

Vývoj obsahu biogenních aminů v průběhu zrání sýrů v závislosti na použité doplňkové kultuře

Bc. Martina Škrabalová

Diplomová práce
2021

 Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav technologie potravin

Akademický rok: 2020/2021

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

Jméno a příjmení: **Bc. Martina Škrabalová**
Osobní číslo: **T19428**
Studijní program: **N0721A210004 Technologie potravin**
Studijní obor: **Technologie potravin**
Forma studia: **Kombinovaná**
Téma práce: **Vývoj obsahu biogenních aminů v průběhu zrání sýrů v závislosti na použité doplňkové kultuře**

Zásady pro vypracování

I. Teoretická část

1. Mikrobiologie sýrů včetně charakteristiky kultur využívaných pro výrobu sýrů.
2. Zrání sýrů a význam podmínek na průběh procesů zrání.
3. Potenciální rizika spojená s konzumací sýrů.

II. Praktická část

1. Vyrobté modelové vzorky sýrů s přidavkem různých doplňkových kultur.
2. V rámci skladovacího experimentu sledujte vybrané vlastnosti modelových sýrů.
3. Porovnejte obsah biogenních aminů v modelových šaržích v průběhu zrání.
4. Vyhodnotte výsledky, diskutujte je s literaturou a vyvodte závěr.

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

Seznam doporučené literatury:

- [1] RUIZ-CAPILLAS, Claudia a Ana HERRERO. Impact of Biogenic Amines on Food Quality and Safety. *Foods* [online]. 2019, 8(2)
- [2] ZULIAN, Federico Alberto, Pablo MORTERA, Sergio Hugo ALARCÓN, Víctor Sebastián BLANCATO, Martín ESPARIZ a Christian MAGNI. Lactic acid bacteria decarboxylation reactions in cheese. *International Dairy Journal*. 2016, 62, 53-62
- [3] LAW, Barry A. a A. Y. TAMIME, ed. *Technology of Cheesemaking*. Wiley, 2010
- [4] DONNELLY, Catherine W. *Cheese and microbes*. Washington, District of Columbia: ASM Press, 2014. ISBN 978-1-55581-859-3
- [5] FOX, P. F. *Cheese: chemistry, physics, and microbiology*. 3rd ed. London: Elsevier, 2004. ISBN 0122636538

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

Datum zadání diplomové práce: **31. prosince 2020**

Termín odevzdání diplomové práce: **14. května 2021**

L.S.

prof. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan

Ing. Robert Gál, Ph.D.
ředitel ústavu

Ve Zlíně dne 8. února 2021

PROHLÁŠENÍ AUTORA DIPLOMOVÉ PRÁCE

Beru na vědomí, že:

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

Prohlašuji,

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

Ve Zlíně dne:

Jméno a příjmení studenta:

.....
podpis studenta

ABSTRAKT

Cílem práce bylo posoudit vývoj obsahu biogenních aminů po dobu 84 dnů zrání mezi kontrolní šarží, a šarží inokulovanou kmenem *Lactocaseibacillus casei* CCDM 198, který je schopen degradovat biogenní aminy. Pro srovnání aktivity biogenní aminy degradujícího kmene byly do obou modelových šarží sýrů přímo přidány fenylethylamin, putrescin, kadaverin a tyramin. U obou šarží sýrů byla provedena základní chemická analýza, mikrobiologický rozbor a stanovení biogenních aminů. Výsledkem experimentu bylo prokázáno, že kmen *Lactocaseibacillus casei* CCDM 198 měl vliv na snížení produkce biogenních aminů o 17,94 % kadaverinu, 16,34 % fenylethylaminu a 19,45 % putrescinu v 84. den zrání sýrů.

Klíčová slova: zrání sýrů, biogenní aminy, degradace biogenních aminů

ABSTRACT

The aim of the thesis was to assess the development of the content of biogenic amines during 84 days of maturation between the control batch and the batch inoculated with the strain *Lactocaseibacillus casei* CCDM 198, which is capable of degrading biogenic amines. To compare the activity of the biogenic amine degrading strain, phenylethylamine, putrescine, cadaverine and tyramine were added directly to both batches of cheeses. Basic chemical analysis, microbiological analysis and determination of biogenic amines were carried out on both batches of cheeses. As a result of the experiment, it was shown that the *Lactocaseibacillus casei* CCDM 198 had the effect of reducing the production of biogenic amines by 17,94 % cadaverine, 16,34 % phenylethylamine and 19,45 % putrescine on the 84th day of cheese ripening.

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

Moje poděkování patří hlavně paní doc. Ing. Vendule Pachlové, Ph.D., za její odborné vedení, čas a velkou trpělivost při zpracování této diplomové práce. Poděkování dále patří i Mgr. Richardu Adámkovi za pomoc při práci v laboratoři, a za jeho cenné rady při zpracování praktické části této práce. Děkuji i rodině a přátelům za podporu po celou dobu mého studia.

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

OBSAH

ÚVOD	9
I TEORETICKÁ ČÁST	10
1 MIKROBIOLOGIE SÝRŮ	11
1.1 MIKROBIOLOGIE SYROVÉHO MLÉKA.....	11
1.1.1 Ošetření syrového mléka.....	11
1.1.2 Kontaminace syrového mléka.....	12
1.1.3 Nežádoucí mikroorganismy syrového mléka.....	13
1.2 VLIV TECHNOLOGICKÝCH OPERACÍ NA MIKROBIOLOGII MLÉKA	16
1.2.1 Vliv tepelného ošetření	16
1.3 ČISTÉ MLÉKAŘSKÉ KULTURY	17
1.3.1 Bakterie mléčného kvašení - rozdělení a jejich funkce.....	18
1.3.2 Faktory ovlivňující aktivitu ČMK.....	20
2 ZRÁNÍ SÝRŮ	21
2.1 METABOLIZMUS ZBYTKOVÝCH SACHARIDICKÝCH SLOUČENIN.....	21
2.2 PROTEOLÝZA A KATABOLIZMUS AMK.....	23
2.2.1 Koagulanty	24
2.2.2 Proteázy.....	24
2.3 LIPOLÝZA.....	26
2.3.1 Lipolytické látky v sýru	26
2.4 FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ PROCESY ZRÁNÍ	27
3 POTENCIÁLNÍ RIZIKA SPOJENÁ S KONZUMACÍ SÝRŮ	29
3.1 BIOGENNÍ AMINY	29
3.1.1 Negativní dopad biogenních aminů na konzumenta	30
3.1.2 Faktory ovlivňující tvorbu biogenních aminů.....	31
3.2 DALŠÍ RIZIKA SPOJENÁ S KONZUMACÍ SÝRŮ	32
II PRAKTICKÁ ČÁST	34
4 CÍLE PRÁCE	35
5 METODIKA	36
5.1 VÝROBA MODELOVÝCH VZORKŮ.....	36
5.1.1 Materiál a pomůcky.....	36
5.1.2 Postup výroby modelových vzorků.....	37
5.2 ZÁKLADNÍ CHEMICKÁ ANALÝZA	39
5.2.1 Stanovení obsahu sušiny	39
5.2.2 Stanovení obsahu tuku	39
5.2.3 Stanovení pH.....	40
5.2.4 Stanovení obsahu soli.....	40

5.3	MIKROBIOLOGICKÝ ROZBOR	40
5.4	STANOVENÍ OBSAHU BIOGENNÍCH AMINŮ	41
6	VÝSLEDKY A DISKUZE	43
6.1	ZÁKLADNÍ CHEMICKÁ ANALÝZA	43
6.1.1	Stanovení obsahu sušiny	43
6.1.2	Stanovení obsahu tuku	44
6.1.3	Stanovení pH	47
6.1.4	Stanovení soli	48
6.2	MIKROBIOLOGICKÝ ROZBOR	49
6.3	STANOVENÍ OBSAHU BIOGENNÍCH AMINŮ	52
	ZÁVĚR	58
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	59
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	63
	SEZNAM OBRÁZKŮ	64
	SEZNAM TABULEK	65

ÚVOD

Sýry patří do skupiny mléčných výrobků, u nichž mikrobiologická a chemická kvalita závisí na správném výběru mléka. Komplexní sítě metabolických procesů v rámci zrání sýrů vzniká sýrová chuť. Laktóza je mikrobiální aktivitou přeměňována na kyselinu mléčnou. K dalším významným změnám během zrání dochází v rámci proteolýzy, kdy jsou bílkoviny štěpeny na peptidy a aminokyseliny. Aminokyseliny tvoří metabolické prekurzory, které přispívají k chuti sýru, ale tvoří také prekurzory pro vznik biogenních aminů.

Biogenní aminy jsou biologicky aktivní sloučeniny, které se vyskytují v široké škále potravin (ryby, rybí výrobky, sýry, fermentované potraviny a nápoje). Jestliže přijmeme biogenní aminy z potravin ve vyšších koncentracích, může tento příjem u člověka vyvolat řadu zdravotních potíží, jako jsou například nevolnost, vyrážka, bolesti hlavy, a další. V nižších koncentracích jsou biogenní aminy u člověka deaktivovány pomocí enzymů aminooxidáz ve střevě. Tvorba biogenních aminů vzniká mikrobiální dekarboxylací volných aminokyselin vznikajících při proteolýze. Proteolýza probíhající v sýru tvoří dobré prostředí díky zvyšující se koncentraci volných aminokyselin při delší době zrání. Vzhledem ke zvyšování substrátu pro tvorbu biogenních aminů v sýrech, a jejich negativnímu dopadu na zdraví člověka, je nutné hledat způsoby ke snížení biogenních aminů v sýrech.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 MIKROBIOLOGIE SÝRŮ

Výroba sýrů začíná výběrem mléka vysoké mikrobiologické a chemické kvality (Griffits, 2010). Obecně je mléko pro většinu mikroorganismů dobrým růstovým médiem díky vysokému obsahu vody, neutrální hodnotě pH a biochemickému složení (Özer, 2015). Mikroorganismy proto mohou být zahrnuty v široké škále, a to od gramnegativních bakterií, přes grampozitivní bakterie až po kvasinky a plísňe. Primárním zdrojem mikroorganismů v mléce je vemeno dojnice, prostředí nebo dojícího zařízení (Smit, 2003). Syrové mléko je neodmyslitelně základní surovinou pro výrobu sýrů, proto jsou v této kapitole popsány klíčové faktory ovlivňující jeho kvalitu.

1.1 Mikrobiologie syrového mléka

Dle nařízení Evropského Parlamentu a Rady (ES) č. 853/2004, kterým se stanoví zvláštní hygienická pravidla pro potraviny živočišného původu, se „syrovým mlékem“ rozumí mléko produkované sekrecí mléčné žlázy hospodářských zvířat, které nebylo podrobeno ohřevu nad 40 °C a nebylo ani ošetřeno žádným způsobem s rovnocenným účinkem. Pro syrové mléko jako surovinu, která není nikterak dále upravena či zpracována, existuje mnoho faktorů kontaminace. Těmi hlavními jsou vemeno samotné krávy, prostředí, voda nebo i dojící zařízení (Griffits, 2010).

Mléko ovšem nepředstavuje jen zdroj kontaminace, ale primárně je určeno pro výživu, hlavně novorozenců. V majoritních složkách obsahuje sacharidy, bílkoviny, lipidy a v minoritních především vitaminy a minerální látky. Tyto složky neslouží jen pro výživu člověka, ale jsou také ideálním růstovým médiem pro mnohé mikroorganismy – bakterie, plísňe, kvasinky, priony a viry. Může obsahovat komenzální bakterie z povrchu vemene, jako jsou rody *Micrococcus*, *Streptococcus*, koryneformní bakterie a koliformní bakterie (Griffits, 2010).

1.1.1 Ošetření syrového mléka

Od zdravé dojnice lze získat téměř sterilní mléko. I toto téměř sterilní mléko obsahuje řadu mikroorganismů, které by se mohly jeho dalším nesprávným zacházením pomnožit. Mezi základní úkony po nadojení patří čištění a chlazení (Smetana 2009).

