedy může sloužit jako chemická indikace kažení či znehodnocení potravin (Şanlı, 2015).

Ve většině potravin se vyskytuje vždy více aminů v různých koncentracích. Jako ukazatel čerstvosti, se proto používá součet koncentrací více biogenních aminů. Sečtením koncentrací histaminu, tyraminu, putrescinu a kadaverinu se dá vypočítat biogenní aminový komplex (BAI). Existuje také hodnota vazoaktivní index biogenních aminů (VBAI), která označuje součet všech vazoaktivních aminů v potravině, tedy histamin, tyramin, tryptamin a fenylalanin. Tato hodnota se používá pro masné výrobky. Jak BAI, tak VBAI mohou sloužit jako ukazatele mikrobiologické kvality potravin a také hygienických podmínek, při kterých byly potraviny zpracovány (Motarjemi, 2014).

Maximální přípustné hodnoty jsou těžko stanovitelné, proto tyto hodnoty nejsou příliš využívány. Hodnotí se pouze u ryb, například pro tuňáka či makrelu je hodnota BAI v pokročilém stádiu rozkladu  $100 \text{ mg.kg}^{-1}$ . U čerstvých ryb je hodnota BAI  $10 \text{ mg.kg}^{-1}$  (Kotzekidou, 2016).

Pro představu, čerstvé vepřové maso obsahuje zhruba do  $7 \text{ mg.kg}^{-1}$  kadaverinu a putrescinu. Zkažené maso však může obsahovat i více než  $40 \text{ mg.kg}^{-1}$ . Více aminů se nachází u špatně skladovaných ryb, např. tuňák může obsahovat až  $8000 \text{ mg.kg}^{-1}$  histaminu. Histidin ve svalovině ryb je totiž pro bakterie snadno dostupný (Velíšek, 2009). Jak již bylo řečeno, tepelné ošetření masa nemá vliv na snížení obsahu aminů, může dojít pouze k jejich částečné extrakci. Předpokládá se, že příjem potravin s koncentrací histaminu vyšším než  $400 \text{ mg.kg}^{-1}$  je nebezpečný pro zdraví (Alvarez, 2014).

## 2.4 Degradace biogenních aminů

V gastrointestinálním traktu jsou biogenní aminy katalyzovány pomocí enzymů monoaminoxidázy (MAO) a diaminoxidázy (DAO) až na karboxylové kyseliny. Díky těmto enzymům dojde k zabránění nebo ke snížení absorpce nemetabolizovaných aminů do krevního oběhu (Fox, 2014).

Monoaminoxidáza se dělí na dva různé izoenzymy. MAO-A, která se nejvíce nachází v žaludku a střevě. MAO-B, která se nachází spíše v játrech a ve svalech. Diaminoxidáza působí také ve střevech. Dále ještě existuje enzym histidinmethyltransferáza, který je neúčinnější při odbourávání histaminu a nachází se v celém trávicím traktu (hlavně ale v játrech), (Steglich, 2008). Polyaminy jsou odbourávány polyaminoxidasou (Velíšek, 2009).

Nicméně, činnost těchto enzymů může být narušena, nejčastěji v důsledku přítomnosti inhibitorů enzymů. Mezi nejčastější inhibitory patří některé léky jako antidepresiva, anti-parkinsonika, dále antimalarika. Také velmi záleží na vlastnostech jedince. Dostatečný mechanismus enzymů chybí také u malých dětí, u lidí trpících zhoršenou funkcí jater, genetickými poruchy apod., (Fox, 2014). Dalším faktorem může být příjem biogenních aminů ve vysokých koncentracích, kdy dojde k překročení detoxikačních mechanismů enzymů a tím dojde k vývoji toxického účinku. Například tyramin inhibuje MAO, tryptamin DAO a fenylalanin inhibuje oba enzymy.

K nedostatečné detoxikaci také může dojít, pokud jsou vysoké koncentrace aminů přijímaných spolu s alkoholem. Jeho degradačním produktem je acetaldehyd, který také působí jako inhibitor aminoxidáz (Şanlı, 2015).

K odstranění již vzniklých biogenních aminů v sýrech, se dá využít bakterií, které tyto enzymy vytvářejí, a tím jsou schopné degradace biogenních aminů. Tato schopnost byla zjištěna například u některých bakterií rodu *Lactobacillus*, *Bacillus* a *Brevibacterium* (Tittarelli, 2019). Odstranění či snížení koncentrace již vzniklých aminů z potravin, je však v praxi velmi obtížné (Velíšek, 2009). Proto je důležitá prevence před vznikem biogenních aminů, kterou zahrnuje i výběr kultur, které vykazují nízkou dekarboxylační aktivitu.

## 2.5 Nejběžnější producenti biogenních aminů v sýrech

Mezi významné producenty biogenních aminů v sýrech, které spadají do populace LAB či NSLAB patří *Lactobacillus buchneri*, *L. bulgaricus*, *L. plantarum*, *L. casei*, *L. acidophilus* a *L. aranosae*. Dále také *Lactococcus* spp., *Enterococcus* spp., *Streptococcus faecium*, *S. mitis* a *Propionibacterium* spp. (Velíšek, 2009). Jak již bylo řečeno, bakterie mléčného kvašení, jsou schopny eliminovat růst producentů biogenních aminů, avšak je zřejmé, že někteří zástupci LAB vykazují dekarboxylační aktivitu a tudíž jsou také schopni produkce biogenních aminů.

Mezi patogenní kontaminující mikroflóru s dekarboxylační aktivitou patří hlavně bakterie z čeledi *Enterobacteriaceae*, např. *Morganella*, *Klebsiella*, *Escherichia*, *Hafnia* a *Proteus*. Zástupci čeledi *Enterobacteriaceae* patří mezi nejčastější kontaminanty, jejichž vliv na zkázu potravin, byl dříve do značné míry přehlížen kvůli pozitivnímu významu některých zástupců. Výjimkou byla bakterie *Erwina* spp. a další rody, které byly důležité z hlediska ztrát v zemědělství (Blackburn, 2006). Mezi další mikroorganismy, které jsou schopny produkce biogenních aminů, patří například *Clostridium perfringens*, *Micrococcus*, *Pediococcus* a někteří zástupci stafylokoků, streptokoků a pseudomonád (Velíšek, 2009.) Kontaminující bakterie, jsou kromě potenciální tvorby biogenních aminů také nejrozšířenější původci onemocnění. Mohou způsobovat otravy z potravin či bakteriální infekce.

Mezi další patogeny, které se mohou v mléce vyskytovat již při primární kontaminaci, prostřednictvím infekce vemene, patří *Salmonella* spp., *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus*, *Campylobacter jejuni*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium paratuberculosis*, *Brucella abortus* a *Coxiella burnetti* (Griffiths, 2010).

Při dojení se do mléka mohou dostat patogeny jako je např. *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Yersinia enterocolitica* a *Aeromonas hydrophila*. Také podestýlka může hrát významnou roli při vnější kontaminaci, protože může být zdrojem fekální kontaminace. Příkladem je *Campylobacter jejuni* (Griffiths, 2010).

Dalšími zdroji patogenních bakterií může být personál, vzdušná kontaminace, voda (hlavně *Pseudomonas* spp., *Cryptosporidium parvum*) a kontaminace z mléčného a skladovacího zařízení.

## 2.6 Biogenní aminy v sýrech ze syrového mléka

Sýry, které se vyrábějí ze syrového mléka, mohou pro výrobce představovat technologickou výzvu z hlediska produkce biogenních aminů. Je to hlavně z důvodu přítomnosti přirozených počátečních mikroorganismů, jejichž metabolická aktivita nemusí být zcela známá. V některých případech se k snížení mikroorganismů v mléce využívá tlakových membránových procesů, či baktofugace (Tittarelli, 2019). Sýry ze syrového mléka však mohou představovat z hlediska obsahu biogenních aminů vyšší riziko, jelikož je u nich potenciálně možná vyšší akumulace těchto látek (Iburg, 2004). Mezi nejznámější sýry, které se vyrábí z nepasterovaného mléka, patří například italský Parmezán, švýcarský Raclette nebo Gruyère, nebo francouzský Roquefort (Ridgwayová, 1999).

Mléko je však před výrobou podrobno přísné kontrole na přítomnost původců onemocnění. Také na výrobce jsou při kontrolách kladeny vyšší požadavky, než u výrobců sýrů z pasterovaného mléka. Případy poškození zdraví vlivem konzumace sýrů z nepasterovaného mléka se v posledních 25 letech vyskytly pouze ojediněle (Iburg, 2004). Použití tepelně neošetřeného mléka pro výrobu tvrdých sýrů může být bezpečné, jelikož vlivem zahřívání sýřeniny při výrobě, solné lázni a také díky dlouhé době zrání se předpokládá postupné usmrcení škodlivých zárodků. Dle nařízení Evropského Parlamentu a Rady (ES) č. 853/2004, kterým se stanoví zvláštní hygienická pravidla pro potraviny živočišného původu, je použití syrového mléka možné, pouze pro výrobu sýrů s dobou zrání alespoň dva měsíce. Čerstvé sýry by se však vyrábět neměly (Iburg, 2004).

Evropské společenství již v roce 2000 usilovalo o zákaz výroby sýrů ze syrového mléka, avšak tradiční výrobci sýrů, sýrařské společnosti a mnohé iniciativy se zasahují pro jejich zachování. Pokud by prý došlo k jejich zakázání, svět sýrů a kultura jídla by utrpěly větší škodu, než by byly zdravotní výhody pro spotřebitele (Iburg, 2004).

Současná evropská legislativa pasteraci nenařizuje, je ale povinné o použití syrového (nepasterovaného) mléka spotřebitele informovat (Nařízení Evropského Parlamentu a Rady (ES) č. 853/2004).

### 3 MOŽNOSTI POUŽITÍ OCHRANNÝCH OPATŘENÍ PRO ZAJIŠTĚNÍ KVALITY SÝRŮ

Mléko a mléčné výrobky jsou jedním z historicky prvních potravinářských odvětví, kde byly zavedeny konkrétní postupy ve výrobním řetězci a chemické i mikrobiologické kritéria, aby se zajistila bezpečnost a kvalita zpracovaného mléčného produktu.

Ekonomický dopad, který je způsoben kažením potravin, se však stává stále důležitějším, vzhledem k rostoucímu mezinárodnímu obchodu a vysokými nároky na kvalitu na úrovni podnikatelů i spotřebitelů. Také se odhaduje, že až jedna třetina ztrát potravin je způsobena mikrobiologickým kažením (Griffiths, 2010). Jak již bylo řečeno, kontaminující mikroflóra není jen příčinou ekonomických ztrát a možnými původci onemocnění. Představuje také hlavní příčinu vzniku biogenních aminů (Fox, 2004).

V této souvislosti představuje samotné zpracování mléka mnoho rizikových faktorů, které ovlivňují chování mikroorganismů během výroby sýrů. Důležité je dbát na správnou výrobní a hygienickou praxi, výběr kultur, dodržovat stanovené technologické postupy a také uplatňovat zásady HACCP. Tím může být dosaženo předcházení vzniku biogenních aminů.

#### 3.1 Hlavní požadavky na kvalitu a bezpečnost mléka

Pro zpracovatele sýrů je nejdůležitější zajištění kvalitního syrového mléka. Požadavky na kvalitu mléka se však často mohou měnit, v závislosti na politických, ekonomických, sociálních nebo technologických faktorech.

Dle nařízení Evropského Parlamentu a Rady (ES) č. 853/2004, kterým se stanoví zvláštní hygienická pravidla pro potraviny živočišného původu, musí být mléko získáno od zdravých zvířat, která nevykazují žádný příznak nakažlivé choroby přenosné mlékem, která jsou v dobrém zdravotním stavu, nevykazují žádné zranění vemene, jež by mohlo mít vliv na mléko a kterým nebyly podány nepovolené látky či přípravky, či nebyla protiprávně ošetřena. U povolených přípravků či látek musí být dodržena ochranná lhůta stanovená pro tyto přípravky.

Kromě mikrobiálního působení, může ke zkáze potravin přispět také fyzikální poškození. Mezi nejčastější příčiny zhoršení kvality mléka patří poškození světlem. Díky oxidaci proteinů a lipidů, vznikají v mléce nepříjemné pachy a příchutě, které jsou znatelné i ve výsledném sýru. Objevit se může spálená či kovová příchut'. Při oxidaci, která je indukována

světlem, hraje také důležitou roli vitamín B<sub>2</sub>, který je přirozenou součástí mléka. Je velmi fotosenzitivní a dokáže generovat singletový kyslík, který nepřímo reaguje s polynenasycenými mastnými kyselinami za vzniku hydroxyperoxidů, čímž podporuje oxidaci lipidů (Griffiths, 2010)

Mezi chemická nebezpečí může patřit obsah reziduí veterinárních léčiv, která mohou představovat zdravotní riziko pro konzumenta. Také mohou způsobit technologické problémy při výrobě sýrů, prostřednictvím inhibice fermentačních procesů (Kadlec, 2012). Syrové mléko dle nařízení 853/2004, nesmí obsahovat rezidua antibiotik, jejichž maximální limity jsou pro jednotlivé druhy antibiotik legislativně upraveny. Syrové mléko také nesmí přesáhnout obsah mikroorganismů (při 30 °C) 100 000 KTJ/ml a obsah somatických buněk v 1 ml musí být menší než 400 000.

## **3.2 Zlepšení bezpečnosti a kvality mléka a sýrů**

### **3.2.1 Správná výrobní a hygienická praxe**

Růst a množení bakterií, které se podílejí na zkáze potravin, je ovlivněn různými faktory a jejich vzájemnou interakcí. Mezi nejdůležitější faktory u sýrů patří hlavně teplota skladování, koncentrace soli a pH. Důležité jsou však i všechny primární faktory, které mohou způsobit přítomnost kontaminantů (Blackburn, 2006). Udržet pod kontrolou všechny tyto faktory, zajišťuje dodržování správné výrobní a hygienické praxe (GMHP – Good Manufacturing and Hygienic Practice). To znamená mít popsány všechny významné postupy, mít zavedený systém řízení pracovníků a systém kontroly dodržování všech postupů. Postupy se týkají dodržování sanitace, údržby, ale také dodržení technologických postupů, receptury apod., (Griffiths, 2010).

Mezi nejdůležitější body správné výrobní a hygienické praxe patří správné projektové řešení provozu, které usnadní snadné čištění a sanitaci a nehrozí křížení cest z čistých a nečistých zón. Dále dopravní prostředky a zařízení musí umožňovat snadnou sanitaci a musí být konstruovány tak, aby se vyloučil výskyt kontaminace. Vyřešeno musí být i zacházení s odpady a zásobování pitnou vodou. Důležité je také zacházení a skladování se samotnou potravinou, obalové materiály, osobní hygiena a školení pracovníků. GMHP tvoří nezbytný předpoklad pro vytvoření funkčního systému analýzy rizika a stanovení kritických kontrolních bodů (HACCP), (Kadlec, 2012).

Vytvoření a zavedení systému HACCP je povinné u všech výrobců potravin, dle nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 853/2004 ze dne 29. dubna 2004 o hygieně potravin. Uplatněním zásad toho systému si je provozovatel potravinářského podniku vědom všech možností, které mohou ohrozit zdravotní nezávadnost produktu. Všechna tato nebezpečí jsou ovládána, tj. trvale sledována. Proto lze včas přijmout nápravná opatření, pokud postup neprobíhá správně, která vyloučí uvedení zdravotně závadného produktu na trh (Kadlec, 2012). Je také důležité a dle nařízení 853/2004 je i povinné zajistit hygienu zemědělských podniků určených k produkci mléka, dodržovat hygienu při dojení a dodržovat hygienu personálu. Dodržením všech bodů z tohoto nařízení, je zajištěna ochrana sýrů nejen před mikrobiální kontaminací, ale také před jinými biologickými, fyzikálními a chemickými nebezpečími.

### 3.2.2 Možné způsoby zajištění bezpečnosti sýrů pomocí přírodních látek

Spotřebitelé hledají stále více čerstvých přírodních produktů, které byly co nejméně ošetřovány. Výrobci proto hledají nové zemědělské a výrobní postupy a snaží se zákazníkovi požadavky splnit a dodržet (Griffiths, 2010). Řešením může být použití přírodních antimikrobiálních látek.

Mezi takové látky, které se v sýrech již nacházejí ze syrového mléka, patří enzymy. Nejdůležitějším enzymem je laktoperoxidáza, která zůstává u sýrů aktivní, jelikož se při výrobě nepoužívá vysoká pasterace (Sun, 2005). Dalšími důležitými enzymy, které tvoří obranné systémy proti bakteriím je například laktoferin a lysozym. Lysozym je nejvíce aktivní proti gram pozitivním bakteriím, jelikož nemají tak silnou vnější membránu, jako bakterie gram negativní (Taylor, 2014).

Také samotné bakterie mohou být zdrojem přírodních antimikrobiálních látek. Patří mezi ně bakteriociny, nejznámější nisin, který byl již popsán v předchozích kapitolách a dále natamycin. Natamycin, se někdy nazývá pimaricin a je to antimykotikum vytvářené bakteriemi *Streptomyces natalensis*. Působí již v nepatrných koncentracích proti kvasinkám a většině plísní, nikoliv však proti bakteriím, proto neovlivňuje kyselé kultury a je vhodný pro použití v sýrech (EFSA, 2018). Podle toxikologických studií vedlo použití vysokých dávek u konzumentů ke snížení příjmu potravy, úbytkům váhy, trávicím potížím a průjmům. Proto se natamycin smí používat pouze k povrchovému ošetření sýrů ve stanovených maximálních koncentracích a dle Evropského úřadu pro bezpečnost potravin (EFSA) nepředstavuje při dodržení těchto limitů riziko pro spotřebitele.



Dalším přírodním antimikrobiálním agens mohou být protektivní kultury. Jak již bylo zmíněno, používají se v boji proti patogenním mikroorganismům, hlavně v důsledku soupeření o životně důležité živiny či produkci antagonistických sloučenin. Nejen LAB se využívají jako protektivní kultury. Využívá se také např. *E. coli*, některé druhy *Bacillus*, z kvasinek například *Saccharomyces*, a z plísní například *Asperillus* (Taylor, 2014). U sýrů se nejčastěji používá rod *Lactobacillus* a *Bifidobacterium*.

Při použití přírodních antimikrobiálních látek do potravin, je potřeba mít zvládnuté řešení mnoha potenciálních problémů, včetně toxikologických a alergenních účinků, sensorické účinky, náklady na suroviny, vliv složky na aktivitu mikroorganismů a absenci negativních účinků (Griffiths, 2010).

### 3.2.3 Možné budoucí trendy v udržení bezpečnosti sýrů

Rychlejší a specifitější detekci bakterií, jejich stanovení a identifikaci v mléčných výrobcích, by usnadnilo zavedení nových metod do mlékárenského průmyslu, které by nahradily klasické mikrobiologické techniky. Tyto techniky by mohly být zaměřeny na zkoumání bakteriálního genomu, což by umožnilo například přesnější stanovení doby použitelnosti (či minimální doby trvanlivosti) u potravin a zavedení účinnějších kontrolních opatření (Griffiths, 2010).

Rozšířenější aplikace molekulárních metod do mikrobiologie, by mohla přinést také větší porozumění bakteriím a možná i nové taxonomické rozdělení. Od dob, kdy byly tyto pokročilejší metody genetické typizace častěji využívány ve výzkumu, prošla klasifikace domény bakterií mnoha změnami, včetně vzniku nových druhů, poddruhů a dokonce i rodů. I když jsou tyto metody v současné době používány spíše k lepšímu pochopení a popsání charakteristiky patogenů a jejich úlohy v patogenezi, bylo by možné tyto metody využít i pro hlubší pochopení jejich mechanismu při kažení potravin (Blackburn, 2006).

Novým, stále zcela neprozkoumaným fenoménem, je tzv. *quorum sensing*. Je to proces, který tvoří základ mezibuněčné komunikace, kdy bakterie díky výměně signálních molekul mohou vnímat a specificky reagovat. Tímto mechanismem jsou bakterie schopny vytvářet biofilm a udržovat si v něm optimální hustotu populace (White, 2007). Předpokládá se, že každý typ bakterie má své vlastní komunikační schopnosti a také, že tento jev hraje důležitou roli hlavně u řady patogenních bakterií (např. *E. coli* O157, *Yersinia enterocolitica*), (Griffiths, 2010). Biofilm je v mlékárenském průmyslu nezbytné rychle odstraňovat a je nutné vytvářet preventivní opatření proti jeho vzniku. Díky biofilmu jsou však bakterie

více perzistentní a také si rychleji dokážou vytvořit rezistenci vůči dezinfekčním prostředkům (White, 2007). Prevence před tvorbou biofilmu by spočívala v interferenci s bakteriálními signálními molekulami (mezi nejlépe prostudované patří N-acyl-homoserin laktony). S větším porozuměním *quorum sensing*, signálních molekul a genů, které jsou do tohoto procesu zapojeny, by mohlo být možné tento proces narušit a potenciálně tak zabránit kažení potravin. Představuje to tedy alternativní intervenční strategii, která by mohla vytvořit zcela nové možnosti v prevenci před výskytem kontaminantů a patogenních mikroorganismů v potravinách (Blackburn, 2006).

## **II. PRAKTICKÁ ČÁST**

## 4 METODIKA

### 4.1 Výroba modelových vzorků

Modelové vzorky byly tvořeny sýry holandského typu s nízkodohřívanou sýřeninou, které byly vyrobeny v technologických laboratořích Ústavu technologie potravin Fakulty technologické. Celkem bylo vytvořeno 6 různých šarží sýrů. Výrobní postup i základní kultura byly pro všechny šarže shodné. U všech sýrů (s výjimkou kontrolní šarže) byl použit stejný producent biogenních aminů *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 946 a modelové šarže se lišily použitím protektivní kultury, která je schopna degradace biogenních aminů.

- Pro výrobu sýru P, byl použit pouze producent biogenních aminů
- Pro výroby sýru A, byl přidán degradér biogenních aminů *Lactobacillus casei* CCDM 422
- Pro výrobu sýru B, byl použit degradér *Lactobacillus plantarum* CCDM 187
- Pro výrobu sýru C, byl použit degradér *Lactobacillus plantarum* CCDM 189
- Pro výrobu sýru D, byl použit degradér *Lactobacillus casei* CCDM 198
- Pro výrobu sýru K, byl použit pouze smetanový provozní zákys – kontrolní vzorek

#### 4.1.1 Materiál a pomůcky

- Syrové mléko
- Lyofilizovaná smetanová mezofilní kultura (Lactoflora, Milcom a.s., Česká republika)
- Nasycený roztok  $\text{CaCl}_2$  (Milcom a. s., Česká republika)
- Syřidlo Chymax 200 (Chr. Hansen, Dánsko)
- Potravinářská sůl (Herold řeznické potřeby s. r. o., Česká republika)
- Antimykotický přípravek (Delvocid XT1, DSM, Nizozemsko)
- 8% kyselina peroctová (Diversey, Česká republika)
- Laboratorní odstředivka FT15 (Armfield, Velká Británie)
- Výrobník sýrů (Driml s.r.o., Česká republika)
- Lisovací vana a lisovací formy (Driml s.r.o., Česká republika)
- Sýrařské plachetky
- Vakuová balička (Henkelman, Nizozemsko)
- Zrací komora (Candy, Itálie)

- Analytické váhy
- Vyvíječ vodní páry
- Germicidní UV lampa
- Zkumavky, automatické pipety, odměrné válce, teploměr se sondou, mixér, síto.

#### 4.1.2 Postup výroby modelových vzorků

Před zahájením práce byly prostory technologické laboratoře vysvíceny UV germicidní lampou, pro snížení rizika sekundární kontaminace. Také veškeré pomůcky, které přišly do styku s potravinou, byly ošetřeny UV světlem, nebo dezinfikovány ponorem do kyseliny peroctové a následně důkladně opláchnuty pitnou vodou. Použité nádoby, výrobník a lisovací vana byly před použitím ošetřeny parou pomocí vyvíječe vodní páry.

Pro výrobu jedné šarže bylo zpracováno 35 l syrového kravského mléka. Surové mléko bylo nejprve zahříváno na teplotu 37 °C, poté bylo převedeno do odstředivky a smetana i odstředěné mléko byly sbírány do předem připravených nádob. Poté se provedla standardizace mléka na požadovaný obsah tuku v sušině 45 %, smísením smetany a odstředěného mléka na celkový objem 35 l. Následně se provedla šetrná pasteurace diskontinuálním způsobem ve výrobniku při teplotě 72 °C po dobu 30 vteřin. Tepelně ošetřené mléko se rychle zchladilo na inokulační a sýřicí teplotu 32±1 °C. Poté se provedla aplikace připraveného provozního zákysu (v celkovém objemu 160 ml) a 17,5 ml nasyceného roztoku CaCl<sub>2</sub>. Takto připravená směs se dokonale promíchala a za současného míchání se nechala 20 minut prokysat. Po prokysání se do mléka přidalo 5 400 µl syřidla, ředěného v desetinásobku pitné vody. Směs se intenzivně promíchala a poté se ponechala v klidu po dobu 30 minut.

Poté se sýřenina prokrojila sýrařskými harfami a opět se nechala 10 minut odpočinout. Následně se sýřenina opatrně rozdrobila a vzniklá sýrařská zrna se míchala ještě 30 minut, aby se podpořilo jejich vytužení. Následně se pomocí síta odebrala část syrovátky a k zrnům se přidala voda o teplotě 60 °C, čímž teplota systému stoupla na 37 °C (cílová teplota dohřívání). Pro udržení této teploty se použil ohřev pomocí mezipláště výrobniku. Za stálého míchání se sýrařské zrno dosoušelo při teplotě 37±1 °C a dosoušení probíhalo po dobu 30 minut.

Po uplynuté době přišlo na řadu lisování a formování sýřeniny. Sýřenina se slila do připravených forem vyložených sýrařskou plachetkou, kde se nechala předlisovat po dobu 20 minut. Pro rovnoměrný odtok syrovátky se sýřenina po 10 minutách otočila. Poté se sýřenina rozdělila do lisovacích forem a lisovala se pomocí lisu s postupně navyšující se

zátěží. Po 90 minutách lisování byly bloky sýrů z forem vyjmuty a otočeny. Následně byly dále lisovány s celkovou dobou 150 minut. Vylisovaná sýřenina se nechala přes noc prokysat.

Na druhý den byly sýry soleny v solné lázni a ošetřeny protiplísňovou suspenzí. Poté byly zabaleny do smrštitelných obalů pomocí vakuové baličky. Sýry se následně uložily ke zrání do zrací komory. Odběr vzorků byl proveden po 1. dni výroby a následně po 14., 28., 56. a 84. dni zrání.

## 4.2 Základní chemická analýza

### 4.2.1 Stanovení obsahu sušiny

Obsah sušiny se stanovil vážkově, jako hmotnostní úbytek po vysušení vzorku. Nejprve se navážily 3 g rozmixovaného sýru do předem vysušených hliníkových misek s křemičitým pískem. Vzorky se uložily do sušárny při teplotě  $105 \pm 1$  °C po dobu 5 hodin a poté se zvážily. Obsah sušiny se vypočítal podle následujícího vzorce:

$$\text{obsah sušiny [hm. \%]} = \frac{(m_3 - m_1)}{m_2} \times 100$$

$m_1$  – hmotnost misky s pískem [g]

$m_2$  – hmotnost misky před sušením [g]

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

### 4.2.2 Stanovení obsahu tuku

Obsah tuku se stanovil butyrometrickou metodou. Navážily se 3 g rozmixovaného sýru, které byly převedeny do butyrometru. Poté se přidalo 14 ml kyseliny sírové, čímž došlo k rozpuštění bílkovin v obalu tukových kuliček. Poté byl butyrometr vložen do vodní lázně o teplotě 65 °C a opatrně promícháván. Po rozpuštění vzorku byl přidán amylalkohol, pro dosažení ostrého rozhraní. Směs se promíchala, a následně se uvolněný tuk odstředil. V kalibrované části butyrometru se odečetl obsah tuku.

Obsah tuku v sušině se vypočítal podle vzorce:

$$\text{obsah tuku v sušině [\%]} = \frac{100 \times t}{s}$$

t – tučnost [%]

s – sušina [%]

#### 4.2.3 Stanovení pH

Pro stanovení pH byl použit vpichový pH metr. U každého vzorku bylo provedeno celkem 6 měření a výsledná hodnota byla stanovena jako průměrná hodnota.

#### 4.2.4 Stanovení obsahu soli

Stanovení soli bylo provedeno pomocí potenciometrické titrace dusičnanem stříbrným. Byl navážen 1 g rozmixovaného vzorku sýru s přesností na 4 desetinná místa. Vzorek byl rozmělněn ve třecí misce s 10 ml teplé destilované vody a kvalitativně převeden do kádinky. Ke vzorku byly přidány 2 ml HNO<sub>3</sub> a poté byl vzorek doplněn destilovanou vodou tak, aby bylo možné ponořit elektrody a teploměr. Kádinka byla titrována roztokem dusičnanu stříbrného a byly zaznamenány hodnoty napětí vždy po 0,5 ml přídavku. Obsah soli byl vypočten z druhé derivace.

### 4.3 Texturní profilová analýza

Vzorky byly dále podrobeny texturní profilové analýze pomocí analyzátoru textury TA.XT Plus. Ze středu sýru byly vykrojeny tři válcové vzorky o průměru 35 mm a výšce 20 mm. Pro kompresní test se použila cylindrická sonda o průměru 50 mm a vzorek byl stlačen o 25 % původní výšky. Ze zátěžové křivky se odečetla hodnota tvrdosti jako maximální síla získaná měřením kompresního testu. Kohezivnost vzorku se vypočítala jako podíl ploch píků druhého a prvního kompresního cyklu. Posledním parametrem je lepivost, která je definována jako práce potřebná k odtržení sondy od povrchu vzorku.

### 4.4 Mikrobiologický rozbor

Pomocí mikrobiologického rozboru byl u každého vzorku stanoven celkový počet mikroorganismů, počet mezofilních laktokoků a streptokoků, počet bakterií mléčného kvašení a dále počet koliformních bakterií a enterokoků pro sledování sekundární kontaminace.

Mikrobiologický rozbor byl proveden ve spolupráci s Ústavem inženýrství ochrany životního prostředí, Fakulty technologické.

Z každého sýru bylo sterilně odebráno 5 g vzorku ke kvantitativnímu kultivačnímu vyšetření. Ke vzorku bylo přidáno 45 ml fyziologického roztoku a směs byla uložena do homogénizátoru po dobu 3 minut. Poté byla připravena řada desetinásobného ředění a každá zkumavka byla důkladně promíchána na vortexu. Na povrch kultivačních půd bylo odebráno 100  $\mu$ l vzorku metodou roztěru z každého ředění. Mikrobiologickému rozboru bylo také podrobena syrové a pasterované mléko.

Počet mikroorganismů se vypočítal jako vážený průměr ze dvou po sobě jdoucích ředění podle následujícího vzorce:

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

$\sum C$  – součet kolonií ze všech ploten

V – objem inokula očkovaného na každou z ploten [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

Výsledkem je stanovení počtu KTJ – kolonie tvořících jednotek, v 1 g (ml).