Při čištění je cílem odstranit nečistoty z mléka, jako jsou například částičky prachu, úlomky slámy, a další. Tato operace se uplatňuje mezi dojením a dopravením čerstvě nadojeného mléka do chladičského tanku. Do potrubí směřující k chladičímu tanku je přidáno filtrační

zařízení, které je vyrobeno z různých materiálů (nesmí však být z tkaniny). Toto filtrační zařízení je vyměňováno a čištěno tak, aby nedošlo k žádné mikrobiální kontaminaci (Smetana, 2009).

Dalším důležitým faktorem pro zabránění rostoucí mikroflóry je chlazení mléka. Čerstvě nadojené mléko má teplotu zhruba 33 °C. Tato teplota by byla optimální pro mnoho kontaminujících mikroorganismů, proto musí být mléko zchlazeno. Mléko je nutné po nadojení zchladit co nejrychleji, nejpozději však do dvou hodin (Smetana, 2009). Dle Nařízení Evropského Parlamentu a Rady (ES) č. 853/2004 se mléko chladí na teplotu 8 °C a nižší při denním svozu, nebo na teplotu 6 °C při nekaždodenním svozu. Při přepravě nesmí teplota mléka přesáhnout 10 °C.

1.1.2 Kontaminace syrového mléka

Mikrobiální kontaminace může být dvojího typu, a to buď primární nebo sekundární. Ještě, než nastane jedna z těchto fází, tak si mléko prochází tzv. baktericidní fází. Baktericidní fáze nastává ihned po nadojení a trvá jen několik málo hodin. Mikroorganismy se v mléce nerozmnožují, naopak dochází k jejich částečné redukci (Smetana, 2009). K částečné redukci dochází díky sloučeninám s určitou antimikrobiální aktivitou, které syrové mléko po nadojení obsahuje. Jejich hlavním účelem je ochrana vemene před infekcí a ochrana novorozence. Jednou z těchto sloučenin je laktoperoxidáza. Sama o sobě nemá antimikrobiální aktivitu, ale v přítomnosti peroxidu vodíku (mikrobiální původ) dochází k oxidaci za vzniku inhibitoru hypothiokyanátu. Tento proces je označován jako laktoperoxidázový systém, disponuje baktericidní aktivitou proti gramnegativním organismům a bakteriostatickými účinky proti patogenům. Další sloučeninou mléka zabraňující růstu bakterií je laktoferin. Laktoferin je glykoprotein, který váže železo a není tak již k využití bakteriím. Určitou roli hrají i imunoglobuliny mléka a hlavně mleziva, které mohou inaktivovat patogeny v mléce (Fox, 2004).

K primární kontaminaci může dojít přes strukový kanálek do krevního oběhu krávy (Smetana, 2009). Jestliže dojde k infikování, a tím zánětu mléčné žlázy (tzv. mastitidě), dojde také k vylučování velkého množství mikroorganismů a somatických buněk do mléka. Bakterie způsobující mastitidu jsou například *Staphylococcus aureus* či *E. coli*. Kolonizují vemeno a strukový kanál, kde přežívají a později mohou být příčinou různých alimentárních onemocnění člověka (Fox, 2004).

Sekundární kontaminace mléka většinou vzniká v důsledku znečištění mléka okolním prostředím. Sem se řadí vnější kontaminace povrchu vemene, nečistoty z dojícího zařízení, pracovníků či okolního prostředí (Smetana, 2009). Vnější povrch vemene se řadí mezi hlavní zdroje kontaminujících mikrobů v mléce. Povrch je kontaminován různými nečistoty ze zeminy, podestýlky, fekálií a zbytků siláže. Tímto způsobem je do mléka zavedeno mnoho nežádoucích mikroorganismů, jejichž přehled je shrnut v tabulkách (Tabulka č. 1 a Tabulka č. 2). Pro zajištění mikrobiologicky kvalitního mléka je důležité efektivní čištění a dezinfekce vemene před dojením. Dalšími zdroji kontaminace jsou dojící zařízení a skladovací nádrže. Ukázalo se, že pokud nejsou dostatečně dezinfikovány, tak významně přispívají k rozvoji psychrotrofitické mikroflóry syrového mléka. Je tedy nutné vždy dbát na správnou hygienu a sanitaci (Fox, 2004).

Míra primární a sekundární kontaminace ovlivňuje výslednou kvalitu mléka. Ta je hodnocena dle celkového počtu mikroorganismů (CPM), počtu somatických buněk (PSB) a obsahu reziduí inhibičních látek (RIL) (Smetana, 2009). Dle Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 853/2004, kterým se stanoví zvláštní hygienická pravidla pro potraviny živočišného původu, nesmí obsah živých mikroorganismů při 30 °C přesáhnout hodnotu 100 000 v 1 ml a obsah somatických buněk nesmí být vyšší než hodnota 400 000 v 1 ml.

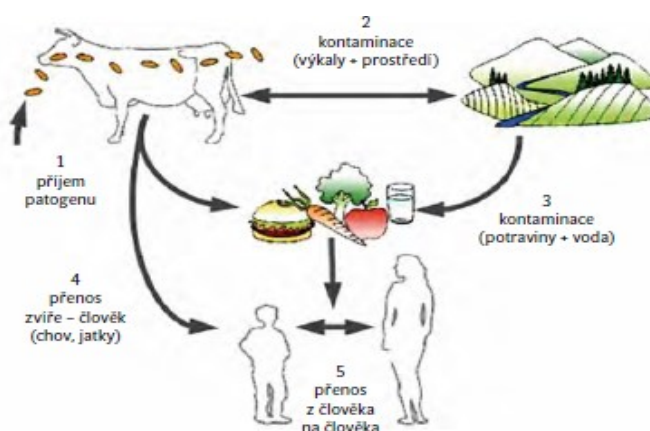
1.1.3 Nežádoucí mikroorganismy syrového mléka

Jak již bylo řečeno, syrové mléko je ideálním živným médiem pro mnohé mikroorganismy. Přehled nežádoucích mikroorganismů je znázorněn v tabulce (Tabulka č. 1). Nežádoucí i patogenní mikroorganismy představují z mikrobiologického hlediska pro výrobu sýrů největší riziko, neboť se v mléce podílí na jeho mikrobiologickém rozkladu, a mohou také způsobovat řadu onemocnění u člověka. (Smetana, 2009). Pravděpodobnost výskytu *Listeria monocytogenes* je vyšší u sýrů než u jiných fermentovaných výrobků, jelikož tepelná tolerance *L. monocytogenes* je blízká teplotě šetrné pasterace, při níž se sýry vyrábí. Dále je schopna růst i při teplotách skladování a zrání. Druhy *Salmonella* a *E. coli* O157:H7 mají také vysokou pravděpodobnost výskytu v sýrech, jelikož se mohou nacházet i v syrovém mléce a dokázat růst při chladírenských teplotách a vyšší kyselosti. Všechny zmíněné druhy mohou v sýrech během zrání přetrvávat až několik měsíců. *Staphylococcus aureus* se řadí mezi častěji se vyskytující biologické kontaminanty v sýrech. Jeho původ můžeme najít zejména v syrovém mléce z infikovaného vemene, nebo také z pracovníků zpracovávající syrové mléko. Kontaminace druhem *Staphylococcus aureus* je potlačena BMK a kyselostí

sýrů. Při zpracování mléka a výrobě mléčných výrobků je velmi závažný mikroorganismus *Bacillus cereus*, jelikož vytváří na zařízení pro zpracování mléka velmi obtížně odstranitelné bakteriální filmy (Fox, 2004). Obecně řečeno patogenní mikroorganismy musí být z mléka vyloučeny či sníženy na bezpečnou úroveň.

Tabulka č. 1: Stručná charakteristika nežádoucích mikroorganismů v mléce (Smetana, 2009)

Skupina mikroorganismů a stanovené kritérium	Charakteristika, podmínky růstu	Zdroj nákazy	Rod/Zástupci	Produkty	Následky
psychrotrofní (PTM) do 50 000 v 1 ml	schopné růst při nízkých teplotách (pod 7 °C), i když optimální teplota jejich růstu je jiná	voda (dochází i k rozprašování do ovzduší), úchovné nádrže, dojíací zařízení	<i>Pseudomonas</i> , <i>Alcaligenes</i> , <i>Achromobacter</i> , <i>Aeromonas</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Clostridium</i> , <i>Proteus</i>	proteolytické a lipolytické enzymy	změny barvy a chuti syrového mléka; kažení trvanlivého mléka při skladování (slizovitá sraženina, hořknutí)
koliformní (COLI) do 1 000 v 1 ml	aerobní a fakultativně anaerobní, zkvašují laktózu za vzniku plynů, kyselin a aldehydů (při teplotě 35–37 °C), ničí se pasterizací	výkaly, voda, půda, prach, nedostatečná hygiena a sanitace	<i>Escherichia coli</i> , <i>Enterobacter aerogenes</i> , <i>Klebsiella</i> , <i>Citrobacter</i>	plyny CO ₂ ; H ₂ ; kyselina mléčná; kyselina octová	vady sýrů – duření, síťovitost; smyslové vady – nečistá chuť a vůně, hořknutí; táhlovitost; gastroenteritidy
sporotvorné anaerobní (SA) negativní v 0,1 ml	vytvářejí spóry odolné proti pasteraci; vyvolávají máselné kvašení	nekvalitní krmiva, siláže	<i>Clostridium butyricum</i> , <i>C. tyrobutyricum</i> , <i>C. sporogenes</i>	kyselina máselná; kyselina octová; CO ₂ ; H ₂ O; aceton; alkohol; toxiny	vady sýrů – pozdní duření, bílá hniloba; dietetická rizika
termorezistentní (TRM) do 2 000 v 1 ml	odolné vůči vysokým teplotám (nad 60 °C), mohou být mezofilní, psychrotrofní, sporulující anaerobní i aerobní	voda, nedostatečně vyčištěná strojní zařízení	<i>Micrococcus</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Clostridium</i> , <i>Microbacterium</i> , <i>Enterococcus</i>		smyslové a technologické vady, zejména u jogurtů, sýrů, trvanlivého mléka
celkový počet mikroorganismů (CPM) do 100 000 v 1 ml	všechny mezofilní aerobní a fakultativně anaerobní mikroorganismy (bakterie, kvasinky, plísně) schopné růst za stanovených podmínek při teplotě 30 °C				



Obrázek č. 1: Schéma přenosu patogenních mikroorganismů (*Escherichia coli*) (Smetana, 2009)

Na obrázku (Obrázek č. 1) je znázorněno schéma přenosu patogenního mikroorganismu *E. coli*. Řetězec přenosu začíná u skotu, který patří mezi hlavní rezervoáry *E. coli* O157:H7. Prostřednictvím stolice skotu se mikroorganismus vyloučí do okolního prostředí, odkud se může dostat i do mléka. *E. coli* O157:H7 patří mezi střevní patogen neschopný přežít pasteraci. Avšak pokud je tento patogen přítomný v syrovém mléce, může být přítomen i v pasterovaném mléce důsledkem špatného provedení procesu pasterace či postpasterační kontaminací. U člověka může *E. coli* způsobit těžký zánět střev a hemolyticko-uremický syndrom (Fox, 2004).

Tabulka č. 2: Stručná charakteristika patogenních mikroorganismů v mléce (Smetana, 2009)

Druh	Charakteristika	Zdroj nákazy v mléce	Hlavní produkty	Následky
Toxikoinfekce				
<i>Campylobacter jejuni</i>	mikroaerofilní, termofilní	voda, krmivo, výkaly zvířat (drůbež, hlodavci)	enterotoxin; cytotoxin	gastroenteritidy – horečka, zvracení, průjem; sepse
<i>Escherichia coli</i> patogenní kmeny O157	fakultativně anaerobní, normálně se vyskytuje v tlustém střevě zvířat a lidí	voda, hnůj, půda, krmiva, nakažená zvířata (skot)	enterotoxin; verotoxin; hemolyzin	těžký zánět střev – krvavý průjem; hemolyticko-uremický syndrom (selhání ledvin u dětí do 5 let)
<i>Listeria monocytogenes</i>	aerobní nebo fakultativně anaerobní, saprofytní, psychrotrofní	zvířata (domácí, hlodavci, přežvýkavci), nekvalitní siláže a senáže, voda	virulentní proteiny, mléko podporuje množení listerií	zažívací potíže; u rizikových skupin (dětí, staří lidé, osoby se sníženou imunitou, těhotné ženy) zánět mozku a mozkových blan; potraty aj.
<i>Salmonella</i> ssp.	fakultativně anaerobní	kontaminace při zpracování mléka, bacilonosiči (zvířata, ptáci, lidé), prostředí	plyny; kyseliny; sirovodík; endotoxiny	akutní gastroenteritidy – zvracení, průjem, dehydratace; riziko bacilonosičství
<i>Yersinia enterocolitica</i>	fakultativně anaerobní, psychrotrofní	nakažená zvířata (hlodavci)		gastroenteritida; sepse
Intoxikace				
<i>Bacillus cereus</i>	aerobní a fakultativně anaerobní, saprofytní, sporotvorný, psychrotrofní	půda, voda, prach, krmivo, mléčná žláza	enterotoxin; emetický toxin; fosfolipáza; hemolyzin	gastroenteritidy – zvracení, průjem;
<i>Staphylococcus aureus</i>	fakultativně anaerobní, termorezistentní	mastitidy dojníc, hnisavá poranění kůže u dojiče	enzymy (př. fosfatázy, lipázy, proteázy); enterotoxin aj.	stafylokoková enterotoxikóza; infekce kůže; sepse; pneumonie; mastitidy zvířat aj.
Aflatoxikóza				
<i>Aspergillus flavus</i>	produkuje aflatoxiny, které mají karcinogenní účinky	zaplísňená krmiva	aflatoxiny B1, B2, G1, G2, metabolity M1, M2	poškozuje především játra a ledviny

1.2 Vliv technologických operací na mikrobiologii mléka

Před tím, než byly zavedeny technologické operace tepelného ošetření mléka, bylo mléko jedno z hlavních prostředků pro přenos široké škály onemocnění, a to i včetně tyfu, brucelózy a záškrtu. Po zavedení tepelného ošetření mléka byl počet onemocnění snížen na minimum. I tak ale syrové mléko může stále obsahovat velkou řadu patogenních mikroorganismů, jako je *Salmonella* spp., *E. coli* 0157:H7, *L. monocytogenes*, *Campylobacter* spp. a další. Tyto patogeny se ve většině případů přenáší z mléčné žlázy zvířete, od zemědělských pracovníků či z dojícího zařízení. Obecně řečeno, syrové mléko představuje potenciálně nebezpečný produkt, který je nutný pro dobrou mikrobiologickou jakost tepelně ošetřit, a to například pasteurací či sterilací (Fernandes, 2009).

1.2.1 Vliv tepelného ošetření

Dle Vyhlášky č. 289/2007 o veterinárních a hygienických požadavcích na živočišné produkty, které nejsou upraveny přímo použitelnými předpisy Evropského společenství, se musí mléko do oběhu uvádět tepelně ošetřené. Dvěma hlavními způsoby ošetření jsou pasterace a sterilace. Hlavním cílem tepelného ošetření je snížení mikrobiální kontaminace, deaktivace enzymů a minimální změna chemických i fyzikálních vlastností mléka. Během zahřívání může docházet k senzorickým změnám mléka (vzhled, barva, chuť a struktura) (Deeth, 2017).

Pasterace mléka je záhřev na teploty pod 100 °C (jedná se o technologicky nekyselou potravinu), při kterém dojde k usmrcení převážné části vegetativních forem mikroorganismů. Je žádoucí, aby při pasteračním zákroku došlo k minimálním chemickým a nutričním změnám. Při použití pasterace je hlavním cílem zajištění zdravotní nezávadnosti mléka a zvýšení trvanlivosti suroviny (Kadlec, 2012). Pasterizaci přežívají vysoce tepelně odolné (termorezistentní) spory jako prekurzory sporotvorných bacilů a klostridií. Spory pak mohou vytvářet nové vegetativní buňky a za příznivých podmínek se velmi rychle množit. Z tohoto důvodu je vhodné při pasteraaci zařadit i proces baktofugace, při němž jsou specifické mikroorganismy (vytvářející spory) z mléka odstraněny a poté inaktivovány (Spreer, 1998).

Jak již bylo uvedeno, syrové mléko může před pasteračním záhřevem obsahovat řadu patogenních mikroorganismů. Jejich zničení je spolehlivě dosaženo při teplotě odpovídající inaktivaci nativního mléčného enzymu alkalické fosfatázy (Kadlec, 2012). U tepelného

zákroku záleží na zvolení teploty a délky jejího působení. V tabulce (Tabulka č. 3) jsou znázorněny druhy pasterace s teplotní a časovou výdrží (Smetana, 2009).

Tabulka č. 3: Přehled typů pasterace

PASTERACE	TEPLOTA, VÝDRŽ, PASTER. EFEKT
Dlouhodobá	63 °C, 30 minut, 95 %-99 %
Šetrná	72 °C, 15 sekund, 99,5 %-99,9 %
Vysoká	85 °C, 5 sekund, 99,9 %-99,99 %

Dlouhodobá pasterace je využívána zřídka, vzhledem k dlouhé době záhřevu. Šetrná pasterace je indikována inaktivací alkalické fosfatázy, laktoperoxidáza je stále aktivní. Při tomto typu pasterace je dosaženo 99,9 % pasteračního efektu. Pasterační efekt je vyjádření účinnosti pasterace. Vlastnosti a chuť mléka při šetrné pasteraci jsou z velké části zachovány. Syrovátkové bílkoviny denaturují jen ze zhruba 15 %. Bakteriostatické vlastnosti mléka ovlivněny nejsou, což má pozitivní vliv na trvanlivost výrobku (Kadlec, 2012). Šetrná pasterace se využívá například při výrobě sýrů (Spreer, 1998). Vysoká pasterace, a tím i použití vyššího tepelného záhřevu, inaktivuje enzym laktoperoxidázu. U vysoké pasterace je dosaženo vyššího pasteračního efektu (nad 99,99 %) než u pasterace šetrné. Dochází také k částečné inaktivaci mléčné proteázy (plazminu) i bakteriálních proteáz a lipáz. K denuraci sérových bílkovin dochází z více než 50 %. Rozpustný vápník se mění na koloidní formu, bakteriostatické vlastnosti mléka jsou zničeny a nastává i změna v chuti mléka (vařivá chuť). Tento typ pasterace se uplatňuje především u výroby fermentovaných mléčných výrobků (Kadlec, 2012). Vysoká pasterace mléka je pro výrobu sýrů nevhodná tím, že narušuje vazbu mezi vápníkem a kaseinem v důsledku vysrážení vápníku, čímž se zhoršuje srážlivost mléka. Při vysoké pasteraci se zvyšuje viskozita prostředí, a tím se obtížněji odděluje syrovátka od sýřeniny (Spreer, 1998).

1.3 Čisté mlékařské kultury

Čisté mlékařské kultury (ČMK) jsou mikroorganizmy, které mají schopnost se rozmnožovat v čisté (tzv. monokultura) nebo smíšené kultuře, a jsou vybraná dle jejich specifických vlastností (Smetana, 2009). Jako inokulum se používají v množství minimálně 10^6 buněk s cílem zahájení fermentace (Kadlec, 2012). Využívají se kultury bakteriální, plísňové, kvasinkové nebo smíšené. K surovině se přidávají ve formě tekuté, mražené nebo

lyofilizované, za účelem zlepšení vzhledu, vůně, chutě, konzistence, trvanlivosti a nutriční hodnoty (Smetana, 2009).

1.3.1 Bakterie mléčného kvašení - rozdělení a jejich funkce

Bakterie mléčného kvašení (BMK) jsou specifické bakterie, jejichž hlavním úkolem je přeměna (fermentace) laktózy na organické kyseliny (Smetana, 2009). Řadí se mezi grampozitivní, nesporulující tyčinky nebo koky, většinou aerotolerantní anaeroby (Adams, 2016). Největší podíl produktů tvoří kyselina mléčná, aromatické látky a další metabolity v závislosti na tom, jaký rod specifických bakterií se na fermentaci podílí. BMK se mohou dělit nejen podle výsledného produktu, ale také podle teploty a vztahu ke kyslíku, jak je znázorněno v tabulce (Tabulka č. 4) (Smetana, 2009).

Tabulka č. 4: Základní rozdělení BMK

Dle produktů	Dle optimál. teploty růstu	Dle vztahu ke kyslíku
homofermentativní	mezofilní	Obligátně aerobní
heterofermentativní	termofilní	Obligátně anaerobní
		Fakultativně anaerobní

BMK můžeme dle jejich funkce rozdělit do tří skupiny:

1. Funkce technologická

BMK z technologického hlediska zajišťují aktivitu sacharolytickou, proteolytickou a lipolytickou. Při sacharolytické aktivitě dochází k fermentaci a vzniká jako výsledný produkt kyselina mléčná, která snižuje celkové pH. Při poklesu pH dochází k destabilizaci celého systému, které představují hlavně kaseinové micely. Při nižším pH ztrácí ochranný obal a dojde k vysrážení těchto kaseinových micel. Ve výsledku se tedy změní konzistence, a to z tekuté na rosolovitou až gelovitou (Smetana, 2009). Další důležitou aktivitou je metabolismus bílkovin. BMK syntetizují aminokyseliny z anorganického uhlíku nebo hydrolýzou z proteinového substrátu. Proteolytický systém je pro BMK velmi důležitý, neboť zajišťuje jejich rychlý růst a zároveň dodává typické organoleptické vlastnosti pro daný typ potraviny. Nejméně prozkoumaný je lipolytický systém. Ten je založen na enzymové hydrolýze triacylglycerolů na volné mastné

kyseliny. Ty jsou dále přeměny na hydroxykyseliny, laktony, ethylestery a další. Jejich úkolem je zajistit sensorickou část produktu (Horáčková, 2018).

2. Funkce sensorická

Při fermentaci vznikají i aromatické produkty, které se podílejí na chuti a vůni výrobku (jeho sensorických vlastnostech). Například ovocnou chuť u fermentovaných mlék vytváří kyseliny mléčná, acetaldehyd je součástí aroma jogurtu, v malém množství vznikající diacetyl dodává smetanou chuť a ostrou chuť kefiru dodávají etanol a CO₂ (Smetana, 2009).

3. Funkce probiotická a protektivní

Je velmi prospěšná funkce i pro člověka, neboť snižuje pH ve střevech. Upravuje tím prostředí pro růst tělu prospěšných bakterií a zároveň napomáhá redukci škodlivé mikroflóry střevního traktu. Zvyšuje se vstřebatelnost vápníku, fosforu a železa. Lepší vstřebávání vápníku napomáhá i vstřebatelnosti mléčných výrobků v organismu. Působí také zároveň antimikrobiálně, díky bakteriocinům, které některé kmeny ČMK produkují. (Smetana, 2009). Mezi bakteriociny patří například peroxid vodíku, enzymy, nízkomolekulární látky, deriváty aminokyselin a peptidy. V praxi se využívají pro inhibici nežádoucích mikroorganismů, které mohou způsobovat různá onemocnění z jídla. Je ovšem důležitá i volba bakteriocinů, protože nesmí působit inhibičně na technologicky žádané mikroorganismy a také nesmí způsobovat žádná zdravotní rizika, jako je například zvýšený obsah biogenních aminů (Horáčková, 2018).

Pro výrobu sýrů je vždy použita základní primární kultura, která se skládá ze skupiny mezofilních nebo termofilních mikroorganismů. Pro výrobu sýrů specifických vlastností se používá i sekundární kultura, která nemá funkci jako primární kultura (produkci kyseliny mléčné), ale produkuje sloučeniny, které způsobují organoleptické a biochemické změny v sýru. Do této skupiny sekundární kultury můžeme řadit mikroorganismy probiotické, propionové, mazové a plísňové. V tabulce (Tabulka č. 5) je znázorněn stručný přehled těchto mikrobiálních kultur s jejich specifickými produkty a využitím (Fox, 2004).