Pro stanovení celkového počtu mikroorganismů byla použita neselektivní živná půda PCA (Plate Count agar) a misky byly kultivovány aerobně při 30 °C po dobu 48 hodin. Pro stanovení počtu mléčných koků byla zvolena půda M17. Kultivace probíhala při 37 °C po dobu 48 hodin za aerobních podmínek. Pro stanovení počtu mléčných tyčinek byla použita arbitrážní půda MRS agar (De Man, Rogosa a Sharpe agar). Inokulované plotny se inkubovaly anaerobně při 30 °C 48 hodin. Počet koliformních bakterií byl stanoven pomocí kultivace na selektivně diagnostické půdě EA agar (Endův agar) při teplotě 30 °C po dobu 48 hodin aerobně. Pro stanovení enterokoků byl použit SB agar (Slanetz-Bartley) a kultivace byla provedena při 37 °C po dobu 48 hodin aerobně.

#### 4.5 Stanovení obsahu biogenních aminů

Nejprve byla provedena extrakce pomocí kyseliny chloristé. Vzorek sýru byl rozmixován a lyofilizován. K 1 g lyofilizátu bylo přidáno 10 ml kyseliny chloristé. Směs byla promíchána na vortexu a třepána na třepačce po dobu 40 minut. Poté byl vzorek odstředěn



a ke vzniklému supernatanu bylo přidáno 7 ml kyseliny chloristé a promícháno. Celý proces byl ještě dvakrát opakován a nakonec byl supernatan přefiltrován a nepipetován do mikrozkušavek.

Po extrakci se provedla derivatizace vzorku. Ke vzorku bylo přidáno 100  $\mu$ l 1,7 - heptandiaminu o koncentraci 500 mg/l jako vnitřního standardu. Poté bylo odpipetováno 1 ml do derivatizační nádoby a přidáno 1,5 ml karbonátového pufru s pH 11,1 – 11,2. Poté se přidaly 2 ml čerstvě připraveného roztoku dansylchloridu. Vzorek byl protřepáván v temnu po dobu 20 hodin. Následně bylo ke vzorku přidáno 200  $\mu$ l prolinu a třepáno další hodinu. Po uplynutí stanovené doby se k vzorku přidalo 5 ml heptanu a vzorky se 3 minuty ručně třepaly. Poté se odpipetoval 1 ml heptanové vrstvy do vialky. Vzorky se odpařily pod proudem dusíku do sucha a suchý odparek byl zředěn 1,5 ml acetonitrilu.

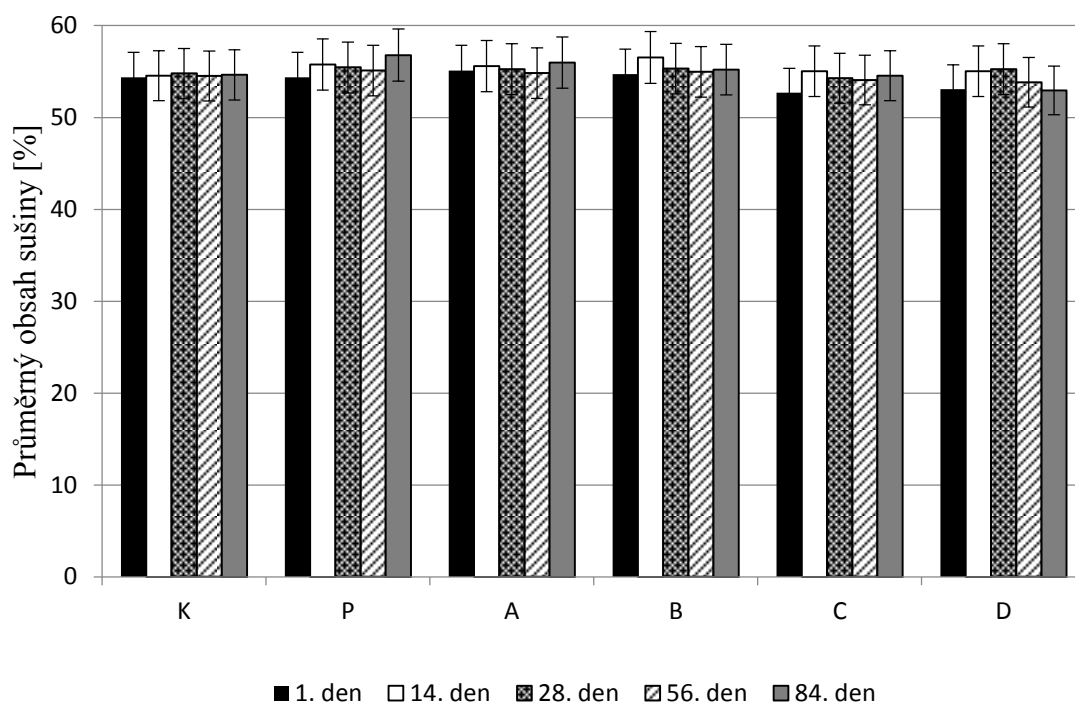
Takto připravený vzorek byl ještě přefiltrován přes stříkačkový filtr s porozitou 0,22  $\mu$ m a dávkován do chromatografického systému. Výsledky byly hodnoceny pomocí Chromeleon, měření probíhalo při vlnové délce 254 nm.

## 5 VÝSLEDKY A DISKUZE

### 5.1 Základní chemická analýza

#### 5.1.1 Stanovení obsahu sušiny

U modelových vzorků sýrů v průběhu zrání bylo provedeno stanovení obsahu sušiny. Výsledky jsou uvedeny na Obrázku č. 4.



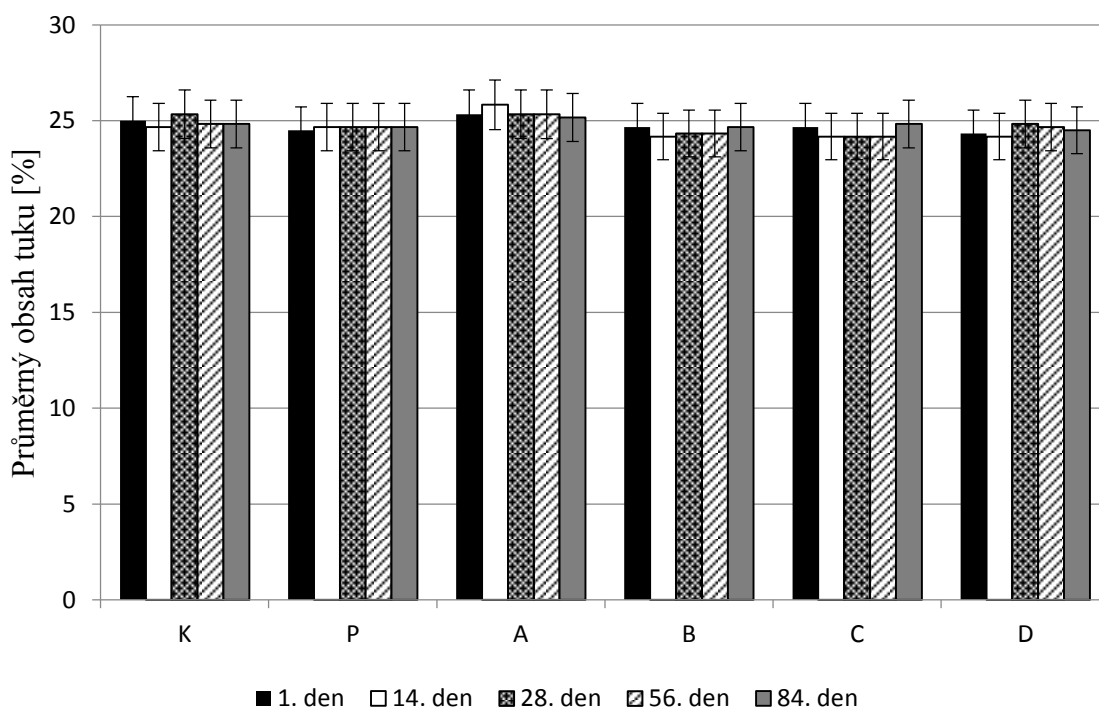
Obrázek č. 4: Vývoj obsahu sušiny u modelových vzorků sýrů v průběhu zrání

Z grafu lze vyčíst, že průměrný obsah sušiny v průběhu celého zrání byl u všech vzorků srovnatelný a pohyboval se okolo  $55 \pm 0,66$  %. V průběhu zrání byl pozorován vývoj obsahu sušiny, nedocházelo ale k významným změnám jak v rámci vzorků samotné šarže, tak ani mezi modelovými šaržemi. Po 14 dnech zrání byl zaznamenán u všech vzorků nárůst sušiny, ale po 28 dnech došlo, kromě kontrolního vzorku k mírnému poklesu. Po 56 dnech zrání došlo opět k poklesu sušiny u všech vzorků. Po 84 dnech došlo k nárůstu sušiny u všech vzorků, kromě vzorku D. Mírný nárůst sušiny lze očekávat kvůli odpařování vody a částečnému vysychání sýrů, jelikož nebyly použity nepropustné obaly. Největší rozdíl byl zjištěn mezi prvním a posledním odběrem v 84. dnu u vzorku P, který obsahuje pouze

producenta biogenních aminů, nikoliv degradéry. U tohoto vzorku došlo k nárůstu sušiny o 2,4 %. Naopak nejmenší nárůst byl zjištěn u vzorku K, kdy došlo k nárůstu sušiny po 84 dnech zrání o pouhých 0,13 %. Tento vzorek obsahoval pouze základní smetanový zákys. U vzorku D, který obsahoval degradéra biogenních aminů *Lactobacillus casei* CCDM 198, došlo k poklesu sušiny o 0,14 % a obsahoval tak nejmenší obsah sušiny ze všech vzorků (52,94 %). Nejvyšší obsah sušiny byl zaznamenán u vzorku P (56,78 %).

### 5.1.2 Stanovení obsahu tuku

Dále bylo provedeno stanovení obsahu tuku a stanovení obsahu tuku v sušině. Na Obrázku č. 5 je zobrazen obsah tuku u modelových vzorků v průběhu zrání.

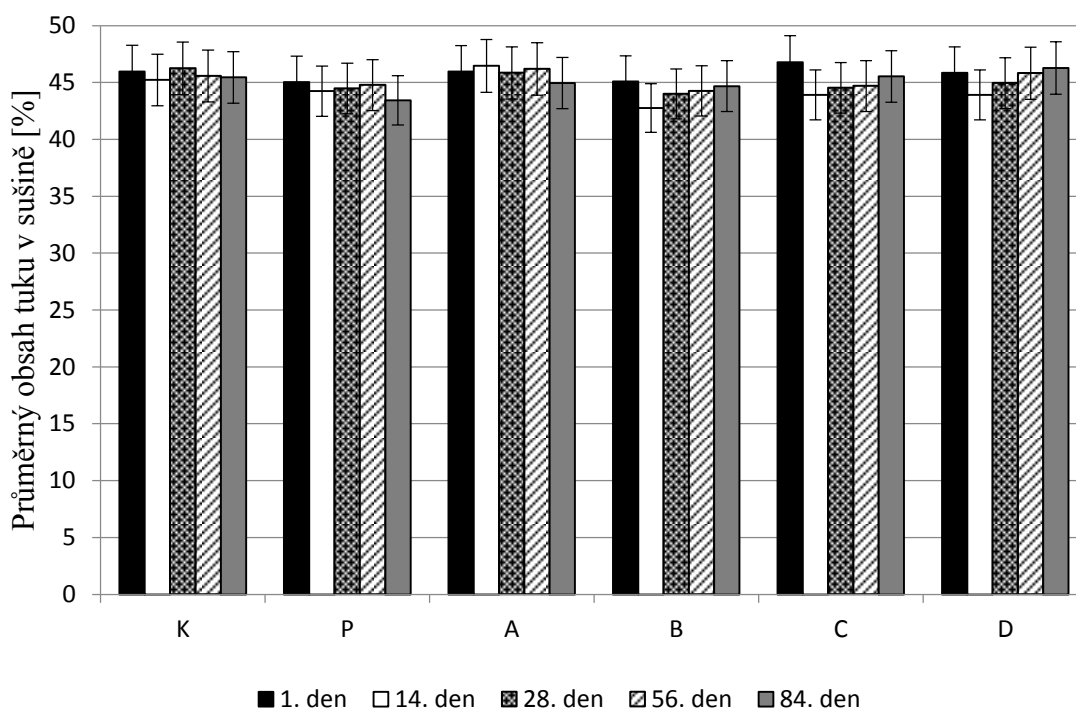


Obrázek č. 5: Vývoj obsahu tuku u modelových vzorků sýrů v průběhu zrání

Měřením bylo zjištěno, že obsah tuku u modelových vzorků se průměrně pohyboval mezi 24,4 % - 25,4 %. Výsledky všech modelových šarží jsou srovnatelné, zaznamenány byly rozdíly u jednotlivých šarží v průběhu zrání v obsahu tuku maximálně do 0,66 %.

V následujícím grafu (Obrázek č. 6) je vyobrazen obsah tuku v sušině v průběhu zrání. Modelové sýry podle obsahu tuku v sušině patří mezi plnotučné sýry (obsah tuku v sušině do 50 %), (Iburg, 2004). V průměru obsahoval vzorek K 45,7±0,05 % tuku v sušině, vzo-

rek P  $44,4 \pm 0,05$  %, vzorek A  $45,9 \pm 0,02$  %, vzorek B  $44,2 \pm 0,03$  %, vzorek C obsahoval  $45,1 \pm 0,03$  % a vzorek D  $45,4 \pm 0,02$  %. Obsah tuku v sušině se u všech vzorků pohyboval v rozpětí mezi 42,76 % - 46,79 %. Lze tedy konstatovat, že během výroby všech modelových šarží byly zajištěny vhodné podmínky standardizace a vzorky jsou tak mezi sebou porovnatelné i v dalších sledovaných parametrech. Při detailnějším srovnání měřených výsledků lze říci, že největší rozdíl v naměřených hodnotách se nacházel u vzorku B po 14 dnech zrání, kdy došlo k poklesu obsahu tuku o 2,33 % a u vzorku C o 2,87 %. V ostatních případech rozdíl naměřených hodnot nepřesáhl 1,5 %. Průměrné hodnoty sýrů se u jednotlivých vzorků mírně lišily, což mohlo být způsobeno ztrátami tuku do syrovátky, při kterých dochází při zpracování sýřeniny (Fox, 2004). Z grafů je patrné, že v průběhu zrání po dobu 84 dnů nedocházelo k výrazným změnám v obsahu tuku a v obsahu tuku v sušině u modelových vzorků sýrů.

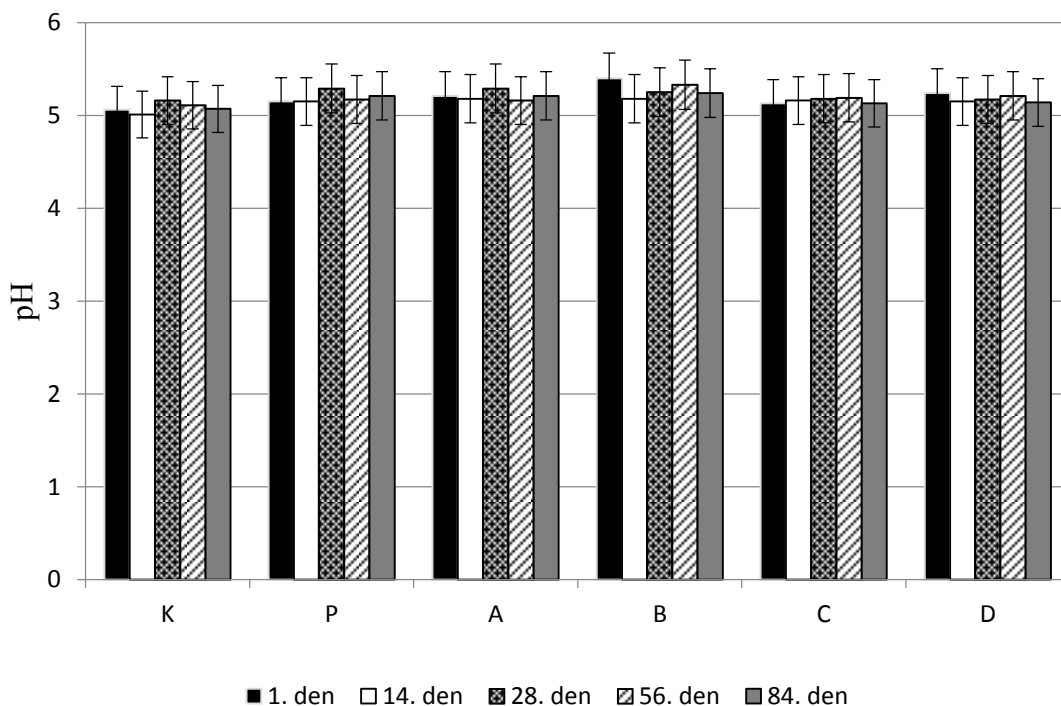


Obrázek č. 6: Obsah tuku v sušině u modelových vzorků sýrů v průběhu zrání

### 5.1.3 Stanovení pH

V průběhu zrání byl analyzován vývoj pH u modelových vzorků a výsledky jsou zaznamenány v následujícím grafu (Obrázek č. 7). Dle Weiber (2007) sýry holandského typu obsahují na počátku lisování asi 1,4 % laktózy a již během 24 hodin je laktóza pomocí LAB rozložena na kyselinu mléčnou. K největšímu okyselení tedy dojde v první hodině

po vylisování. Na začátku tvarování sýřeniny se pH zpravidla pohybuje v rozpětí 6,2 – 6,4. Během lisování je potřeba, aby hodnota pH klesla na hodnotu 5,0 – 5,15. Při vyšší hodnotě pH jsou sýry žlutější a tvoří se v něm více ok (McSweeney, 2017).



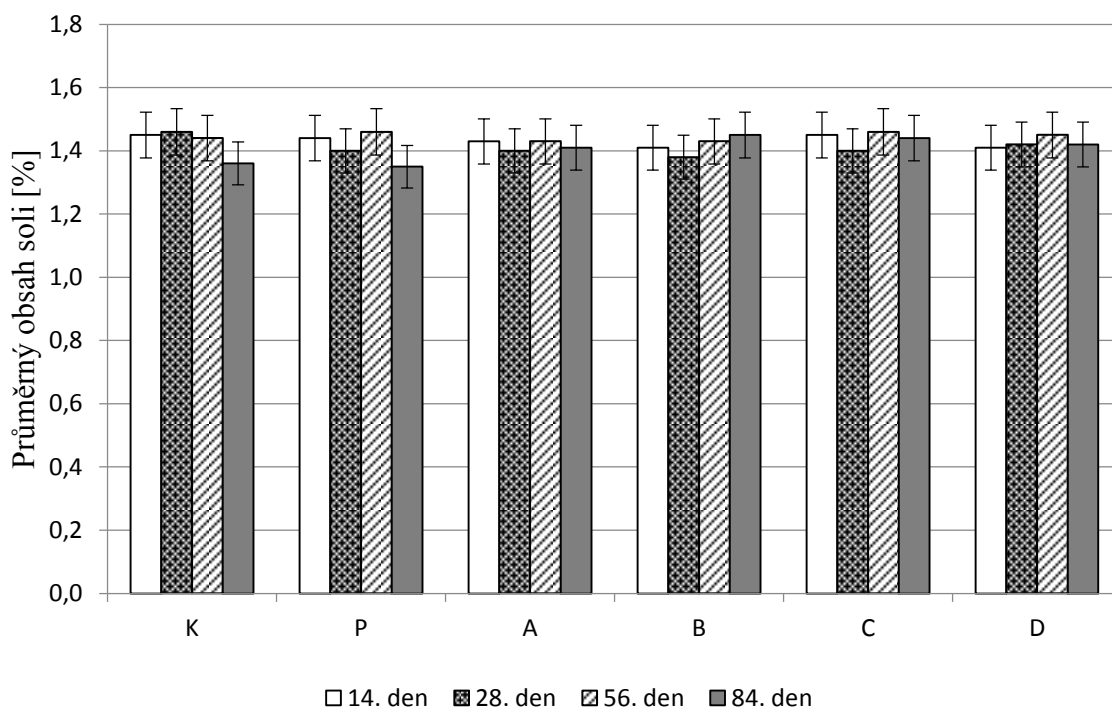
Obrázek č. 7: Vývoj pH u modelových vzorků sýrů v průběhu zrání

Hodnoty pH se u vzorku K pohybovaly v průměru  $5,1 \pm 0,06$ , u vzorku P, A, C, D bylo pH průměrně  $5,2 \pm 0,05$  a u vzorku B byly hodnoty pH průměrně okolo  $5,3 \pm 0,09$ . Po 14 dnech zrání došlo u většiny vzorků (K, A, B, D) k mírnému poklesu pH, což bylo způsobeno okyselením vlivem kyseliny mléčné. V 28. dni zrání byl zaznamenán největší nárůst pH u vzorku K, P a A. U vzorku B, C a D byl největší nárůst pH zaznamenán až v 56. dnu zrání, v 84. dnu došlo opět k poklesu. Nárůst pH během zrání mohl být způsoben proteolýzou aminokyselin, kdy dochází k uvolnění amoniaku, který má zásaditý charakter (Fox, 2004). Během zrání sýrů však nedošlo k výrazným změnám ve vývoji pH.

#### 5.1.4 Stanovení soli

Dále bylo u modelových vzorků provedeno stanovení soli. Jelikož se první odběr prováděl před solením sýrů, jsou v následujícím grafu (Obrázek č. 8) uvedeny pouze hodnoty od 14. dne zrání. Průměrné hodnoty obsahu soli u modelových šarží nevykazovaly velké

rozdíly a průměrný obsah soli u všech vzorků byl  $1,4 \pm 0,01$  %. Největší rozdíl hodnot mezi jednotlivými odběry nepřesáhl 0,11 %. Zjištěné výsledky obsahu soli potvrzují vhodně nastavené podmínky výroby všech modelových šarží. Faktory fyzikálně-chemické povahy tak působily na vývoj sledovaných parametrů v obdobné intenzitě, což je podstatné pro srovnání nejvýznamnějších sledovaných vlastností a dějů v průběhu zrání modelových šarží.



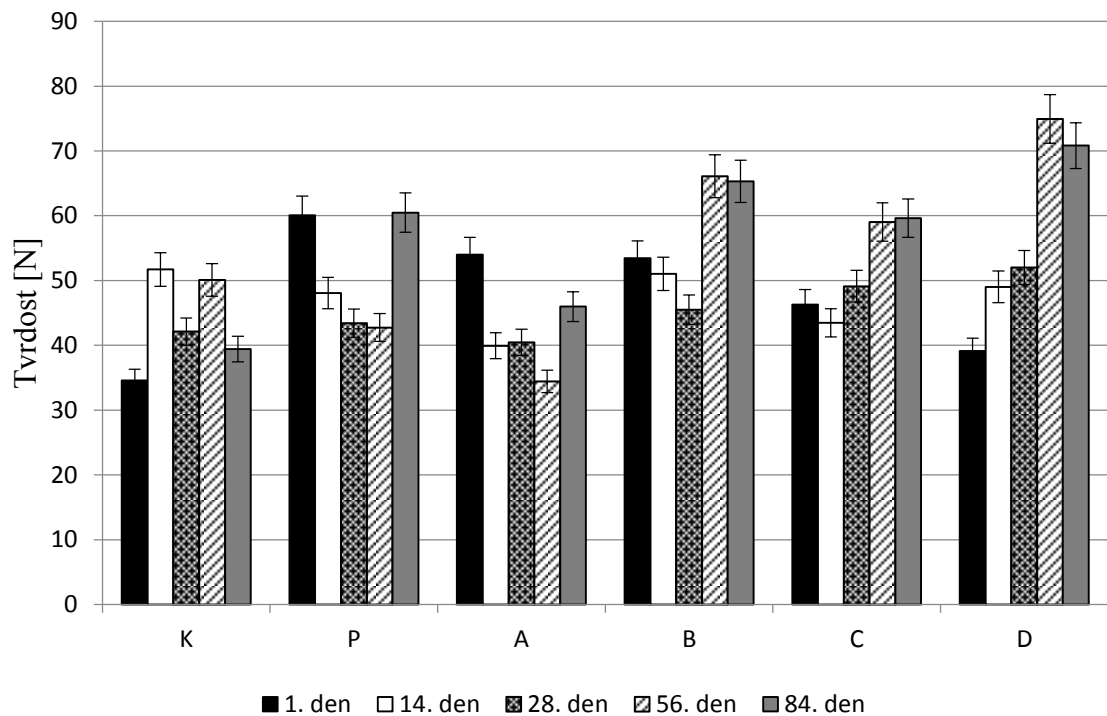
Obrázek č. 8: Stanovení obsahu soli u modelových vzorků sýrů v průběhu zrání

## 5.2 Texturní profilová analýza

Dále byla u modelových vzorků provedena texturní profilová analýza. Provedeno bylo měření tvrdosti, měření kohezivnosti a měření lepivosti sýrů. Hodnocení tvrdosti v průběhu zrání je zaznamenáno na Obrázku č. 9.

Z grafu je patrné, že tvrdost se u jednotlivých vzorků nepravidelně měnila a také mezi modelovými šaržemi se nacházely větší rozdíly. Vlivem proteolýzy a rozpadu proteinové matrice by během zrání mělo docházet spíše k postupnému poklesu tvrdosti (Fenelon, 2007). V 84. dni zrání však byla (kromě vzorku A), u všech vzorků zaznamenána vyšší hodnota tvrdosti oproti prvnímu dni, což není v souladu s literaturou. Vývoj textury sýrů je kromě hydrolýzy bílkovin závislý například na aktivitě vody, která mohla tvrdost sýrů také ovliv-

nit. Ke změnám v aktivitě vody dochází prostřednictvím nově vzniklých karboxylových kyselin a aminoskupin, které se uvolňují v důsledku hydrolýzy peptidových vazeb (Fox, 2007).

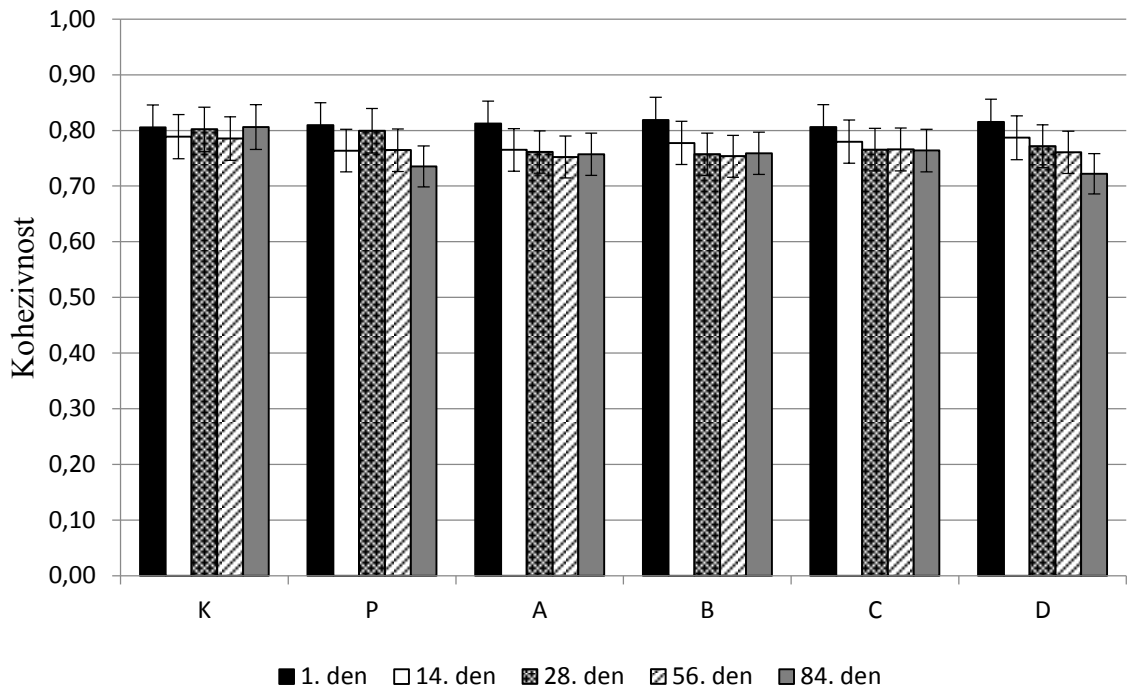


Obrázek č. 9: Stanovení tvrdosti u modelových vzorků sýrů v průběhu zrání

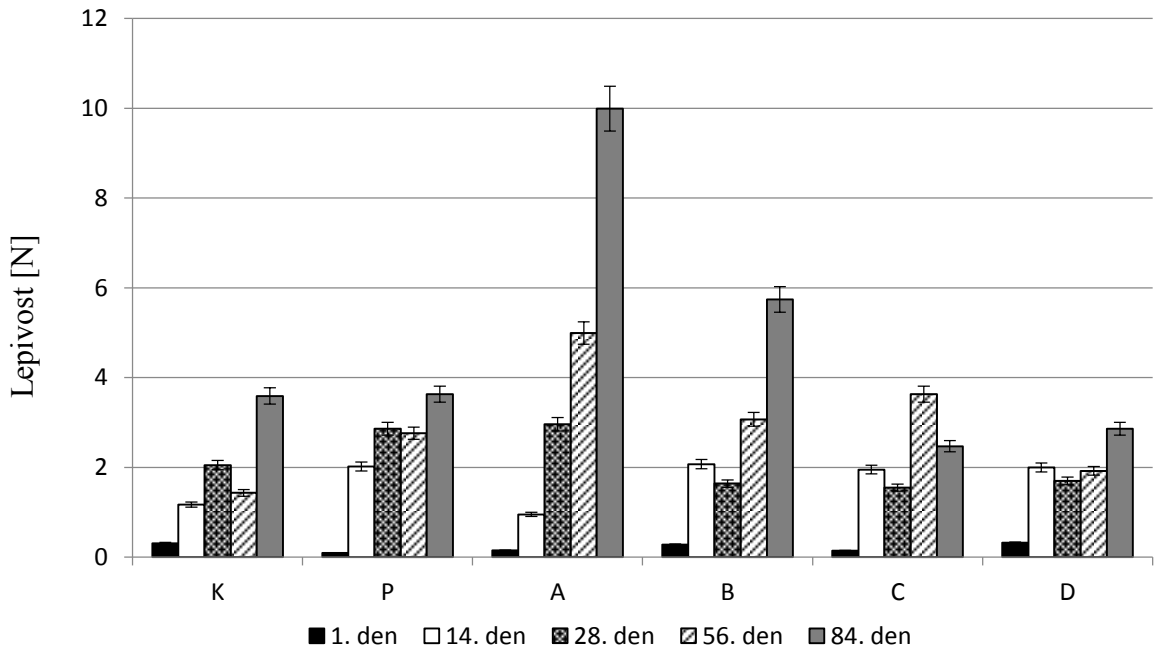
Texturu také nepřímo ovlivňuje zvýšené pH, které může být způsobeno uvolněním složek zásadité povahy z aminokyselin (viz analýza pH po 84 dnech zrání na Obrázku č. 7).

Hodnocení kohezivnosti je znázorněno na Obrázku č. 10. Tento parametr by měl, stejně jako tvrdost, vykazovat klesající charakter. Během prvních týdnů skladování by měl být dle Skibsted (2010) trend pomalejší, ale s rostoucím stupněm proteolýzy (autor uvádí 10 týdnů) by mělo dojít k většímu poklesu kohezivnosti sýrů.