Tabulka č. 5: Stručná charakteristika mikrobiálních kultur

Skupina	Charakteristika, význam	Rod/Zástupci	Produkty	Využití
mezofilní	kysací a aromatická schopnost; působí bakteriostaticky až baktericidně (snížené pH); některé kmeny produkují antibiotické látky	<i>Lactococcus lactis</i> , ssp. <i>lactis</i> , <i>lactis</i> , ssp. <i>cremoris</i> , <i>lactis</i> , biovar <i>diacetyl-lactis</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides</i> , ssp. <i>cremoris</i> , ssp. <i>dextranicum</i>	L+ kyselina mléčná; D-kyselina mléčná; kyselina octová; CO ₂ ; diacetyl; etanol; dextrans; nizin;	samostatně nebo ve směsných kulturách při výrobě prakticky všech mléčných výrobků – kysaná mléka; smetana; máslo; sýry
termofilní	kysací schopnost; částečná proteolytická aktivita; kyselina mléčná snižuje pH sýřeniny, což napomáhá uvolnění vody a dehydrataci; inhibice růstu některých bakterií	<i>Streptococcus salivarius</i> , ssp. <i>thermophilus</i> , <i>Lactobacillus delbrueckii</i> , ssp. <i>bulgaricus</i> , <i>delbrueckii</i> , ssp. <i>lactis</i> , <i>helveticus</i> , <i>casei</i>	L+ kyselina mléčná; D-kyselina mléčná; DL-kyselina mléčná; kyselina octová; acetaldehyd; diacetyl; lactocin	výroba jogurtů, tvarohů, měkkých sýrů a sýrů s vysokodohřívanou sýřeninou
probiotické	pozitivní účinek na organismus člověka (zvířete) tím, že zlepšují složení a rovnováhu střevní mikroflóry; zlepšují imunitu; produkují antibiotické látky	<i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>casei</i> , <i>rhamnosus</i> , <i>delbrueckii</i> , ssp. <i>lactis</i> , <i>Bifidobacterium longum</i> , <i>breve</i> , <i>bifidum</i> , <i>infantis</i>	L+ kyselina mléčná; DL-kyselina mléčná; kyselina octová; kyselina mravenčí; acetaldehyd; diacetyl; vitamíny skupiny B; acidolin; laktocidin	nejčastěji součástí kultur pro výrobu probiotických výrobků (kysané výrobky, jogurty a jogurtové nápoje)
propionové	tvorba pravidelných ok v těstě sýra	<i>Propionibacterium freudenreichii</i> , <i>freudenreichii</i> , ssp. <i>shermanii</i>	kyselina propionová a kyselina octová v poměru 2:1; CO ₂ ; vitamín B12	výroba sýrů s tvorbou ok (Ementál, Madeland aj.)
mazové	vysoká proteolytická aktivita; produkce karotenoidních (žlutooranžových) pigmentů	bakterie: <i>Brevibacterium linens</i> , <i>Micrococcus roseus</i> kvasinky: <i>Torulopsis candida</i> , <i>Candida utilis</i> , <i>Kluyveromyces lactis</i>	produkty proteolytické a lipolytické aktivity; methanthiol; amoniak; těkavé mastné kyseliny	výroba sýrů s mazem na povrchu (Romadur, olomoucké tvarůžky aj.)
plísňové	tvorba plísní (bílá, modrá); proteolytická a lipolytická aktivita	<i>Penicillium camemberti</i> , <i>roqueforti</i>	produkty proteolytické a lipolytické aktivity	výroba plísňových sýrů (Hermelín, Niva aj.)

1.3.2 Faktory ovlivňující aktivitu ČMK

Jak již bylo popsáno, jedním z ukazatelů jakosti mléka jsou i celkový počet mikroorganismů, počet somatických buněk a obsah reziduí inhibičních látek. Zvýšený počet somatických buněk je inhibiční při technologickém využití čistých mlékařských kultur, které se uplatňují k výrobě kysaných mléčných výrobků, tvarohů a sýrů. Celková syřitelnost sýrů je horší, a tím se snižuje i výtěžnost produktu. I rezidua inhibičních látek mají negativní vliv na aktivitu čistých mlékařských kultur. Účinkují bakteriostaticky, zamezují tak jejich rozvoji (Smetana, 2009). Mezi negativní faktory působící na BMK patří také bakteriofágy. Při reakci BMK a bakteriofágů dochází k nižší produkci kyseliny mléčné. Tím u sýrů dochází k vadě chuti a textury, a následně také ke snížení jeho hodnoty. Napadení bakteriofágem vede i k tomu, že nedojde k dostatečnému snížení pH prostředí, a tím pádem může docházet k růstu patogenních bakterií (Fox, 2004).

2 ZRÁNÍ SÝRŮ

Chuť každého sýru je výsledkem rovnováhy mezi aktivitou více druhů mikroorganismů. Složení různých sloučenin v různých množstvích pro každý typ sýru lze přičíst mikrobiálnímu metabolismu. Vznik sýrové chuti je komplexní sít' metabolických procesů mezi mléčnými enzymy, nativní mléčnou mikroflórou a startovací kulturou. Laktóza, kasein a mléčný tuk jsou primárním zdrojem metabolismu mléka pro bakterie v sýrové matrici během procesu zrání. Sýry zrají ve zracích sklepích, kde je podle žádaného výsledného produktu nastavena optimální teplota, vlhkost a proudění vzduchu (Smetana, 2009).

Laktóza z mléčného cukru se během výroby metabolizuje na kyselinu mléčnou (Donnelly, 2014). Zbytková laktóza v sýřenině je využita bakteriemi zhruba do jednoho týdne od výroby sýru. Do měsíce je laktóza zcela vyčerpána a bakterie z ní již neprodukují glykolitické produkty. Po vymizení laktózy bakterie začínají využívat bílkoviny jako zdroj ATP (adenosintrifosfátu), uhlíku, síry a dusíku. Kaseiny jsou po rozpadu metabolizovány na peptidy a aminokyseliny. Ty tvoří metabolické prekurzory těkavých sloučenin síry, aldehydů, ketonů a mastných kyselin. Všechny tyto zmíněné sloučeniny přispívají k jedinečné chuti sýru. Konečný metabolismus lipolýzy se podílí na tvorbě lipolytické příchuti, která je známá například u italských sýrů. Lipolýza se podílí také na chuťových vadách v mléce, a následně i v dalších mléčných výrobcích (Weimer, 2007). K hydrolyze lipidové složky sýra dochází jen zřídka, neboť většina BMK má velmi nízkou lipolytickou aktivitu. Sýry se silnou lipolytickou aktivitou se obvykle vyrábějí za přídavku syřidla, které obsahuje lipázy. Známé zejména u modrých plísňových sýrů (Chandan, 2016). Celý tento komplex biochemických a mikrobiologických procesů tvoří jedinečnou chuť a aroma sýrů.

2.1 Metabolismus zbytkových sacharidických sloučenin

Složení kravského mléka z hlediska sacharidických složek sestává hlavně z laktózy a citrátu. Dále ve stopovém množství obsahuje složky glukózy, galaktózy, glukosaminu, galaktosaminu, neutrálních a kyselých oligosacharidů, nukleotidů a nukleových kyselin. Část bílkovin byla uvolněna z glykomakropeptidu κ – kaseinu, jejich koncentrace je nejvyšší v časném mlezivu, déle po porodu obsah prudce klesá (McSweeney, 2014).

Metabolismus sacharidů v sýru lze dle startovací kultury obecně rozdělit na homofermentaci a heterofermentaci. Homofermentativní mikroorganismy, jako je např. *Lactococcus lactis*, využívají ke konečnému produktu L – izomeru kyseliny mléčné glykolytickou cestu, zatímco *Lactobacillus helveticus* nebo *Streptococcus thermophilus* fermentují laktózu na D-

nebo DL- izomery kyseliny mléčné. Heterofermentativní mikroorganismy fermentují laktózovou složku na glukózu a galaktózu (nebo galaktózu-6-fosfát), a to po Embden-Mayerhof dráze. Glukóza je následně oxidována na pyruvát, a ten přeměnou na laktát a další sloučeniny jako je diacetyl, acetaldehyd, ethanol a oxid uhličitý (Chandan, 2016).

Během výroby sýru se většina laktózy odstraní při odkapu syrovátky (Velíšek, 2009). Avšak v sýřenině zůstane zhruba do 1,5 % laktózy. Obvykle je tato zbytková laktóza metabolizována na kyselinu mléčnou pomocí bakteriální kultury během několika prvních týdnů zrání. Rychlost fermentace laktózy závisí i na množství soli v sýru. Proto v sýrech s vysokou koncentrací solí (např. sýry zrající v solném nálevu) může obsah laktózy přetrvávat až půl roku (Chandan, 2016).

Laktát lze transformovat během zrání sýra několika způsoby (Chandan, 2016):

1. Racemizace pomocí non-startérových mikroorganismů na kyselinu mléčnou
2. Metabolismus propionových bakterií na propionát, acetát a CO₂
3. Metabolismus sekundární mikroflóry na výsledné produkty CO₂ a H₂O
4. Oxidace non-startérovými mikroorganismy na produkty acetát, ethanol, mravenčan a CO₂ (v sýrech během zrání nežádoucí)
5. Anaerobní metabolismus přes růst spor *Clostridium tyrobutyricum*, výsledným produktem tvorba kyseliny máselné a H₂ (v sýrech během zrání nežádoucí)

Vysoký obsah zbytkové laktózy v sýru může podpořit negativní vývoj jeho chuti či nežádoucích mikroorganismů. Například non-startérové mikroorganismy mohou zbytkovou laktózu metabolizovat na kyselinu mléčnou, ethanol a CO₂. Etanol se dále může esterifikovat volnými MK za vzniku ethylesterů. Ty jsou zodpovědné nejen za nežádoucí chuť sýra, ale mohou také výrazně přispět k texturnímu a nutričnímu deficitu v sýru. Mezi další nežádoucí účinky (na chuť a vzhled sýru) patří Maillardovo hnědnutí při zahřátí (Chandan, 2016).

Vzniku Maillardova hnědnutí předchází metabolizace pomocí *Streptococcus thermophilus* na galaktózu a kyselinu mléčnou. *Streptococcus thermophilus* ale není schopen galaktózu dále přeměnit, proto tuto roli přebírají laktobacily ve startovací kultuře sýru, které ji metabolizují na směs L- a D – kyseliny mléčné. Pokud jsou však laktobacily galaktóza-negativní, tak se galaktóza dále hromadí v sýřenině a způsobuje tak Maillardovo hnědnutí (Chandan, 2016). Samotné Maillardovo hnědnutí zahrnuje reakci mezi aldehydovou skupinou (redukující cukr například laktóza, galaktóza) a volnou aminoskupinou. Někdy

může dojít i ke zhnědnutí během skladování tepelně neupravených sýrů. Mírné zhnědnutí může být v některých pokrmech žádoucí (například lasagne, pizza), ale velmi tmavé zhnědnutí je nepřijatelné z estetického i výživového hlediska (Fox, 2004).

Neméně důležitý je metabolismus citrátu. Ten vede k produkci mnoha látek podílejících se zejména na chuti sýru. Většina citrátu přejde při zpracování do syrovátky (Law, 2010). Malý podíl citrátu, který zůstává ve sraženině se stane důležitým prekurzorem pro citronan-pozitivní mikroorganismy, mezi něž patří například *Lactococcus lactis* nebo *Leuconostoc* spp. Hlavními výslednými aromatickými sloučeninami tohoto metabolismu jsou acetát, diacetyl, acetoin, 2,3-butandiol a 2-butanon. 2,3-butandiol a 2-butanon přispívají k tvorbě máslového nebo acetonového zápachu, což je důležité hlavně u sýrů holandského typu (Chandan, 2016).

2.2 Proteolýza a katabolismus AMK

V pozdější fázi zrání sýrů začíná dominovat metabolismus bílkovin a metabolismus aminokyselin. Zároveň probíhají i katabolické mechanismy, které vytváří aroma sýru. Katabolické mechanismy jsou závislé na rodech a fyziologickém stavu mikroorganismů, které určují specifické metabolické procesy (Weimer, 2007). Postupná proteolýza vede v sýrech k měkčí struktuře a lepší chuti (McSweeney, 2014).