U všech vzorků, kromě kontrolního vzorku K, byl skutečně klesající trend zaznamenán. K největšímu poklesu kohezivnosti za 84 dní došlo u vzorku D (pokles o 0,1), který obsahoval degradující kmen *Lactobacillus casei* CCDM 198. U modelového vzorku K, který obsahoval pouze základní smetanový zákys, došlo v průběhu zrání k mírným výchytkám, ale na konci zrání byla kohezivnost stejná jako po prvním dni výroby (0,81). U ostatních vzorků došlo k mírnějšímu poklesu kohezivnosti P (0,07), A (0,05), B (0,06) a C (0,05).



Obrázek č. 10: Stanovení kohezivnosti u modelových vzorků sýrů v průběhu zrání



Obrázek č. 11: Stanovení lepivosti u modelových vzorků sýrů v průběhu zrání

Z Obrázku č. 11 je jasně viditelné, že lepivost se mezi jednotlivými šaržemi modelových vzorků výrazně lišila. Výrazné rozdíly v lepivosti sýrů byly zaznamenány také při práci



s modelovými vzorky a při odběru vzorků. Z grafu lze také vyčíst, že se lepivost v průběhu zrání u jednotlivých vzorků zvyšovala oproti 1. dni. Největší nárůst lepivosti byl zaznamenán u vzorku A (síla potřebná k odtržení sondy od povrchu vzorku byla 9,99 N), který obsahoval kmen bakterií *Lactobacillus casei* CCDM 422. Dále byla vysoká hodnota lepivosti sledována u vzorku B (5,74 N), který obsahoval kmen *Lactobacillus plantarum* CCDM 187. Poté sýr K (který obsahuje pouze základní smetanový zákys) vykazoval lepivost 3,59 N a vzorek P (který obsahuje producenta biogenních aminů *Lactobacillus casei* CCDM 422) lepivost 3,63 N. Vzorek C (degradující kmen *Lactobacillus plantarum* CCDM 189) vykazoval lepivost 2,47 N a vzorek D (degradující kmen *Lactobacillus casei* CCDM 198) lepivost 2,86 N. Dle dosažených výsledků by se dalo říci, že lepivost sýrů (mimo jiné faktory) je závislá také na použitém kmenu bakterií.

### 5.3 Mikrobiologický rozbor

Pomocí mikrobiologické analýzy byly provedeny rozborů modelových vzorků na kvantitativní stanovení celkového počtu bakterií (CPM), mléčných laktokoků a streptokoků, bakterií rodu *Lactobacillus*, enterokoků a koliformních bakterií. Mikrobiologický rozbor byl pro kontrolu proveden i u syrového a pasterovaného mléka (Tabulka č. 2. a 3.).

Syrové mléko [log KTJ/ml]					
Označení mléka	CPM	mezofilní laktokoky a streptokoky	bakterie rodu <i>Lactobacillus</i>	koliformní bakterie	enterokoky
K	4,21	3,73	2,71	2,19	0,96
P	4,16	3,74	2,34	0,00	1,56
A	4,51	3,64	7,33	3,06	2,73
B	4,13	2,86	2,10	3,15	2,04
C	4,36	4,45	2,30	2,10	3,36
D	4,46	3,37	2,34	3,46	0,00

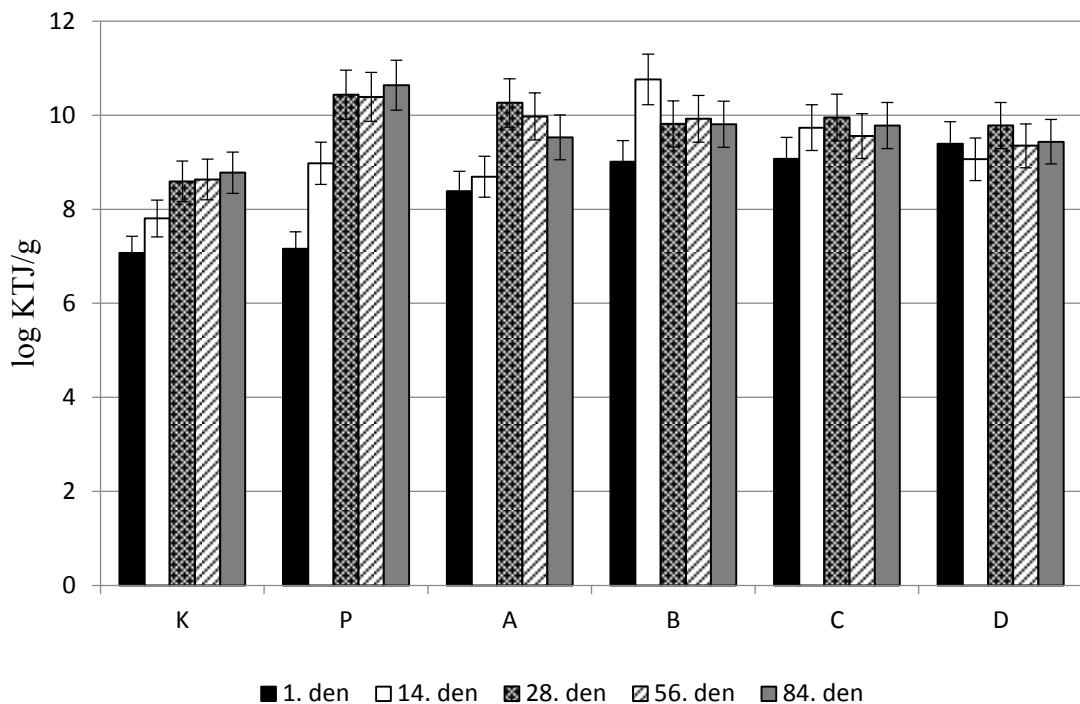
Tabulka č. 2: Počty mikroorganismů v syrovém mléce pro výrobu modelových vzorků

Pasterované mléko [log KTJ/ml]					
Označení mléka	CPM	mezofilní laktokoky a streptokoky	bakterie rodu <i>Lactobacillus</i>	koliformní bakterie	enterokoky
K	2,34	1,86	0,00	0,00	1,26
P	2,71	1,26	0,00	0,00	0,00
A	2,07	1,66	0,00	0,00	0,00
B	2,46	0,00	0,00	0,00	0,00
C	0,00	0,00	2,86	0,00	0,00
D	1,66	1,91	1,26	2,00	0,00

Tabulka č. 3: Počty mikroorganismů v pasterovaném mléce

Po srovnání obou tabulek je patrné, že v pasterovaném mléce se nacházelo výrazně méně vegetativních forem bakterií, tudíž se dá říci, že pasterace byla účinná. V pasterovaném mléce, až na výjimky, nebyly detekovány žádné koliformní bakterie (kromě vzorku K), a žádné bakterie rodu *Enterococcus* (kromě vzorku D). Zároveň také došlo ke snížení počtu mléčných koků a mléčných tyčinek.

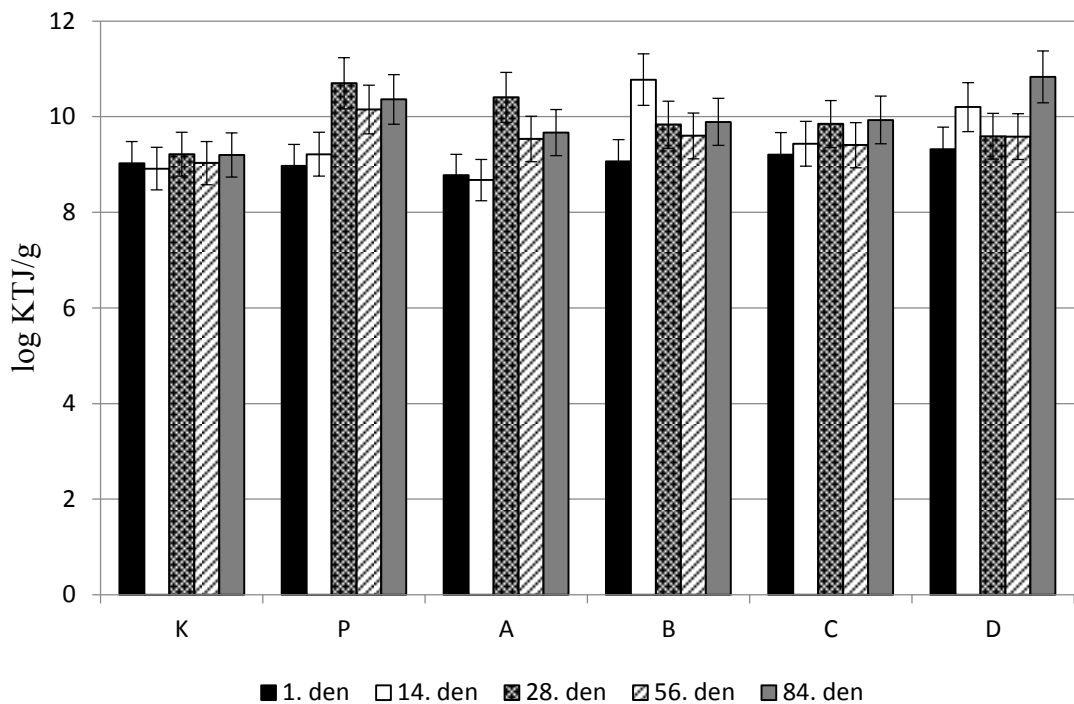
Výsledky z mikrobiologického rozboru sýrů jsou uvedeny v následujících grafech. Obrázek č. 12 znázorňuje celkový počet mikroorganismů přítomných v modelových vzorcích v průběhu zrání. V průběhu celého zrání nebyly u modelových vzorků detekovány koliformní bakterie, které mohou způsobovat pozdní duření sýrů (výsledky nejsou uvedeny).



Obrázek č. 12: Vývoj celkového počtu mikroorganismů u modelových vzorků sýrů v průběhu zrání

Na obrázku můžeme pozorovat nepravidelný vývoj bakterií u modelových vzorků sýrů. U vzorku K a P byl pozorován pozvolný nárůst CPM v průběhu zrání. U vzorku K, který obsahoval pouze základní smetanovou kulturu, bylo přítomno po 84 dnech zrání nejméně bakterií (8,78 log KTJ/g). Naopak u vzorku P, který obsahoval i producenta biogenních aminů bylo přítomno nejvíce bakterií po 84 dnech zrání (10,64 log KTJ/g). U vzorků A, B a C, které obsahovaly i degradéry biogenních aminů došlo nejprve ve 14. či 28. dni zrání k nárůstu bakterií, ale poté počet bakterií klesal.

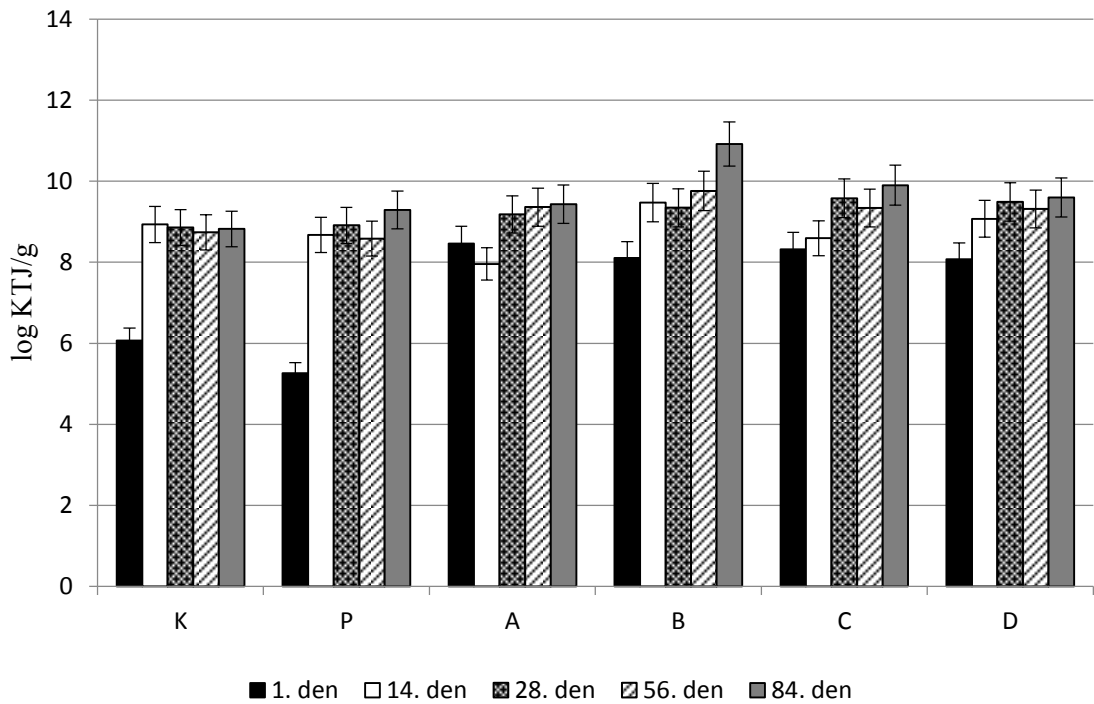
Obrázek č. 13 znázorňuje vývoj mléčných koků. U vzorku P, A, B a C můžeme v průběhu zrání pozorovat mírný nárůst a poté pokles počtu kolonií. U vzorku D došlo v posledním měsíci zrání k největšímu nárůstu počtu kolonií. U vzorku K, u kterého nebyla přidána kultura produkující biogenní aminy *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 946, byly viditelné nejmenší výkyvy v počtu mléčných koků.



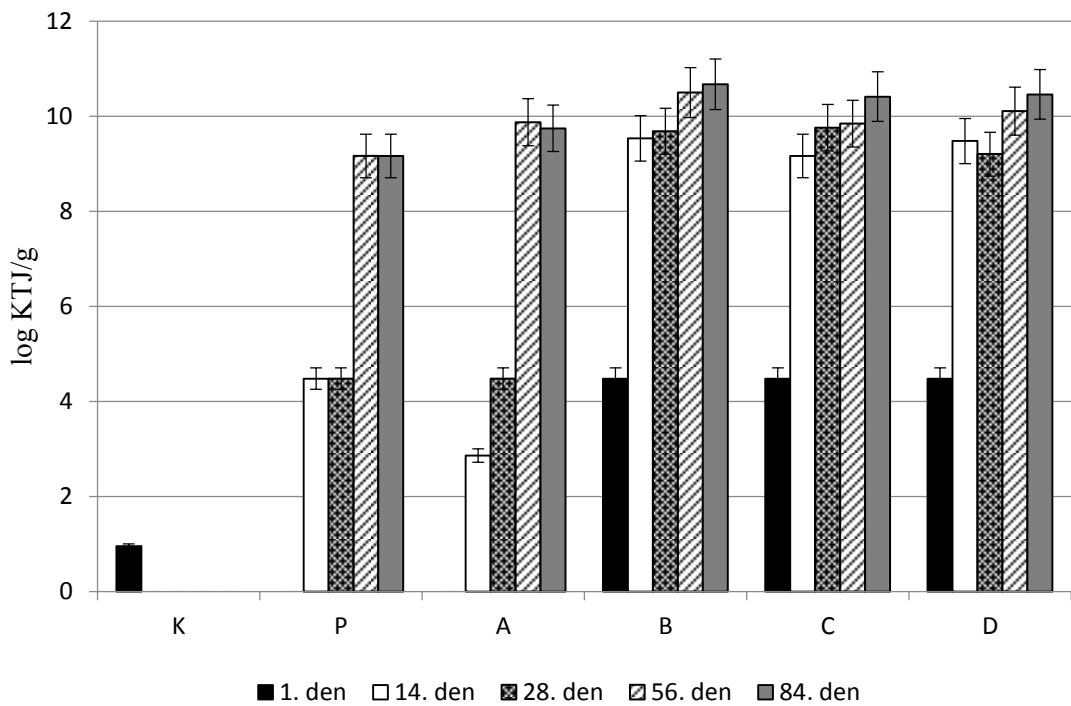
Obrázek č. 13: Vývoj mezofilních laktokoků a streptokoků u modelových vzorků sýrů v průběhu zrání

Na obrázku č. 14 můžeme pozorovat vývoj mléčných tyčinek, tedy bakterií rodu *Lactobacillus*. Z grafu je viditelné, že u vzorku K a P došlo k největšímu nárůstu počtu kolonií po 14 dnech zrání. U vzorku B, C a D došlo k mírnějšímu nárůstu. U vzorku A došlo po 14 dnech k poklesu. V 84. dnu došlo u všech vzorků (kromě vzorku K) ke zvýšení počtu kolonií. Nejmenší počet kolonií obsahovaly vzorky K a P, což jsou vzorky, u kterých nebyly přidány degradéry BA rodu *Lactobacillus*. Broadbent (2016) ve své publikaci uvádí, že počáteční počet bakterií LAB v sýru běžně překročí 9,00 log KTJ/g. K této hranici se blížily pouze vzorky A, B, C a D, tedy vzorky, ke kterým bakterie rodu *Lactobacillus* byly přidány.