K hydrolyze proteinových fragmentů dochází prostřednictvím mikrobiálních proteáz a peptidáz. Peptidázy a proteinázy katalyzující proteolýzu pochází z více zdrojů, jako je například syřidlo, mléko, primární a sekundární kyselá kultura a non-startérové bakterie mléčného kvašení (Chandan, 2016).

Proteolýza v sýru je katalyzována proteinázou a peptidázou (Law, 2010). Z původních proteináz v mléce je nejvíce důležitý plasmin, což je tepelně stabilní enzym s optimálním pH kolem hodnoty 7,5. V důsledku toho, že je plasmin termostabilní proteinázou, tak je velmi aktivní hlavně ve vysokodohříváných sýrech. V mléce se nachází i somatické buňky. Kromě toho, že somatické buňky zabraňují infekci při mastitidě, obsahují i lysozomy, která zahrnují řadu proteináz, a to včetně katepsinu D, jehož aktivita v sýrech je omezená. Proteinázy jsou obsaženy také v buněčných stěnách startovacích BMK. Při dozrání sýrů proteinázy přispívají hlavně hydrolyzou meziproductu, který vzniká rozpadem kaseinu (při působení plasminu nebo chymosinu) na krátké peptidy. V mikroflóře zrajících sýrů jsou přítomny i non-starterové bakterie mléčného kvašení, jejichž peptidázy fungují na

obdobném principu jako peptidázy BMK, a tím přispívají k tvorbě látek během proteolýzy (McSweeney et al., 2017).

Některé typy sýrů se vyznačují i vývojem jiných bakterií nebo plísní. Tato doplňková kultura se do syrového mléka přidává záměrně, k vývoji chuti dané odrůdy sýru. Patří sem například *Propionibacterium freudenreichii* v sýrech švýcarského typu, *Penicillium roqueforti* v sýrech typu niva, *Penicillium camemberti* v sýrech s plísní na povrchu nebo i grampozitivní bakteriální mikroflóra v sýrech s mazem na povrchu. Tyto mikroorganismy mají silnou enzymatickou aktivitu, včetně proteináz a peptidáz, které přispívají proteolýze ve své specifické odrůdě sýru (McSweeney et al., 2017).

2.2.1 Koagulanty

Primární role syřidla chymosinu při výrobě sýrů je hydrolyzovat peptidickou vazbu mezi aminokyselinami Phe₁₀₅ – Met₁₀₆, čímž se naruší κ -kasein a stabilní micely začínají gelovat. Většina syřidla přidaného do pasterovaného mléka se odstraní odtokem se syrovátkou. Část ovšem zůstane ve sraženině a hraje hlavní roli v počáteční proteolýze kaseinů. Na aktivitě syřidla, které zůstane ve sraženině, je závislá jeho koncentrace, teplota, pH při odtoku syrovátku a vlhkost (McSweeney et al., 2017).

2.2.2 Proteázy

Mléko obsahuje řadu původních proteináz, z nichž plasmin je z hlediska zrání sýrů nejdůležitější. Plasmin je vylučován do krve jako neaktivní zymogen, plasminogen, který je poté aktivován na plasmin. Plasmin působí na kaseiny, přednostně na β – kasein a α_{s2} – kasein. Vazby β – kaseinu jsou hydrolyzovány a dojde k uvolnění γ – kaseinu. Příspěvek plasminu k proteolýze závisí na druhu sýru. Někdy je záměrně přidávána do sýření kyselina 6-aminohexanová, což je inhibitor plasminu, aby zajistila pomalejší degradaci β -kaseinu. Plasmin je důležitá látka v sýrech s vysokodohřívanou sýřeninou. Většina koagulantů je při vysokých teplotách inaktivována, zatímco plasmin je tepelně stabilní enzym, který přetrvává i vysoké teploty. Plasmin je zásadní při proteolýze zrajících sýrů s plísní na povrchu. Například v sýru Camembert dochází nejdříve ke katabolismu kyseliny mléčné a deaminaci aminokyselin. V důsledku vzniklého NH₃ dojde ke zvýšení pH povrchové vrstvy, kdy kyselina mléčná migruje ven a vzniklý NH₃ dovnitř. Zvýšené pH usnadňuje působení plasminu, což významně přispívá proteolýze těchto sýrů (McSweeney et al., 2017).

Proteinázy patří také mezi hlavní složky proteolytického systému bakterií a jsou asociované s jejich buněčnou stěnou, transportními systémy peptidů a řadou intracelulárních peptidáz. Během růstu bakterií v mléce dochází k počátečnímu kroku, a to hydrolýze kaseinu laktocepinem. Jsou uvolněny krátké peptidy (oligopeptidy), které jsou přijaty buňkou prostřednictvím transportních systémů peptidů. Další uvolňování z peptidů vede k tvorbě aminokyselin prostřednictvím intracelulárních peptidáz (McSweeney et al., 2017). Následný katabolismus aminokyselin vede k produkci aromatických látek.

Samotný metabolismus aminokyselin je složitější systém, kde aminokyseliny jsou transportovány laktokoky třemi různými mechanismy. AMK s rozvětveným řetězcem, alanin, serin a lysin jsou transportovány protonově hnacím mechanismem. Arginin je transportován uvnitř buňky ornitinovým transportem. Glutamát, glutamin, aspartát a asparagin jsou transportovány fosfátovým transportním systémem, který je poháněn pomocí ATP. Transport většiny AMK vyžaduje buď gradient (proton nebo kladný ion) nebo energii. Tento transport existuje pouze za podmínky, že jsou buňky životaschopné a aktivně metabolizují substráty (Weimer, 2007).

Katabolismus AMK je považován za hlavní cestu k tvorbě chuti v sýru. Tato aminotransferace vede k tvorbě α -ketokyselin, které jsou následně přeměněny na různé aromatické sloučeniny. Aminotransferázou, která iniciuje tuto reakci je enzym pyridoxal-5-fosfát. Ten se nachází uvnitř bakteriální buňky. Ketokyseliny jsou následně metabolizovány za vzniku mastných kyselin, alkoholů a aldehydů. Krátké mastné kyseliny již dále metabolizovány nejsou, a přímo se podílí na aroma sýru. Delší mastné kyseliny jsou ovšem dále přeměňovány za vzniku sensoricky aktivních látek. V sýrech se nachází i větší množství esteru, a to etyl esterů, které vznikají reakcí mastných kyselin a etanolu. Štiplavou chuť charakteristickou pro sýry s plísní v těstě způsobují metylketony, které vznikají při β -oxidaci mastných kyselin (Weimer, 2007).

AMK mohou podléhat také dekarboxylačním přeměnám. Děje se tak za přítomnosti dekarboxylačních enzymů, které mají za úkol odštěpit z aminokyseliny její karboxylovou skupinu. Dávají tak vzniku aminům, které dále mohou způsobovat vývoj pachu a pachutí (jako je například kadaverin a putrescin). Dekarboxylací AMK histidinu, tryptofanu a tyrozinu dávají vzniku histaminu, tryptaminu a tyraminu. Tyto aminy se nepodílí na vývoji chuti, nýbrž na nepříznivém fyziologickém účinku (Weimer, 2007).

2.3 Lipolýza

Lipolýza je fází zrání sýra, která značí rozklad mléčného tuku v sýru. Rozsah lipolýzy je u různých odrůd přírodních sýrů rozvinut odlišně. V kravském mléce se obsah tuku pohybuje od 3,5 % do 5 %, v závislosti na fázi laktace, plemene a stravě dojnice. Tuk je v mléce přítomen jako emulgovaná globule obklopená tenkou membránovou vrstvou. V mléčném tuku se nachází i volné mastné kyseliny (Weimer, 2007).

Mezi hlavní lipidy v mléce patří triacylglyceroly, které se skládají z glycerolu a esterově vázaných mastných kyselin. Méně než 1 % celkových lipidů představují fosfolipidy, hrají ovšem důležitou roli v membránách mléčného tuku. Fosfolipidy jsou amfifilní povahy a jsou silně povrchově aktivní, čímž umožňují stabilizaci emulze typu olej ve vodě, voda v oleji. Mezi fosfolipidy mléčného tuku patří fosfatidylcholin, fosfatidyletanolamin, sfingomyelin. Mléko obsahuje i stopové množství polárních lipidů ceramidů, cerebrosidů a gangliosidů. Mléčný tuk zůstává dispergovaný ve vodné fázi mléka díky cholesterolu, který působí jako přírodní emulgátor. Cholesterol je složen ze směsi proteinů, fosfolipidů, glykoproteinů a triacylglycerolů (Weimer, 2007).

Lipolýza v sýru probíhá působením dvou tříd enzymů – esterázy a lipázy. Esterázy hydrolyzují acylesterové řetězce od 2. do 8. uhlíku v řetězci. Lipázy hydrolyzují acylesterové řetězce od 10 uhlíku v řetězci. Esterázy působí na rozpustné látky ve vodném roztoku a lipázy působí na emulgované látky mléčného tuku (Chandan, 2016).

2.3.1 Lipolytické látky v sýru

Lipázy v sýru pocházejí z různých zdrojů, a to z mléka, syřidla, startovací bakteriální kultury, doplňkové kultury, non-startérových bakterií mléčného kvašení a z exogenních enzymových přípravků (Chandan, 2016).

Mléko obsahuje lipoprotein lipázu (LPL), který je za normálních okolností v mléce spojen s kaseinovými micely, zatímco glyceroly se v mléce vyskytují volně obklopené lipoproteinovou membránou. Pokud dojde k poškození tukové globulové membrány (v důsledku míchání, homogenizace nebo nevhodné manipulace s mlékem) může tak dojít k významné lipolýze, která vede k nepříjemným příchutím v sýrech. V mléce je enzym lipázy z 97 % deaktivován pasterací, proto tento enzym nikdy nedosáhne plné aktivity během zrání sýra (Chandan, 2016).

Syřidlo obsahuje lipolytický enzym progastrickou esterázu (PGE). Syřidla s přídavkem enzymu jsou využívána hlavně při výrobě tvrdých italských druhů sýrů (Chandan, 2016).

Bakterie mléčného kvašení mají lipolytické enzymy, které hydrolyzují estery volných mastných kyselin, tri-, di- a monoacylglycerolů. Obecně je lipolytická aktivita BMK slabá ve srovnání s jinými bakteriemi a plísněmi. V kmenech BMK převládá spíše aktivita esterázy než lipázy. Optimální podmínky BMK pro jejich lipolytickou aktivitu je pH 7,0 – 8,5 a teplota kolem 37 °C. Oproti tomu bakterie propionového kvašení jsou během lipolýzy mnohem aktivnější než BMK. Hrají významnou roli u odrůd švýcarského typu, kde během zrání vytváří klíčové chuťové složky. Lipolytické enzymy kvasinek a plísní významně přispívají k lipolýze během zrání. *Brevibacterium linens* využívá ke své lipolytické aktivitě intracelulární esterázu s optimálními podmínkami pH 7,5 a teplotou 35 °C (Chandan, 2016).

Volné mastné kyseliny uvolňované v důsledku lipolýzy přispívají přímo k sýrové chuti. Působí také jako substrát pro řadu katabolických reakcí vedoucích k produkci aromatických sloučenin, jako jsou methylketony, laktony, estery, alkany a sekundární alkoholy. Methylketony plísní tvoří jedinečnou chuť modrého sýra. Laktony dodávají sýru máslový charakter. Ethylestery se podílí na tvorbě ovocných a květinových aromatických tónů chuti (Chandan, 2016).