Obrázek č. 15 popisuje vývoj enterokoků. U vzorku K se enterokoky vyskytovaly pouze při prvním odběru a poté už nebyly detekovány. U vzorku P a A nebyly kolonie zaznamenány během prvního dne, ale poté se objevil značný nárůst bakterií a v 56. dnu zrání se v počtu kolonií objevil velký skok. U vzorku B, C a D se kolonie objevily už po prvním dni. Největší nárůst byl zaznamenán po 14 dnech a následně počty kolonií vzrůstaly.



Obrázek č. 14: Vývoj mléčných tyčinek u modelových vzorků sýrů v průběhu zrání



Obrázek č. 15: Vývoj enterokoků u modelových vzorků sýrů v průběhu zrání

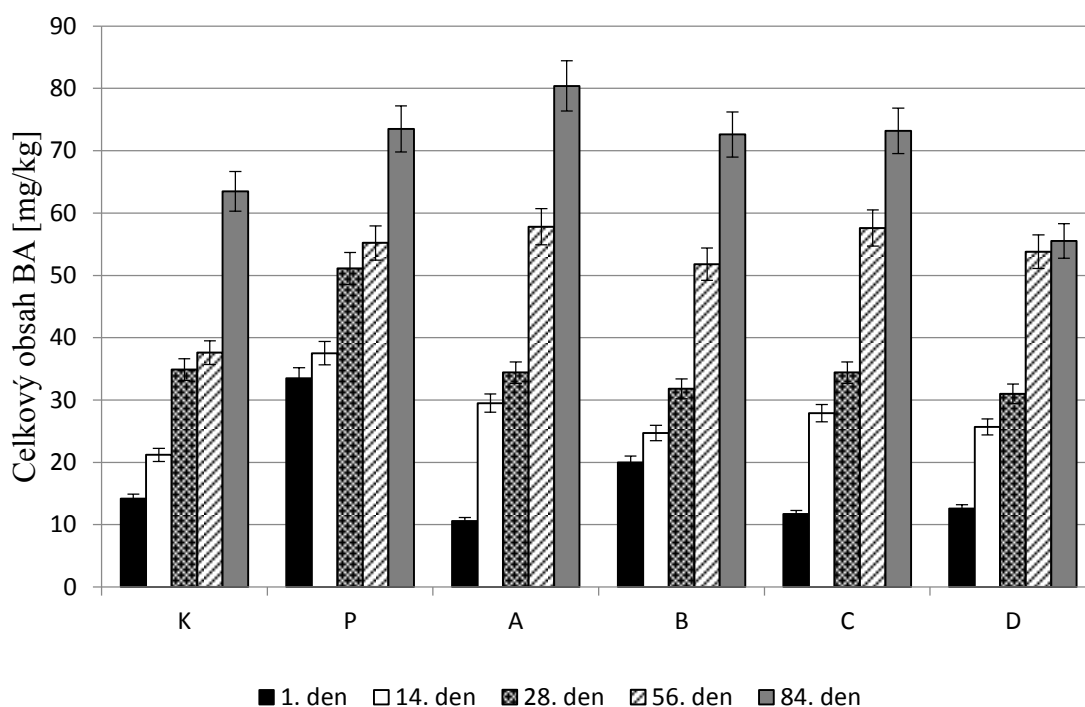
I když se v pasterovaném mléce nenacházely žádné kolonie enterokoků, v modelových sýrech byl jejich vysoký obsah zaznamenán. Přítomnost enterokoků mohla být způsobena sekundární kontaminací při výrobě či přirozenou termorezistentní mikroflórou z mléka, která přežila pasterační teploty. Výskyt enterokoků v sýrech však není ojedinělý. Broadbent (2016) uvádí, že po 3-4 měsících zrání mohou hodnoty non-startérových bakterií, dosáhnout až 7,00 – 8,00 log KTJ/g, i přesto že jejich počáteční hodnota byla nízká (2,00 log KTJ/g). Nakonec jejich obsah může překročit obsah LAB, které odumírají vlivem měnícího se prostředí sýru. Dle Foxe (2004) se v tradičních, řemeslných sýrech vyráběných ze syrového mléka vyskytuje až 7,00 log KTJ/g. Hodnoty enterokoků dosahovaly hodnot až 10,67 log KTJ/g, což byla nejvyšší hodnota zjištěná u sýru B v 84. dnu zrání.

Právě nezákysové bakterie, které jsou příčinou sekundární kontaminace, mohou vytvořit největší obsah biogenních aminů v sýrech. U sýrů v pokročilých stádiích zrání přežívají i za nízké koncentrace laktózy a k získání energie využívají aminokyseliny, což může vést ke vzniku biogenních aminů (Zuljan, 2016).

#### 5.4 Stanovení obsahu biogenních aminů

V modelových vzorcích sýrů byl v průběhu zrání stanoven obsah biogenních aminů. Celkový obsah biogenních aminů je uveden na Obrázku č. 16.

Na obrázku můžeme pozorovat, že v modelových vzorcích se nacházely vysoké koncentrace biogenních aminů a s průběhem zrání se jejich obsah zvyšoval. Vysoký obsah byl zaznamenán i u vzorku K, který neobsahoval kmen produkující biogenní aminy. Na produkci biogenních aminů se tedy pravděpodobně podílely non-startérové bakterie. Vzorek P, který producenta obsahoval, vykazoval dle předpokladu největší nárůst ve srovnání s ostatními vzorky, první den po výrobě a dále ve 14. a 28. dni zrání. Po 56 dnech se ale více BA vyskytovalo u vzorku A, C a D, i když obsahovaly degradující kmeny. Po 84 dnech byl zaznamenán výrazný nárůst u všech vzorků. Vzorek A, přestože obsahoval degradující kmen, dokonce překročil vzorek P, který obsahoval pouze producenta BA, nikoliv degradující kmeny. Můžeme tedy říci, že producent biogenních aminů *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 946, měl vysokou dekarboxylační aktivitu a je tedy schopný výrazné produkce biogenních aminů. K vysoké produkci BA zcela jistě přispělo i pH, které bylo pro jejich vznik u sýrů optimální (McSweeney, 2017).

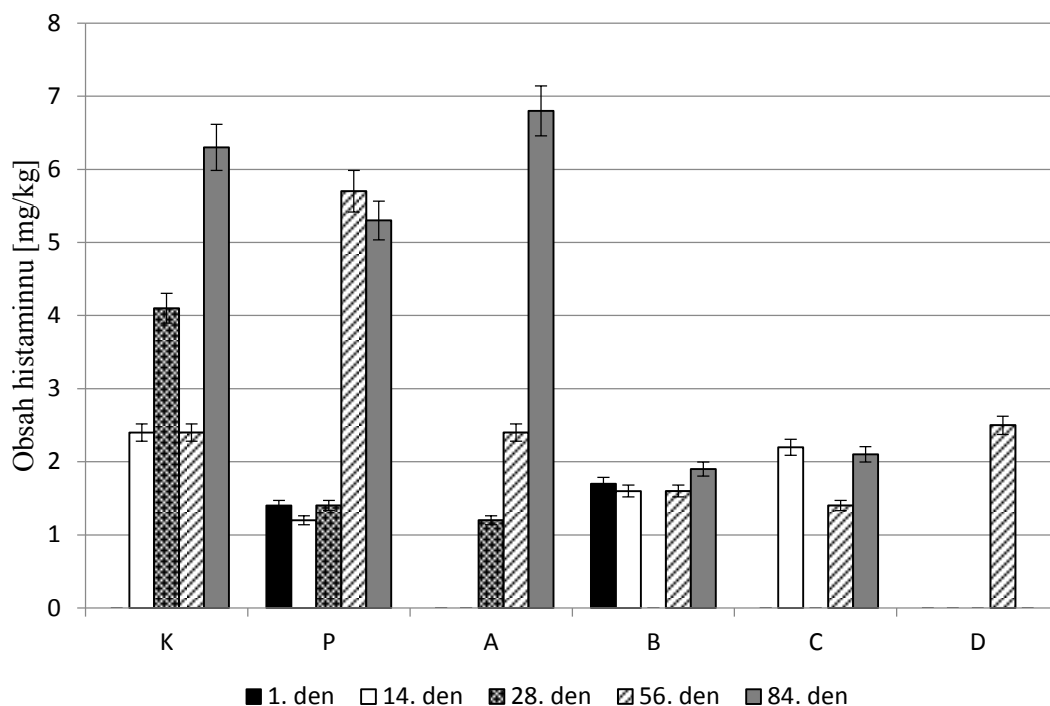


Obrázek č. 16: Stanovení celkového obsahu biogenních aminů u modelových vzorků sýrů v průběhu zrání

I když se biogenní aminy v sýrech vyskytovaly ihned po prvním dni výroby, jejich koncentrace byly velmi nízké. Největší obsah biogenních aminů byl zaznamenán u vzorku A po 84. dnech zrání a to  $80,4 \text{ mg.kg}^{-1}$ .

K produkci BA výrazně přispěly i bakterie rodu *Enterococcus*, jejichž vysoký obsah byl zjištěn při mikrobiologickém vyšetření (Obrázek č. 15). Gardin (2001) uvádí, že *Enterococcus faecalis* produkuje podstatné množství tyraminu a fenylethylaminu v mléce a je tedy charakterizovaný značnou aktivitou dekarboxylázy.

Mezi hlavní biogenní aminy, které se v sýrech mohou nacházet, patří histamin, tyramin, tryptamin, fenylethylamin, putrescin a kadaverin (Fox, 2014). Všechny tyto vyjmenované BA byly v sýrech nalezeny v různých koncentracích a výsledky jsou uvedeny v následujících grafech. Obsah tryptaminu byl shledán pouze u vzorku K po 56 dnech zrání a to v nízké koncentraci  $1,3 \text{ mg.kg}^{-1}$  (výsledky tryptaminu proto nejsou uvedeny). Následující Obrázek č. 17 znázorňuje obsah histaminu u modelových vzorků v průběhu zrání.



Obrázek č. 17: Stanovení obsahu histaminu u modelových vzorků sýrů v průběhu zrání

Histamin spolu s tyraminem patří mezi nejvíce toxické biogenní aminy (Şanlı, 2015). Z grafu lze vyčíst, že vyšší obsah histaminu byl zjištěn u vzorku K, P a A po 84 dnech zrání. Hodnoty u všech modelových vzorků nepřekročily hodnotu  $6,8 \text{ mg.kg}^{-1}$  (vzorek A), jedná se tedy o velmi nízké koncentrace. Předpokládá se, že hodnoty vyšší než  $400 \text{ mg.kg}^{-1}$  histaminu jsou škodlivé pro zdraví (Alvarez, 2014).

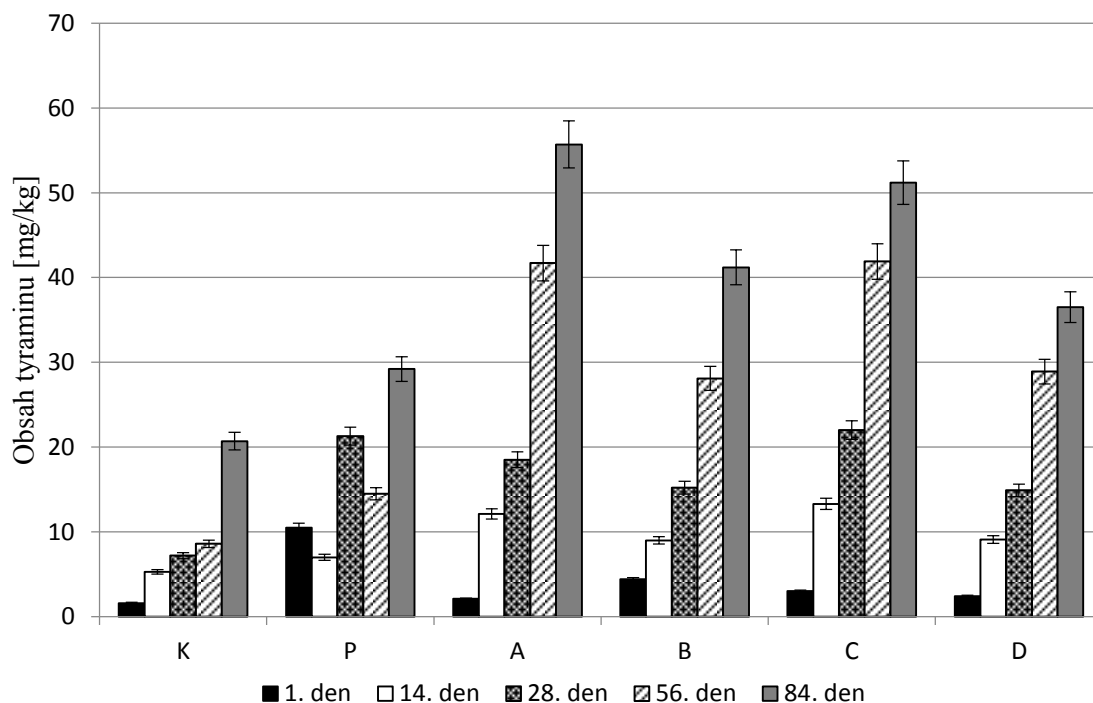
U vzorku K se histamin nevyskytoval po prvním dni, poté však došlo k nárůstu jeho obsahu. Po 56 dnech byl zaznamenán pokles koncentrace, ale po 84 dnech opět došlo k výraznému nárůstu. Vzorek P, který obsahoval producenta BA, obsahoval nejvyšší koncentrace histaminu v 56. dnu zrání. U vzorku A byla nalezena největší koncentrace histaminu v 84. dnu, tudíž můžeme říci, že degradér biogenních aminů *Lactobacillus casei* CCDM 422, neměl vliv na degradaci histaminu. Naopak u vzorku B a C, došlo v 84. dnu zrání ke snížení zhruba o polovinu. Na snížení koncentrace histaminu v sýrech měl tedy vliv kmen *Lactobacillus plantarum* CCDM 187 a *Lactobacillus plantarum* CCDM 189. U vzorku D (až na obsah  $2,5 \text{ mg.kg}^{-1}$  po 56. dnech zrání) nebyly detekovány žádné hladiny



histaminu. *Lactobacillus casei* CCDM 198 je tedy nejvhodnější kmen, z hlediska testovacích kultur, pro odstranění histaminu v přírodních sýrech.

Fox (2004) ve své knize uvádí výsledky analýzy sýru holandského typu, kdy bylo zjištěno, že teplota zrání sýrů, pH a koncentrace soli významně ovlivňují schopnost bakterií produkovat histamin. Po dvou týdnech zrání bylo v sýru zjištěno  $6,5 \text{ mmol.kg}^{-1}$  histaminu při pH 5,39, zatímco při pH 5,19 pouze  $3,4 \text{ mmol.kg}^{-1}$ . Z toho výsledku je patrné, že pravděpodobně závisí i na malém rozdílu v hodnotách pH. Pokud si vezmeme pro srovnání např. vzorek A a C, u vzorku A bylo pH v 84. dnu zrání  $5,21 \text{ mmol.kg}^{-1}$ . U vzorku C bylo pH v 84. dnu 5,13 a obsah histaminu byl  $2,1 \text{ mmol.kg}^{-1}$ . Z toho plyne, že tvrzení dle Foxe bylo potvrzeno i v případě našeho experimentu – pokud je hodnota pH nižší, je také obsah biogenní aminů v sýrech nižší. V našem případě, byla však koncentrace u vzorku C nižší hlavně z důvodu obsahu degradujícího kmenu.