2.4 Faktory ovlivňující procesy zrání

Spotřebitelé, vzhledem ke stále se rozrůstajícímu trhu s potravinami, vyhledávají výraznější a zajímavější chutě. V oblasti výroby sýrů to znamená vyšší náklady na výrobu, a s tím i spojená delší doba zrání při optimální teplotě. Proto se v technologii výroby sýrů rozvinul zájem na urychlení procesu zrání (Farkye, 2004). Ke zintenzivnění procesu zrání můžeme přispět zvýšením teploty zrání, vysokotlakým zpracováním, přidáním exogenních enzymů, startovací kulturou s upravenou buněčnou stěnou, použitím doplňkové kultury či genomově modifikovanými bakteriemi mléčného kvašení (Eskin, 2013).

Zvýšená teplota skladování je často používanou technologií k urychlení zrání sýru. Existuje zde ovšem riziko růstu patogenních mikroorganismů za zvýšených teplot. Bylo prokázáno, že u sýrů tvrdých a polotvrdých byla doba zrání zkrácena přibližně o 60 %, aniž by byla ovlivněna chuť či struktura (Eskin, 2013).

Vysokotlaká technologie spočívá v aplikování vysokého tlaku v rozsahu 100 – 1000 MPa na velmi krátkou dobu. Tlakem dojde k rozpadu buněk, a tím k uvolnění a aktivaci

intracelulárních enzymů uvnitř buňky. Uvolněním enzymů dochází ke zvýšení rychlosti proteolýzy. Tento způsob zpracování je prozatím jen na laboratorní úrovni (Eskin, 2013).

Dalším možným faktorem ovlivňující zrání sýrů je aplikace exogenních enzymů. Ty se přidávají až do syrové matrice tzv. enkapsulací během jeho formování v gramovém množství, neaplikují se přímo do mléka, jelikož by byly odloučeny v syrovátce. Tato metoda je ve velkém měřítku ekonomicky velmi nevýhodná vzhledem k vysokým nákladům na fosfolipidy. V malém měřítku ovšem může posloužit ke zpestření tradičních chutí. (Eskin, 2013).

Startovací BMK mají primární roli fermentovat laktózu na kyselinu mléčnou, čímž dochází i k okyselení prostředí, proto není možné přidat do mléka jejich libovolné množství. Existují ovšem způsoby, kterými dojde k oslabení startovacích kultur, ale k zachování jejich intracelulárních enzymů pro uvolnění během zrání sýrů. Tyto oslabené buňky se nazývají atenuované, a mohou být připraveny několika způsoby, jako je šokové zmrazení, sušení rozprašováním nebo ošetření lysozimy za subletálních podmínek. Vědci zjistili, že například kmen *Lactobacillus helveticus* po mrazovém šoku vykazoval zvýšenou rychlost při tvorbě volných aminoskupin a ve fázi lipolýzy produkoval nejvyšší aroma. (Eskin, 2013).

U geneticky modifikovaných BMK dochází především ke změně metabolismu laktózy, k vyšší produkci peptidázy a zvýšené lýze startovacích buněk. Pro genetickou modifikaci byl zkoumán kmen *Lactococcus lactis*, u kterého byl pozměněn výše zmíněný metabolismus laktózy. Z laktózy byly metabolizovány klíčové meziprodukty α -acetolaktát (prekurzor diacetylu) a octan. Vyšší produkce peptidázy zabraňuje k hromadění hořkých peptidů, které mohou nepříznivě působit na aroma sýru. Větším rozsahem a rychlostí lýzy buněk vzniká i vyšší akumulace aromatických sloučenin, což pozitivně ovlivňuje chuť sýru. Geneticky upravená kultura *Lactococcus lactis* je komerčně využívána u sýrů typu Cheddar a sýrů holandského typu (Eskin, 2013). Geneticky modifikované potraviny jsou legislativně přísně hlídány, a proto dle Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1829/2003 o geneticky modifikovaných potravinách musí být na obalu uvedeno, že se jedná o potravinu, která obsahuje geneticky modifikované organizmy.

3 POTENCIÁLNÍ RIZIKA SPOJENÁ S KONZUMACÍ SÝRŮ

Mléčné výrobky, zejména sýry, mají z hlediska výživy velmi dobré nutriční vlastnosti. Sýry dodávají lidskému tělu až 50 % doporučené denní dávky vápníku. Při jejich výrobě může ale docházet nejen k získání důležitých živin, ale i k řadě negativním dopadům pro spotřebitele. Jedním z těchto rizik je tvorba biogenních aminů během zrání sýrů, které jsou pro člověka ve vyšším množství toxické (Šustová, 2018).

3.1 Biogenní aminy

Biogenní aminy (BA), jsou biologicky aktivní sloučeniny, jejichž vznik můžeme přisuzovat hlavně bakteriální aktivitě (mikrobiální dekarboxylaci) (Kotzekidou, 2016). Tvorba biogenních aminů probíhá během rozkladu bílkovin (Motarjemi, 2014). Substrát pro tvorbu biogenních aminů tvoří volné AMK, které vznikají během zrání sýrů při proteolýze. Obsah volných AMK se při delší době zrání zvyšuje (Linares, 2011). Biogenní aminy se vyskytují v široké škále potravin, včetně ryb, rybích výrobků, fermentovaných potravin a nápojů (pivo, víno, jablečný mošt). Přítomnost BA v potravinách se obvykle využívá jako indikátor nežádoucí mikrobiální aktivity (Spano et al., 2010). Podle chemické struktury můžeme biogenní aminy dělit na aromatické (tyramin, fenylethylamin), heterocyklické (histamin, tryptamin), alifatické diaminy (putrescin, kadaverin) a alifatické polyaminy (spermin, spermidin, agmatin) (Kotzekidou, 2016). Nejvíce důležité BA obsažené v potravinách jsou histamin, tyramin, putrescin, kadaverin a fenylethylamin získané dekarboxylací histidinu, tyrosinu, ornithinu, lysinu a fenylalaninu. Putrescin vzniká také dekarboxylací agmatinu (Alvarez et al., 2014).

Schopnost produkovat biogenní aminy má řada mikroorganismů, mimo jiné i grampozitivní a gramnegativní bakterie. Gramnegativní bakterie (*E. coli*, *Klebsiella pneumoniae* a *Serratia* spp.), které se v sýru a mléce nachází většinou jako kontaminanty, jsou schopné produkce histaminu. Gramnegativní bakterie *Enterobacteriaceae* jsou schopné produkovat putrescin a kadaverin. Mezi hlavní producenty biogenních aminů v sýru však patří grampozitivní bakterie. V této skupině zauímají hlavní roli BMK (rody *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* a *Streptococcus*). Tyto rody se podílí zejména na produkci histaminu a tyraminu. Původ všech zmíněných organismů můžeme hledat v mléčné mikroflóře, startovacích či doplňkových kulturách, nebo jako kontaminanty vzniklé při zpracování sýrů (Linares, 2011). Pro kontrolu BA v potravinách byly zvoleny různé metody umožňující detekci kmenů bakterií produkujících BA a monitorování produkovaných aminů

prostřednictvím potravinového řetězce. Nejběžnější analytickou metodou je vysoko účinná kapalinová chromatografie (HPLC) zahrnující derivatizaci BA (Alvarez et al., 2014).

3.1.1 Negativní dopad biogenních aminů na konzumenta

Biogenní aminy jsou pro spotřebitele nebezpečné pouze v nadlimitním množství. Jejich nízké hladiny normálně nebezpečné nejsou, jelikož jsou deaktivovány enzymy ve střevě. Ohrožení mohou být jedinci s nedostatkem těchto enzymů, mezi něž patří monoaminoxidáza, diaminoxidáza, polyaminoxidáza a N-methyltransferáza (Linares, 2011). U lidí s nedostatečnou účinností jejich detoxikačního systému může velké množství těchto aminů způsobovat zdravotní potíže (Spano et al., 2010). Je také známo, že konzumace více rizikových potravin najednou zvyšuje riziko nežádoucích účinků na organismus (Buňková a kol., 2012). Biogenní aminy přijímáme do těla většinou v potravinách, které obsahují vysokou hladinu volných aminokyselin či vysoký počet bakterií produkujících dekarboxylázu (Lawley et al., 2012).

Různé aminy mají tendenci převládat v různých potravinách v závislosti na přítomné aminokyselině, bakteriální populaci a způsobu skladování. Při testování akutní toxicity biogenních aminů byly zjištěny jednotlivé účinky těchto aminů (Lawley et al., 2012). Účinky BA lze klasifikovat jako reakci, intoleranci nebo intoxikaci podle závažnosti příznaků (Alvarez et al., 2014). Reakce zahrnuje nevolnost, pocení, vyrážky, mírné změny krevního tlaku a bolesti hlavy (Holzapfel, 2015). Příznaky intolerance jsou závažnější, projevují se zvracením, průjmem, zčervenání obličeje, jasně červenou vyrážkou, tachykardií, pálením úst, hypo-, nebo hypertenzí a migrénou. Intoxikace způsobuje hypertenzi, která způsobuje nevratné poškození srdce či centrální nervové soustavy (Alvarez et al., 2014).

Histamin a tyramin jsou považovány ze nejtoxičtější BA. Je známo, že přítomnost putrescinu a kadaverinu tyto účinky biogenních aminů zesilují (Alvarez et al., 2014). V potravinách obsahujících dusitany, jako jsou masné výrobky, může putrescin a kadaverin reagovat s dusičnany a produkovat karcinogenní sloučeniny. Tyramin můžeme, mimo jiných, nalézt ve vyšších koncentracích ve zralých sýrech i fermentovaném mase. Tyramin je spojován s hypertenzí, poruchami dýchání a bolestmi hlavy, zejména u jedinců, kteří trpí migrénovými bolestmi hlavy. Histamin můžeme nejčastěji nalézt u ryb a v rybích výrobcích. Otrava histaminem u ryb je známá jako scombrotická otrava. Scombrotin se neomezuje pouze na čerstvé a zmrazené ryby, ale může být přítomen také v konzervovaných rybích

produktech (Lawley et al., 2012). Příznaky histaminové otravy mají poměrně velký rozsah symptomů připomínající alergickou reakci, a to pocit pálení nebo brnění, kožní vyrážka, hypotenze, bolest hlavy, návaly horka. V některých případech dokonce i zvracení a průjem (Fernandes, 2009). Příznaky otravy obvykle samy vymizí do 24 hodin, ale mohou být snadno léčeny antihistaminiky (Motarjemi et al., 2014).

Z hlediska hladiny koncentrací biogenních aminů v současnosti existují zvláštní právní předpisy pouze pro ryby a produkty rybolovu. Pro ostatní suroviny existují jejich doporučené dávky, které mohou být překročeny a představovat tak potencionální zdravotní riziko (Kotzekidou, 2016). EU zavedla legislativní mezní hodnoty pouze pro histamin u ryb, jelikož jde o nejčastější intoxikaci biogenními aminy. Horní hranice histaminu u čerstvých nebo konzervovaných ryb je 100 mg/kg a 200 mg/kg pro fermentované ryby (Evropská komise, 2005). Z tohoto důvodu je důležitý pravidelný monitoring biogenních aminů v sýrech a zajištění opatření ke zlepšení bezpečnosti potravin (Kotzekidou, 2016).

3.1.2 Faktory ovlivňující tvorbu biogenních aminů

Množství a typ biogenních aminů vznikajících v potravinách je silně ovlivňován charakteristikou potraviny, včetně pH, aktivitou vody, obsahem mikroorganismů (Friaz, 2017), ale také je ovlivňován vnějšími parametry, jako je doba a teplota skladování potraviny (Alvarez et al., 2014).