Vysoký obsah soli také dokáže ovlivnit produkci BA. Dle Foxe (2004) bylo v sýru s obsahem soli 4,8 % nalezeno  $3,5 \text{ mmol.kg}^{-1}$  histaminu, kdežto u sýru s obsahem soli 2,6 % pouze  $2,1 \text{ mmol.kg}^{-1}$ .



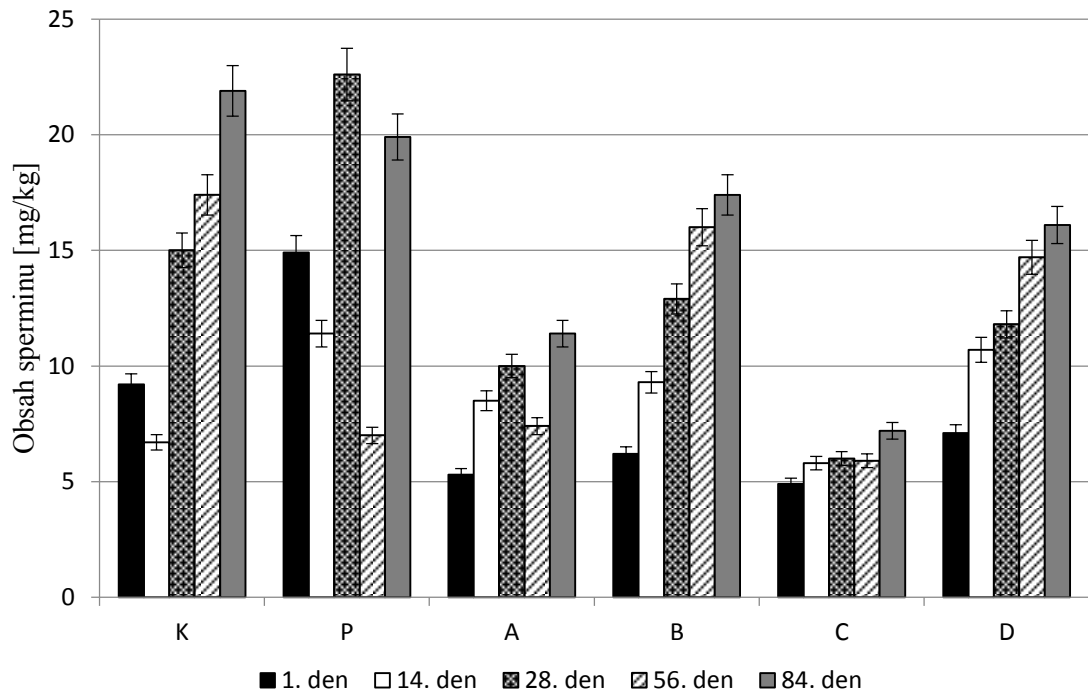
Obrázek č. 18: Stanovení obsahu tyraminu u modelových vzorků sýrů v průběhu zrání

Dalším důležitým biogenním aminem v sýrech je tyramin. Tyramin dokáže vyvolávat tzv. sýrovou reakci, která se po příjmu nadměrného množství projevuje hypertenzí a bolestmi hlavy (Şanlı, 2015).

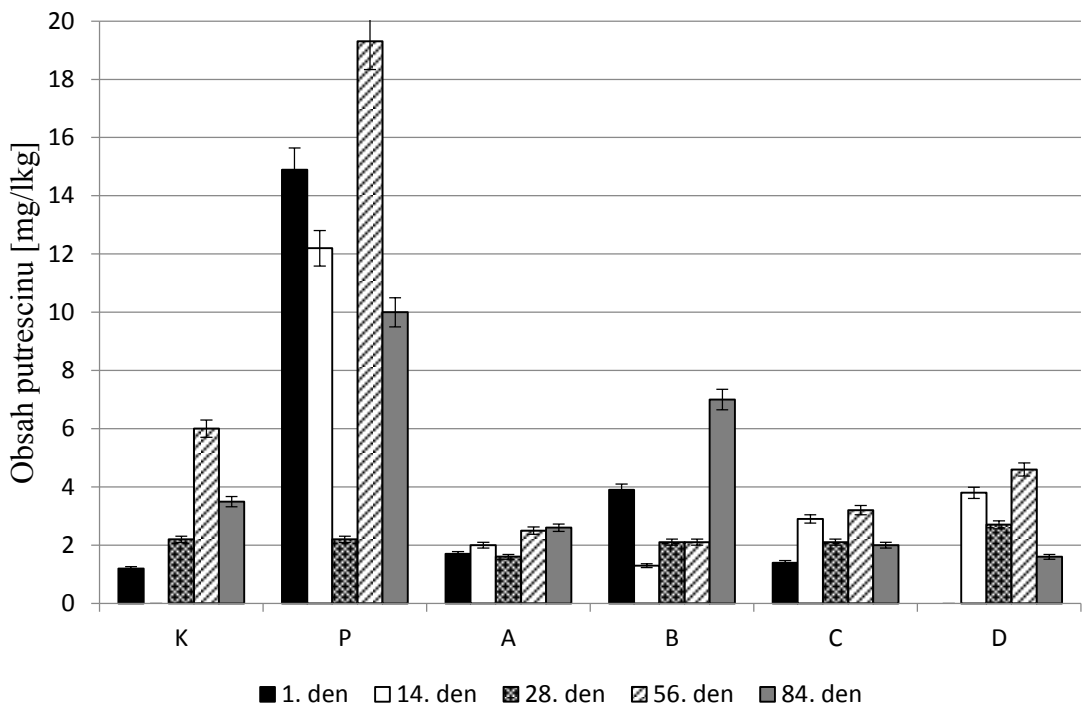
Z grafu je jasně viditelné, že kromě vzorku P, se obsah tyraminu v průběhu neustále zvyšoval. Největší obsah, stejně jako u histaminu, byl nalezen u vzorku A po 84 dnech zrání ( $55,7 \text{ mmol.kg}^{-1}$ ). Hodnoty byly asi desetinásobně vyšší, než hodnoty histaminu. Nejmenší obsah se vyskytoval u vzorku K se základní smetanovou kulturou a také překvapivě u vzorku P, který obsahoval producenta BA. K produkci tyraminu tak zřejmě výrazně přispěla sekundární mikroflóra, nežli samotný producent. Z výsledků plyne, že zvolené kultury neměly pravděpodobně významný vliv na degradaci tyraminu v přírodních sýrech. Po prvním dnu výroby je sice u degradujících kmenů vidět mírný pokles BA (po 14 dnech i u vzorku A a D), avšak se nejedná o závratně nižší hodnoty. Vzhledem k narůstání obsahu BA v průběhu zrání by se dalo říci, že aktivita degradujících kmenů v průběhu zrání klesala. Mohlo již také docházet k jejich odumírání a nahrazení jejich populace non-startérovými mikroorganismy.

Kromě tyraminu se u modelových vzorků nacházely také vyšší hladiny sperminu. Výsledky jsou uvedeny na Obrázku č. 19.

Na obrázku můžeme pozorovat, že nejvyšší obsah sperminu obsahoval vzorek K a P. Hodnoty sperminu u vzorku K dosáhly po 84 dnech zrání  $21,1 \text{ mmol.kg}^{-1}$  a u vzorku P  $19,9 \text{ mmol.kg}^{-1}$ . Degradující kmeny však na snížení koncentrace sperminu v sýrech měly vyšší vliv než na obsah tyraminu. U vzorku B a D došlo k mírnějšímu poklesu, avšak u vzorku A a C došlo k výraznému poklesu. Největší pokles v obsahu sperminu byl zaznamenán po 84 dnech zrání u vzorku C. Tedy kmen *Lactobacillus plantarum* CCDM 189 měl z testovaných kultur největší vliv na snížení koncentrace sperminu v přírodních sýrech.



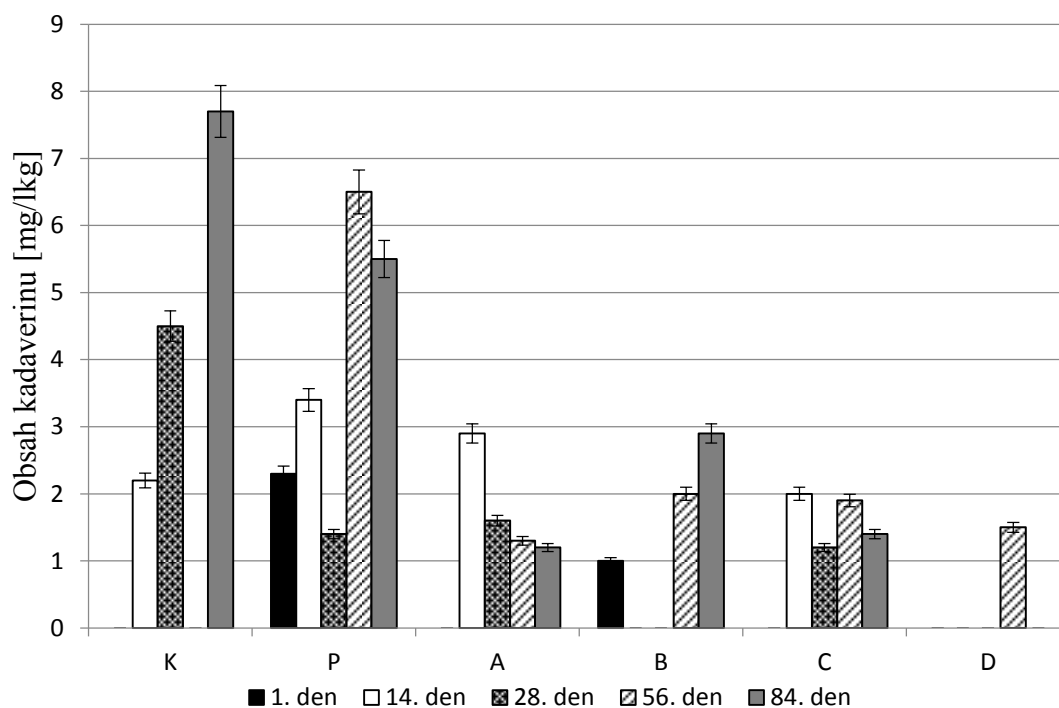
Obrázek č. 19: Stanovení obsahu sperminu u modelových vzorků sýrů v průběhu zrání



Obrázek č. 20: Stanovení obsahu putrescinu u modelových vzorků sýrů v průběhu zrání

V modelových vzorcích byl dále zaznamenán obsah putrescinu. Z grafu můžeme vyčíst, že největší obsah byl zaznamenán u vzorku P ( $19,3 \text{ mmol.kg}^{-1}$ ), který obsahoval producenta biogenních aminů. Můžeme tedy říci, že *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 946, je schopen výrazné produkce putrescinu. U všech vzorků, které obsahovaly degradující kmeny, bylo zaznamenáno výrazné snížení koncentrace putrescinu. Nejmenší snížení v 84. dnu proběhlo u vzorku B (*Lactobacillus plantarum* CCDM 187). Výrazného snížení bylo dosaženo u vzorku A a C (*Lactobacillus casei* CCDM 422 a *Lactobacillus plantarum* CCDM 189). K největšímu snížení došlo u vzorku D (*Lactobacillus casei* CCDM 198), ( $1,6 \text{ mmol.kg}^{-1}$ ) a tato kultura tedy měla největší vliv na snížení obsahu putrescinu v sýrech.

V nižších koncentracích byl u modelových vzorků zaznamenán i kadaverin (Obrázek 21).

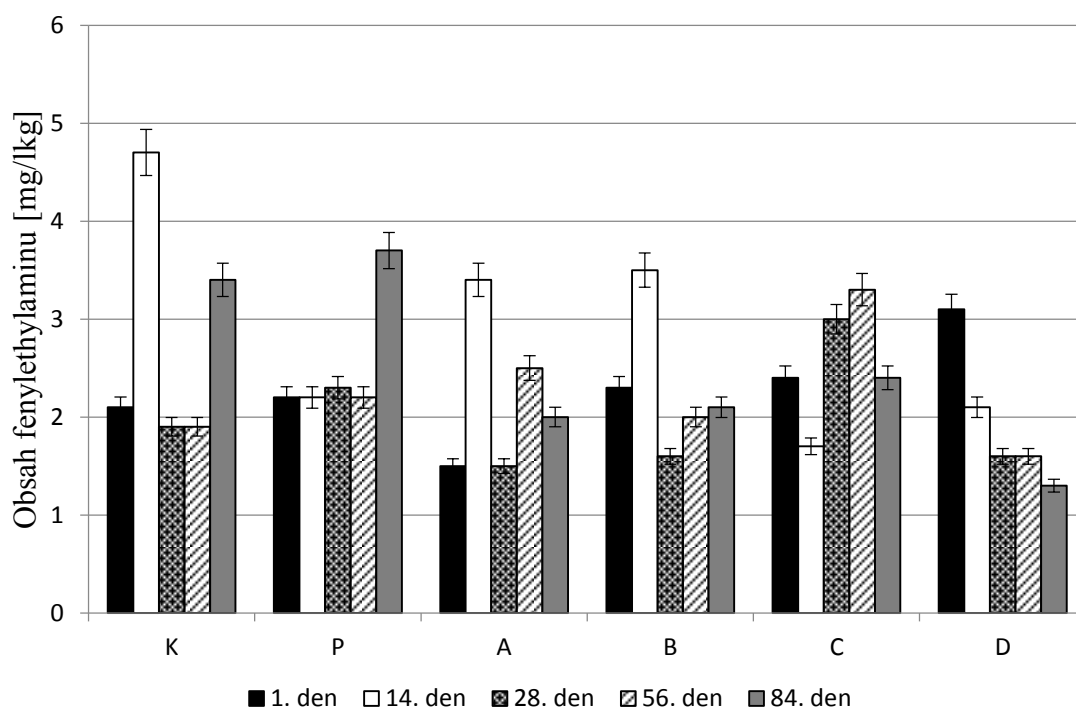


Obrázek č. 21: Stanovení obsahu kadaverinu u modelových vzorků sýrů v průběhu zrání

Maximální hodnoty byly dosaženy u vzorku K v 84. dnu zrání ( $7,7 \text{ mmol.kg}^{-1}$ ). Vysokých koncentrací bylo také dosaženo u vzorku P v 56. dnu zrání ( $6,5 \text{ mmol.kg}^{-1}$ ) a v 84. dnu došlo k poklesu ( $5,5 \text{ mmol.kg}^{-1}$ ). Stejně jako u putrescinu měl nejmenší vliv na snížení koncentrace kadaverinu kmen *Lactobacillus plantarum* CCDM 187, tedy vzorek B.

U vzorku D byl kadaverin detekován pouze po 56. dnu zrání v koncentraci  $1,5 \text{ mmol.kg}^{-1}$ . *Lactobacillus casei* CCDM 198 byl tedy vhodný nejenom pro odstranění histaminu a snížení hladiny putrescinu. Z testovaných kultur byl také nejvhodnější pro odstranění kadaverinu ze sýrů. Nízké hodnoty kadaverinu po 84 dnech byly shledány také u vzorku A ( $1,2 \text{ mmol.kg}^{-1}$ ) a C ( $1,4 \text{ mmol.kg}^{-1}$ ).

V nízkých koncentracích byl u modelových vzorků dále detekován fenylethylamin (Obrázek č. 22). Maximální koncentrace bylo dosaženo u vzorku K již po 14 dnech zrání ( $4,70 \text{ mmol.kg}^{-1}$ ). Vzorek P obsahoval po 84 dnech  $3,70 \text{ mmol.kg}^{-1}$  fenylethylaminu. U všech vzorků, které obsahovaly degradující kmeny, došlo po 84 dnech zrání ke snížení koncentrace, oproti vzorku P. Největší pokles byl zaznamenán u vzorku D.



Obrázek č. 22: Stanovení obsahu fenylethylaminu u modelových vzorků sýrů v průběhu zrání

## ZÁVĚR

Diplomová práce byla zaměřena na pozorování vlivu protektivní kultury bakterií se schopností degradace biogenních aminů u sýrů holandského typu v průběhu 84 dnů zrání. V teoretické části byla stručně popsána technologie výroby přírodních sýrů s nízkodohřívanou sýřeninou, dále charakteristika biogenních aminů včetně jejich vlivu na lidský organismus a možnosti ochranných opatření pro zajištění kvality a bezpečnosti sýrů.

V praktické části byla provedena výroba modelových vzorků s různými kmeny BA degradujících bakterií. Byl proveden skladovací experiment po dobu 84. dní a v průběhu zrání byly odebírány vzorky. U všech vzorků byla provedena základní chemická analýza (stanovení sušiny, obsah tuku, pH, a obsah soli), mikrobiologický rozbor, texturní profilová analýza a stanovení biogenních aminů.

Byly zjištěny následující výsledky:

- u modelových vzorků došlo po 84. dnech zrání k mírnému nárůstu obsahu sušiny, díky odpařování vody,
- obsah tuku se u všech vzorků pohyboval v rozmezí 24,4 % - 25,4 %,
- standardizace obsahu tuku byla provedena optimálně u všech modelových šarží, obsah tuku v sušině se pohyboval v rozpětí mezi 42,76 % - 46,79 %,
- během zrání nedocházelo u vzorků k výrazným změnám v hodnotách pH,
- obsah soli se u modelových vzorků neměnil, průměrný obsah soli u všech vzorků byl  $1,4 \pm 0,01$  %,
- v průběhu zrání byla zaznamenána zvyšující se tvrdost a lepivost sýrů, kohezivnost sýrů naopak klesala,
- počet mléčných koků vykazoval nejprve nárůst kolonií, ale zhruba v polovině doby zrání došlo k poklesu, obsah mléčných tyčinek narůstal,
- byl zjištěn silný nárůst bakterií rodu *Enterococcus*, koliformní bakterie nebyly v průběhu zrání sýrů detekovány
- producent biogenních aminů *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 946, má pravděpodobně výraznou schopnost produkce biogenních aminů v reálných podmínkách sýra,
- testované kultury měly vliv na snižování obsahu histaminu, sperminu, putrescinu, kadaverinu a fenylethylaminu,

- *Lactobacillus casei* CCDM 198 je nejvhodnější kmen, z hlediska testovaných kultur, pro odstranění histaminu, putrescinu, kadaverinu a fenylethylaminu v přírodních sýrech,
- *Lactobacillus plantarum* CCDM 189 má z testovaných kultur největší vliv na snížení koncentrace sperminu,
- testované kultury neměly výrazný vliv na snížení tyraminu.

**SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY**

- [1] ALVAREZ, Miguel A. a Ma Victoria MORENO-ARRIBAS, 2014. *The problem of biogenic amines in fermented foods and the use of potential biogenic amine-degrading microorganisms as a solution*. **39**(2), 146-155. DOI: 10.1016/j.tifs.2014.07.007. ISSN 09242244.
- [2] BAINES, David a Richard SEAL, 2012. *Natural Food Additives, Ingredients and Flavourings*. Woodhead Publishing series in food science, technology and nutrition. ISBN 978-1845698119.
- [3] BLACKBURN, Clive de, 2006. *Food Spoilage Microorganisms*. Wood head Publishing series in food science, technology and nutrition. ISBN 9781855739666.
- [4] BROADBENT, J. R., M. F. BUDINICH a J. L. STEELE, 2016. *Cheese: NSLAB. Reference Module in Food Science*. Elsevier.
- [5] BYLUND, Gösta, 2015. *Dairy Processing Handbook*. 2. Tetra Pak. ISBN 978-9176111321.
- [6] CALLEC, Christian, 2002. *Encyklopedie sýrů*. Čestlice: ReboProductions. ISBN 80-723-4225-8.
- [7] DONNELLY, Catherine W., [2014]. *Cheese and microbes*. Washington, DC: ASM Press. ISBN 978-1-55581-586-8.
- [8] DRDÁK, Milan, 1996. *Základy potravinářských technologií spracovani a rastlinných a živočišných surovín, cereálne a fermentačné technológie uchovávanie, hygiena a ekológia potravín*. Bratislava: Malé Centrum. ISBN 80-967-0641-1.
- [9] EFSA, 2018. Natamycin byl prověřen. *Informační centrum bezpečnosti potravin* [online]. Ministerstvo zemědělství, 27.1.2010 [cit. 2019-04-02]. Dostupné z: <https://www.bezpecnostpotravin.cz>
- [10] FENELON, Mark A a Timothy P GUINEE, 2000. Primary proteolysis and textural changes during ripening in Cheddar cheeses manufactured to different fat con-



tents. *International Dairy Journal*. **10**(3), 151-158. DOI: 10.1016/S0958-6946(00)00040-6. ISSN 09586946.

[11] FOX, P., P. MCSWEENEY, T. COGAN a T. GUINEE, 2004. *Cheese: chemistry, physics, and microbiology*. 3rd ed. London: Elsevier. ISBN 978-0122636523.

[12] GARDINI, Fausto, Maria MARTUSCELLI, Marisa Carmela CARUSO, Fernanda GALGANO, Maria Antonietta CRUDELE, Fabio FAVATI, Maria Elisabetta GUERZONI a Giovanna SUZZI, 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.

[13] GRIFFITHS, Mansel, ed., c2010. *Improving the safety and quality of milk*. Boca Raton: CRC Press. Woodhead Publishing series in food science, technology and nutrition. ISBN 978-1-84569-438-8.

[14] HANEL, Lubomír, Jiří PLÍŠTIL a Jindřich NOVÁK, c2011. *České názvy živočichů*. Praha: Národní muzeum. ISBN 978-807-0363-171.

[15] IBURG, Anne, 2004. *Lexikon sýrů: výroba, původ, druhy, chuť*. Čestlice: ReboProductions CZ. ISBN 80-723-4379-3.

[16] JOHNSON, M. E., 2011. Preparation of Cheese Milk. *Encyclopedia of dairy sciences*. San Diego, United States: Elsevier Science Publishing Co, s. 544-551. ISBN 0123744024.

[17] KADLEC, Pavel, Karel MELZOCH a Michal VOLDŘICH, 2012. *Přehled tradičních potravinářských výrob: technologie potravin*. Ostrava: KeyPublishing. Monografie (KeyPublishing). ISBN 978-80-7418-145-0.

[18] KILCAST, David a Persis SUBRAMANIAM, 2011. *Food and beverage stability and shelflife*. Philadelphia: Woodhead Pub. Woodhead Publishing in food science, technology, and nutrition, no. 210. ISBN 978-184-5697-013.

[19] KOTZEKIDOU, Parthena, 2016. *Food Hygiene and Toxicology in Ready-to-Eat Foods*. Elsevier. ISBN 978-0128019160.

- [20] LACROIX, Christophe, 2011. *Protective Cultures, Antimicrobial Metabolites and Bacteriophages for Food and Beverage Biopreservation*. Woodhead Publishing series in food science, technology and nutrition. ISBN 9780857090522.
- [21] MCSWEENEY, Paul, 2017. *Cheese: chemistry, physics and microbiology*. 4. Boston, MA: Elsevier. ISBN 978-0-12-417012-4.
- [22] Milkproteins, 2017. *Food-info* [online]. TheNetherlands: Wageningen University [cit. 2019-03-04]. Dostupné z: <http://www.food-info.net/uk/protein/milk.htm>
- [23] MOTARJEMI, Yasmine, Gerald MOY a E. C. D. TODD, 2014. *Encyclopedia of foodsafety*. Boston: Elsevier, AcademicPress. ISBN 978-012-4200-326.
- [24] Nařízení Evropského parlamentu a Rady (EU) č. 852/2004 ze dne 29. dubna 2004, o hygieně potravin ze dne, In: *Úřední věstník Evropské Unie*. 2004. L139, s. 1 – 54.
- [25] Nařízení Evropského parlamentu a Rady (EU) č. 853/2004 ze dne 29. dubna 2004, kterým se stanoví zvláštní hygienická pravidla pro potraviny živočišného původu, In: *Úřední věstník Evropské Unie*. 2004. L139, s. 55 – 205.
- [26] PAPADEMAS, Photis a Thomas BINTSIS. *Global cheesemaking technology: cheese quality and characteristics*. Hoboken, NJ: Wiley, 2018, 1 online zdroj. ISBN 9781119046165.
- [27] RANDAZZO, Cinzia Lucia, Cinzia CAGGIA a Erasmo NEVIANI, c2013. *Cheese ripening: quality, safety and health aspects*. New York: Nova Publishers. Advances in food safety and food microbiology. ISBN 978-162-4170-324.
- [28] RIDGWAY, Judy, 2001. *Sýry: průvodce světem sýrů*. Praha: Fortuna Print. ISBN 80-861-4465-8.
- [29] ŞANLI, Tuba a Ebru ŞENEL, 2015. Formation of Biogenic Amines in Cheese. *Processing and Impact on Active Components in Food*. Elsevier, 223-230. DOI: 10.1016/B978-0-12-404699-3.00027-5. ISBN 9780124046993.
- [30] SELECKÝ, Ján, 2013. *Slovenské syry*. Eko-konzult. ISBN 978-80-8079-168-1.

- [31] SKIBSTED, Leif H., Jens RISBO a Mogens L. ANDERSEN, 2010. *Chemical deterioration and physical instability of food and beverages*. Boca Raton: CRC Press. Woodhead Publishing in food science, technology, and nutrition, no. 186. ISBN 18-456-9926-2.
- [32] STEGLICH, Wolfgang, Burkhard FUGMANN a Susanne LANG-FUGMANN, 2000. *RÖMPP Encyclopedia Natural Products*. Thieme Medical Publishers.
- [33] SUN, Da-Wen, 2005. *Emerging Technologies for Food Processing*. Elsevier. ISBN 9780080455648.
- [34] ŠNIRC, Július, Jozef GOLIAN, Karol HERIAN, František BUŇKA, Leona BUŇKOVÁ a Margita ČANIGOVÁ, 2015. *Mlieko a mliečne výrobky*. Nitra: Slovenská poľnohospodárska univerzita. ISBN 978-80-552-1311-8.
- [35] TAYLOR, M., 2014. *Handbook of natural antimicrobials for food safety and quality*. Boston, MA: Elsevier. ISBN 9781782420422.
- [36] TITTARELLI, Fabrizia, Giorgia PERPETUINI, Paola DI GIANVITO a Rosanna TOFALO, 2019. Biogenic amines producing and degrading bacteria: A snapshot from raw ewes' cheese. *LWT*. **101**, 1-9. DOI: 10.1016/j.lwt.2018.11.030. ISSN 00236438.
- [37] VELÍŠEK, Jan a Jana HAJŠLOVÁ, 2009. *Chemie potravin*. Rozš. a přeprac. 3. vyd. Tábor: OSSIS. ISBN 978-80-86659-16-9.
- [38] Vyhláška o požadavcích na mléko a mléčné výrobky, mražené krémy a jedlé tuky a oleje č. 397/2016 Sb., In: *Sbírka předpisů České republiky*.
- [39] Vyhláška o přizpůsobení veterinárních a hygienických požadavků pro některé potravinářské podniky, v nichž se zachází se živočišnými produkty č. 445/2017 Sb., In: *Sbírka předpisů České republiky*.
- [40] WEIMER, B. C., 2007. *Improving the Flavour of Cheese*. Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition. ISBN 9781845693053.
- [41] WHITE, David, 2007. *The physiology and biochemistry of prokaryotes*. 3rd ed. New York: Oxford University Press. ISBN 978-019-5301-687.

[42] ZULJAN, Federico Alberto, Pablo MORTERA, Sergio Hugo ALARCÓN, Víctor Sebastián BLANCATO, Martín ESPARIZ a Christian MAGNI, 2016. Lactic acid bacteria decarboxylation reactions in cheese. *International Dairy Journal*. **62**, 53-62. DOI: 10.1016/j.idairyj.2016.07.007. ISSN 09586946.

**SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK**

BA	Biogenní aminy
BAI	Biogenní aminový komplex
DAO	Diaminooxidáza
GMHP	Správná výrobní a hygienická praxe
HACCP	System analýzy nebezpečí a kritických kontrolních bodů
KTJ	Kolonie tvořící jednotky
LAB	Bakterie mléčného kvašení
MAO	Monoaminooxidáza
NSLAB	Non-startérové bakterie
VBAI	Vazoaktivní index biogenních aminů

**SEZNAM OBRÁZKŮ**

Obrázek č. 1: Změna v populacích startérové LAB a NSLAB v průběhu zrání. Převzato a přeloženo podle Broadbent, 2016 .....	17
Obrázek č. 2: Kyselé srážení mléka. Převzato a přeloženo podle Donnelly, 2014 .....	20
Obrázek č. 3: Sladké srážení mléka. Zdroj Wageningen University, 2017.....	20
Obrázek č. 4: Vývoj obsahu sušiny u modelových vzorků sýrů v průběhu zrání .....	42
Obrázek č. 5: Vývoj obsahu tuku u modelových vzorků sýrů v průběhu zrání .....	43
Obrázek č. 6: Obsah tuku v sušině u modelových vzorků sýrů v průběhu zrání .....	44
Obrázek č. 7: Vývoj pH u modelových vzorků sýrů v průběhu zrání.....	45
Obrázek č. 8: Stanovení obsahu soli u modelových vzorků sýrů v průběhu zrání.....	46
Obrázek č. 9: Stanovení tvrdosti u modelových vzorků sýrů v průběhu zrání .....	47
Obrázek č. 10: Stanovení kohezivnosti u modelových vzorků sýrů v průběhu zrání	48
Obrázek č. 11: Stanovení lepivosti u modelových vzorků sýrů v průběhu zrání .....	48
Obrázek č. 12: Vývoj celkového počtu mikroorganismů u modelových vzorků sýrů v průběhu zrání.....	51
Obrázek č. 13: Vývoj mezofilních laktokoků a streptokoků u modelových vzorků sýrů v průběhu zrání .....	52
Obrázek č. 14: Vývoj bakterií mléčného kvašení u modelových vzorků sýrů v průběhu zrání.....	53
Obrázek č. 15: Vývoj enterokoků u modelových vzorků sýrů v průběhu zrání.....	53
Obrázek č. 16: Stanovení celkového obsahu biogenních aminů u modelových vzorků sýrů v průběhu zrání .....	55
Obrázek č. 17: Stanovení obsahu histaminu u modelových vzorků sýrů v průběhu zrání .....	56

---

Obrázek č. 18: Stanovení obsahu tyraminu u modelových vzorků sýrů v průběhu zrání.....	57
Obrázek č. 19: Stanovení obsahu sperminu u modelových vzorků sýrů v průběhu zrání.....	59
Obrázek č. 20: Stanovení obsahu putrescinu u modelových vzorků sýrů v průběhu zrání.....	59
Obrázek č. 21: Stanovení obsahu kadaverinu u modelových vzorků sýrů v průběhu zrání.....	60
Obrázek č. 22: Stanovení obsahu fenylethylaminu u modelových vzorků sýrů v průběhu zrání.....	61

**SEZNAM TABULEK**

Tabulka č. 1: Aromatické sloučeniny získané katabolismem aminokyselin. Převzato a upraveno podle Randazzo, 2013 .....	22
Tabulka č. 2: Počty mikroorganismů v syrovém mléce pro výrobu modelových vzorků .....	49
Tabulka č. 3: Počty mikroorganismů v pasterovaném mléce .....	50