Jedním z významných technologických faktorů ovlivňující tvorbu biogenních aminů je pH média. Při okyselení prostředí dochází ke snížení počtu kontaminujících gramnegativních bakterií, a tím snížení produkce biogenních aminů. Je ovšem i zjištěno, že v kyselém prostředí roste produkce tyraminu. Tato změna koncentrace tyraminu byla pozorována v sýru zrajícím při normálním pH a při pH 5,0. Hodnota pH 5,0 je optimální pro dekarboxylázové enzymy (Linares, 2011). Dalším významným faktorem ovlivňující tvorbu biogenních aminů je teplota. Při použití nižších teplot zrání sýrů (20 °C místo 32 °C) byla pozorována snížená tvorba biogenních aminů v sýrech, v důsledku zpomalení až zastavení růstu mikroorganismů s dekarboxylázovou aktivitou. I jejich analýzou v sýrech vyrobených ze syrového a pasterizovaného mléka bylo prokázáno, že sýr ze syrového mléka obsahuje vyšší počet biogenních aminů. Díky čemuž můžeme usoudit, že pasterací se snižuje přítomnost producentů biogenních aminů. V některých fermentovaných potravinách je obtížné zabránit akumulaci biogenních aminů, protože podmínky fermentace nelze snadno upravit. Proto se v takových případech používají potravinářské mikroorganismy, které jsou

schopny degradovat BA. Degradace biogenních aminů probíhá na základě aktivity enzymů aminooxidáz, které byly nalezeny v bakteriích rodu *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Micrococcus*, *Bacillus* a kvasinky *Brevibacterium linens*. Do této skupiny aminooxidáz patří i histamin oxidáza, která katalyzuje oxidační deaminaci histaminu na imidazol, acetaldehyd, amoniak a peroxid vodíku (Alvarez et al., 2014). Posledním faktorem z hlediska technologie výroby je koncentrace NaCl. Při vyšším množství NaCl v sýru byla zjištěna nižší koncentrace biogenních aminů, jelikož vyšší koncentrace solí snižuje metabolickou aktivitu producentů biogenních aminů (Linares, 2011). Je však důležité brát zřetel na to, že každý ze sýrů má svou vybranou texturu, chuť, kvalitu a není vždy možné upravit proces výroby sýrů.

3.2 Další rizika spojená s konzumací sýrů

Obecně platí, že sýr je při správné výrobní praxi velmi bezpečný produkt. Pokud je ovšem tato výrobní praxe narušena, může dojít ke kontaminaci sýru, a tím i k ohrožení spotřebitele. Jedním z rizik spojených s konzumací sýru je i výskyt bakteriálních patogenů (nejčastěji *Salmonella enterica*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* a patogenní *Escherichia coli*). Mezi další rizika můžeme řadit výskyt mykotoxinů či vyšší příjem cholesterolu.

Při výrobě všech sýrů je důležitá kvalita syrového mléka. Nejdůležitější je ovšem u těch sýrů, které jsou vyráběny ze syrového mléka. Klíčovým faktorem jsou nízké počty bakterií a nízký počet somatických buněk v mléce. Pokud se začne jejich počet zvyšovat, existuje zde riziko kontaminace mléka a sýrů patogeny, kdy je vhodné mléko ošetřit pasterací, pro snížení jejich počtu. Současná legislativa ale umožňuje i výrobu sýrů z nepasterizovaného mléka. Dle Nařízení Evropského Parlamentu a Rady č. 853/2004 je ovšem provozovatel potravinářského podniku povinen informovat spotřebitele o použití syrového (nepasterovaného) mléka. Sýry z nepasterovaného mléka se ke spotřebiteli dostávají zejména prostřednictvím z obchodů s farmářskými výrobky, či přímo z farmy (Hrbek, 2013). Mezi nejobávanější patogeny nepasterovaného mléka patří *Listeria monocytogenes*, která způsobuje onemocnění listeriózu. Mezi nejohroženější skupiny lidí patří hlavně těhotné ženy, novorozenci a osoby s oslabeným imunitním systémem (Ryser, 2007). Onemocnění se projevuje horečkou, bolestí ve svalech, žaludečními nevolnostmi, zvracením nebo průjmem. Listerii usmrcuje tepelný zákrok (sterilizace či pasterace). Může ovšem také dojít k rekontaminaci výrobku po zpracování, proto je doporučeno, aby se těmito výrobky rizikové skupiny lidí vyhýbaly (MZe, Bezpečnost potravin).

Dalším rizikem, které vzniká většinou při špatném skladování sýrů (porušení chladírenského řetězce), může být rozvoj mykotoxinů, zejména u plísňových sýrů. *Penicillium camemberti* produkuje kyselinu cyklopiazonovou, zatímco *Penicillium roqueforti* produkuje toxin rofortin a patulin. V sýrech mohou být přítomny i další mykotoxiny, jako jsou například aflatoxin, citrinin či sterigmatocystin. Mykotoxiny mohou být ve vyšších dávkách karcinogenní. Růst mykotoxinů v sýrech může být potlačen přidávkem konzervačních látek (např. sorbát, natamycin) (McSweeney et al., 2017).

Vzhledem k tomu, že spotřeba sýrů v posledních letech stoupá, zvyšuje se tím i příjem cholesterolu, který sýr obsahuje, a tím zvýšené riziko kardiovaskulárních chorob pro člověka. Obsah tuku v sýru se značně liší. Obecně je ale známo, že sýry obsahují zhruba 60 % nasycených mastných kyselin z celkového obsahu lipidů, které cholesterol (jako součást lipoproteinů) transportuje krví. Při konzumaci sýrů s vyšším obsahem tuků doporučili odborníci snížit příjem. Na tento fakt reagovaly i tržní sítě, a začaly na trh uvádět sýry se sníženým obsahem tuku. (McSweeney et al., 2017).

II. PRAKTICKÁ ČÁST

4 CÍLE PRÁCE

Cílem diplomové práce bylo posoudit vývoj obsahu biogenních aminů v průběhu zrání v závislosti na použité kultuře. Pro dosažení tohoto cíle byly vytyčeny dílčí cíle:

- Vyrobit modelové vzorky sýrů s přídavkem vybraných biogenních aminů
- Porovnat koncentrace biogenních aminů mezi kontrolní šarží a šarží inokulovanou kmenem *Lactocaseibacillus casei* CCDM 198, který je schopen degradovat biogenní aminy

5 METODIKA

5.1 Výroba modelových vzorků

Byly vyráběny modelové vzorky sýrů holandského typu s nízkodohřívanou sýřeninou. Vzorky byly vyrobeny v laboratořích Ústavu technologie potravin Fakulty technologické. Celkem byly vytvořeny 2 různé šarže sýrů. Postup výroby a přidavek smetanové kultury byl pro obě šarže shodný. Během výroby byly do obou šarží přímo přidány biogenní aminy kadaverin, tyramin, fenylethylamin a putrescin v koncentraci 3,6 g daného biogenního aminu na 1 litr mléka s tím, že do druhé šarže byla navíc přidána kultura schopná degradace biogenních aminů.

- Modelová šarže sýrů K – kontrolní šarže (bez očekávané degradace biogenních aminů)
- Modelová šarže sýrů R – přidavek degradéra biogenních aminů *Lactocaseibacillus casei* CCDM 198

V grafech výsledkové části budou modelové vzorky kódovány následovně:

- Vzorek KS – sýřenina kontrolních modelových vzorků K
- Vzorek RS – sýřenina modelových vzorků R s degradujícím kmenem
- Vzorek K – kontrolní šarže modelových vzorků
- Vzorek R – šarže modelových vzorků s degradujícím kmenem

5.1.1 Materiál a pomůcky

- Syrové mléko
- Lyofilizovaná smetanová mezofilní kultura (Lactoflora, Milcom a.s., Česká republika)
- Nasycený roztok 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)

- Výrobce sýrů (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

5.1.2 Postup výroby modelových vzorků

Před zahájením práce byly veškeré předměty, které přišly do styku se surovinou, meziproductem a sýry, dezinfikovány a následně opláchnuty pitnou vodou pro zamezení přenosu reziduí dezinfekčních/inhibičních látek do produktu. Dále byly výrobní prostory laboratoře přes noc (před vlastní výrobou sýrů) vysvíceny germicidní (UV-lampou). Těsně před použitím byly ošetřeny použité nádoby, výrobce a lisovací vana vodní parou pomocí vyvíječe vodní páry.

Den 1: Příprava provozního zákysu

Při výrobě jedné šarže sýrů bylo použito 18 l kravského mléka a 80 ml smetanového provozního zákysu smetanové kultury Laktoflora. Zákys byl připraven v 50ml zkumavkách (plastových vzorkovnicích) z vysoce pasterovaného mléka. Byly použity 4 vzorkovnice, každá vzorkovnice obsahovala 40 ml mléka. Do vzorkovnice bylo nalito mléko, zkumavka uzavřena, označena kódem zákysu a vložena do stojanu vroucí vodní lázně. Hladina vodní lázně dosahovala do 2/3 výšky sloupce pasterovaného mléka. Po 30 minutách záhřevu bylo mléko ponecháno v uzavřené zkumavce k vychladnutí na 30 ± 2 °C. Smetanová kultura o množství 0,15 g/40 ml mléka byla inokulována do mléka vytemperovaného na 30 ± 2 °C a to tak, že víčko zkumavky bylo uzavřeno a směs důkladně promíchána pro dokonalé rozptýlení kultury v mléce. Poté byl zákys kultivován v termostatu na 25 ± 1 °C po dobu 16-20 hodin. Dále byl zákys s degradérem biogenních aminů připraven tak, že se 2,5 ml živného média s kmenem inokulovalo do 20 ml mléka. Kultivace byla provedena stejným způsobem jako u smetanového zákysu.

Den 2: Postup výroby sýrů s nízkodohřívanou sýřeninou

Syrové mléko bylo nejdříve přehřáto v nádobě s mezipláštěm na teplotu 37 °C (teplota byla odečítána pomocí vpichového digitálního teploměru). Mléko bylo následně převedeno do odstředivky a odstředěno na rychlostní stupeň 6. Účinkem odstředivé síly bylo mléko separováno na mléčný tuk (smetana, obsah tuku 45 %) a mléčnou plazmu (odstředěné mléko, obsah tuku přibližně 0,02 %). Obě frakce byly sbírány odtokovými kanály do předem připravených nádob. Poté byla provedena standardizace mléka na požadovaný obsah tuku v sušině 45 %. Mléko bylo standardizováno ve standardizační nádobě navážením a smícháním odstředěného mléka a smetany na celkový objem 18 l. Následně byla provedena šetrná pasteurace diskontinuálním způsobem ve výrobníku při teplotě 72 °C po dobu 30 vteřin. Pasterované mléko bylo následně ochlazené a vytemperováno na inokulační a sýřicí teplotu 32±1 °C. Po vytemperování mléka byl inokulován připravený provozní zákys a 9 ml nasyceného roztoku CaCl₂ pro podpoření sýření. Současně byly do mléka přidány jednotlivé biogenní aminy (fenylethylamin, putrescin, kadaverin a tyramin) v množství 200 mg/l mléka (celkem bylo přidáno množství každého BA 3,6 g na výrobní šarži). Takto připravená směs byla dokonale promíchána a za současného míchání se ponechala 20 minut prokysat. Po prokysání bylo do mléka přidáno 2 700 µl syřidla (Chymax 200), ředěného v desetinásobku pitné vody. Směs byla krátce a intenzivně promíchána a následně zklidněna pohybem míchadla (opačným otáčením) a ponechána v klidu po dobu 30 minut. Míchadlo bylo po ustálení hladiny vyjmuto z výrobníku.

Po 30 minutách sýření byla sýřenina prokrojena pomocí sýrařské harfy (podélně i příčně) a ponechala se 10 minut v klidu. Následně se sýřenina pomocí sýrařské harfy s vertikálními strunami opatrně rozdrobila a pomocí míchadla se sýřenina dalších 30 minut míchala k podpoření vytužování sýrařských zrn. Poté byla za stálého míchání přes síto odebrána část syrovátky o objemu přibližně 5,25 l a k sýrařskému zrnu byla velmi pomalu přidána voda o objemu 3,5 l a teplotě 60 °C, čímž teplota systému vzrostla na 37 °C (dohřívání sýrařského zrna). Pro udržení požadované teploty systému byla použita regulace teploty pomocí řídicí jednotky výrobníku. Dosoušení sýrařského zrna probíhalo za stálého míchání pomocí míchacího zařízení po dobu 30 minut při maximálním výkonu míchadla.

Po uplynulé době dosoušení zrna následovalo formování a lisování sýřeniny. Sýřenina byla slita do vany, kde byla předlisována. Předlisování trvalo 20 minut. Následně bylo část sýřeniny odebráno k dalším chemickým analýzám (vzorky KS a RS). Poté byla předlisovaná sýřenina přemístěna do 6 lisovacích forem, které byly vyloženy plachetkou. Sýřenina se

lisovala pomocí lisu s postupně se navyšující zátěží 5 kg, 15 kg a 25 kg. Každým závažím byla sýřenina zatížena 30 minut. Poté byly bloky sýrů z forem vyjmuty, otočeny a lisovány po dobu 60 minut pomocí 25 kg zátěže. Po lisování byly sýry uloženy do nádob a umístěny do lednice k prokysání do druhého dne.

Po prokysání byly sýry soleny v solné lázni a ošetřeny antimykotickou suspenzí. Následně se nechaly sýry oschnout po dobu 30 minut a byly baleny do smrštitelných fólií na vakuové baličce. Zabalené bloky sýrů byly ponořeny do horké vody ke smrštění fólie. Označené bloky sýrů se následně uložily do zrací komory. Odběry vzorků byly provedeny po 1. dnu výroby, a poté po 14., 28., 56. a 84. dnu zrání.

5.2 Základní chemická analýza

5.2.1 Stanovení obsahu sušiny

Obsah sušiny byl stanoven vázkovou metodou, vyjádřený jako hmotnostní úbytek po vysušení vzorku. Ke stanovení obsahu sušiny byly naváženy 3 g rozmixovaného sýru do předem vysušených hliníkových misek s křemičitým pískem. Takto navážené vzorky byly umístěny do sušárny a sušeny při teplotě 105 ± 1 °C po dobu 5 hodin. Po uplynutí této doby byly vyjmuty ze sušárny a znovu zváženy. Výsledný obsah sušiny byl vypočten dle 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]

5.2.2 Stanovení obsahu tuku

Obsah tuku byl stanoven pomocí butyrometrické metody. Do butyrometru byly naváženy 3 g rozmixovaného sýru. Následně bylo přidáno 14 ml kyseliny sírové. Butyrometr byl vložen do horké vodní lázně o teplotě 65 °C a velmi opatrně promícháván. Jakmile byl vzorek rozpuštěn, přidal se amylalkohol, aby bylo dosaženo ostrého rozhraní. Takto vytvořená směs byla promíchána. Uvolněný tuk byl následně odstředěn a v kalibrované části butyrometru byl odečten obsah tuku. Výsledný obsah tuku byl vypočítán dle vzorce:

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

t – tučnost [%]

s – sušina [%]

5.2.3 Stanovení pH

Ke stanovení pH v sýrech byl použit vpichový pH metr. U každého vzorku bylo provedeno celkem 6 měření, z nichž byla stanovena průměrná hodnota.

5.2.4 Stanovení obsahu soli

Pro stanovení soli byla využita potenciometrická titrace pomocí dusičnanu stříbrného. S přesností na 4 desetinná místa byl navážen 1 g rozmixovaného vzorku sýru. Tento rozmixovaný vzorek byl rozetřen ve třecí misce, přidáno 10 ml teplé destilované vody a kvalitativně převedeno do kádinky. Do kádinky ke vzorku byly přidány 2 ml HNO₃, a následně byl vzorek doplněn destilovanou vodou do takového objemu, aby teploměr a elektrody byly ponořené. Směs v kádince byla titrována roztokem dusičnanu stříbrného, a vždy po přidavku 0,5 ml byly zaznamenány hodnoty napětí. Výsledný obsah soli byl sestaven z druhé derivace.

5.3 Mikrobiologický rozbor

Při mikrobiologickém rozboru byl u každého vzorku stanoven celkový počet mikroorganismů, počet mléčných koků, počet mléčných tyčinek, počet koliformních bakterií, enterokoků, kvasinek a plísni.

Z každého vzorku sýru bylo sterilně odebráno 5 g vzorku ke kvantitativnímu kultivačnímu vyšetření. Následně bylo ke vzorku přidáno 45 ml fyziologického roztoku. Takto připravená směs byla vložena do homogenizátoru po dobu 3 minut. Poté byla provedena řada desetinásobného ředění a zkumavky byly promíchány na vortexu. Na povrch kultivační půdy bylo metodou roztěru odebráno 100 µl vzorku z každého ředění. K mikrobiologickému rozboru bylo odebráno také syrové mléko a smetanový provozní zákys.

Počet mikroorganismů byl vypočten jako průměr ze dvou po sobě jdoucích ředění dle vzorce:

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

$\sum C$ – součet kolonií všech ploten

V – objem inokula [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 při prvním zvoleném ředění

Výsledky jsou vyjádřeny v počtu KTJ – kolonie tvořících jednotek v 1 g (ml).

Ke stanovení celkového počtu mikroorganismů (CPM) byla použita neselektivní živná půda PCA (Plate Count agar), kde misky byly kultivovány aerobně při 30 °C po dobu 48 hodin. Pro stanovení laktokoků byla použita půda M17, u které misky byly kultivovány při 37 °C po dobu 48 hodin za aerobních podmínek. Pro stanovení počtu laktobacilů byla zvolena půda MRS agar. Kultivace probíhala anaerobně při 30 °C po dobu 48 hodin. Na selektivně diagnostické půdě Endův agar (EA) byly stanoveny počty koliformních bakterií, které se kultivovaly při teplotě 30 °C po dobu 48 hodin aerobně. Pro stanovení enterokoků byl zvolen Slanetz-Bartley agar (SB agar). Misky s enterokoky byly inkubovány při 37 °C po dobu 48 hodin aerobně.

5.4 Stanovení obsahu biogenních aminů

Při stanovení obsahu biogenních aminů byla nejprve provedena extrakce pomocí kyseliny chloristé. Byl navážen 1 g rozmixovaného vzorku sýru po lyofilizaci, a k tomu bylo přidáno 10 ml 0,6M-kyseliny chloristé. Směs byla promíchána na vortexu a třepána na třepačce po dobu 40 minut. Poté byl vzorek odstředěn po dobu 10 minut a vzniklý supernatan přelit do 25ml odměrné baňky. K sedimentu ve zkumavce bylo přidáno 7,5 ml 0,6M-kyseliny chloristé a opět promícháno. Tento celý proces byl opakován ještě dvakrát. Celkový supernatan byl přefiltrován přes papírový filtr a extrakt uschován v mikrozkuvkách.

Po extrakci následovala derivatizace vzorku. Do derivatizační nádoby bylo pipetováno 100 μ l 1,7 – heptandiaminu o koncentraci 500 mg/l (vnitřní standard). Ke vnitřnímu standardu byl přidán 1 ml vzorku, 1,5 ml karbonátového pufru s pH 11,1 – 11,2 a 2 ml čerstvě připraveného roztoku dansylchloridu o koncentraci 5 g/l v acetonu. Derivatizační nádoba byla uzavřena a třepána v temnu po dobu 20 hodin. Po uplynutí této doby bylo ke vzorku přidáno 200 μ l roztoku prolinu a třepáno další 1 hodinu. Po hodině byl přidán 1 ml heptanu a vzorek byl 3 minuty třepán ručně. Po ustálení hladiny bylo ze vzorku odpipetován 1 ml heptanové vrstvy do vialky, které byly odpařeny při teplotě 60-65 °C do sucha pod proudem dusíku. Suchý odparek byl zředěn 1 ml acetonitrilu.

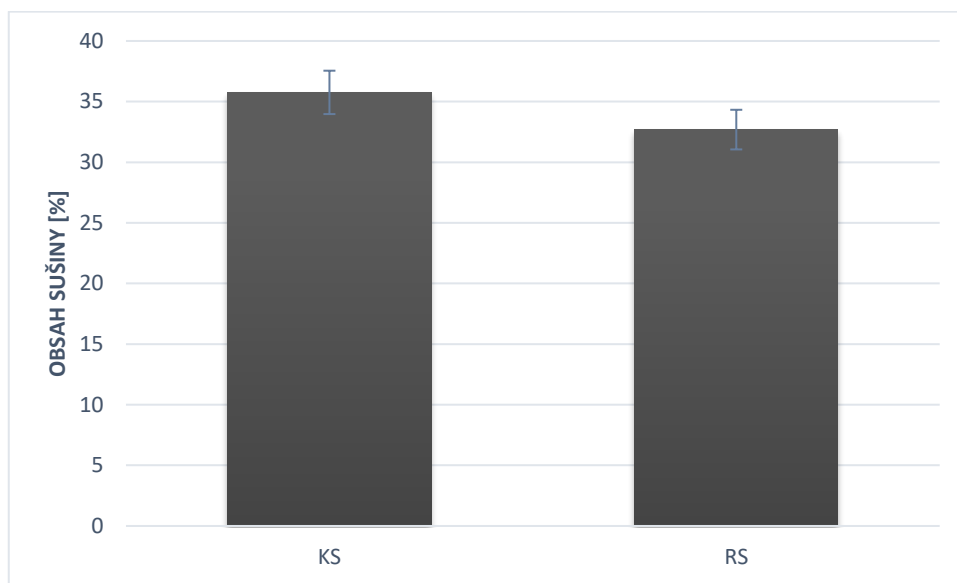
Takto připravený vzorek byl přefiltrován přes stříkačkový filtr s porozitou 0,22 μm a dávkován do chromatografického systému.

6 VÝSLEDKY A DISKUZE

6.1 Základní chemická analýza

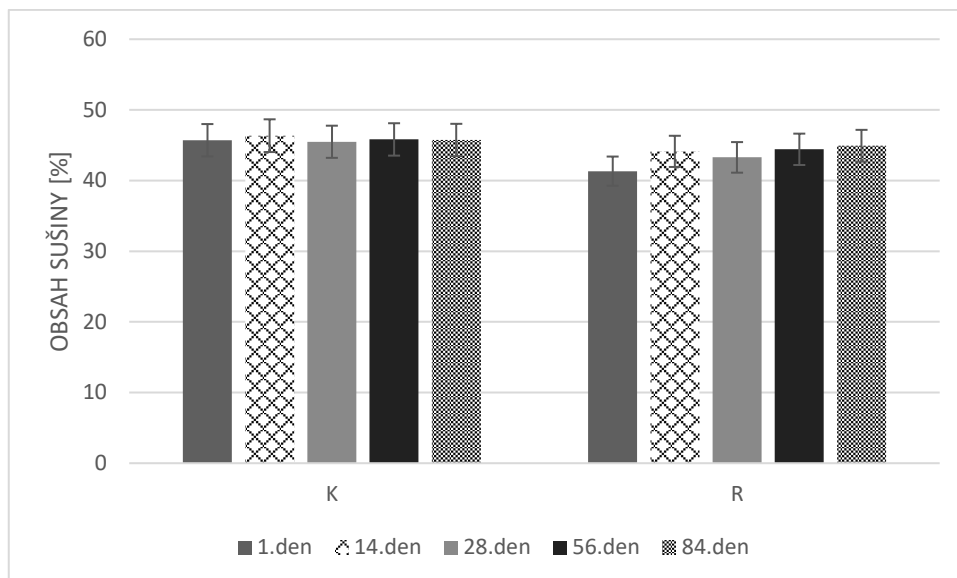
6.1.1 Stanovení obsahu sušiny

V průběhu zrání modelových vzorků sýrů bylo provedeno stanovení obsahu sušiny. Výsledné obsahy sušiny v sýřenině a ve vyrobených sýrech v průběhu jejich zrání jsou uvedeny na Obrázku č. 2 a na Obrázku č. 3.



Obrázek č. 2: Obsah sušiny v sýřenině

Nejprve byla stanovována sušina u sýřenin (před lisováním) obou vzorků sýrů (vzorky KS a RS). Hodnota sýřeniny kontrolního vzorku (KS) činila $35,76 \pm 2,78$ %, a hodnota sýřeniny s degradujícím kmenem *Lactocaseibacillus casei* CCDM 198 (RS) byla vypočtena na hodnotu $32,69 \pm 2,11$ %. Ze srovnání hodnot obou sýřenin je zřejmé, že obsah sušiny ve vzorku KS byl vyšší, stejně jako průměrná hodnota sušiny vzorku K. Nicméně rozdíl v obsahu sušiny mezi vzorky byl nevýznamný.



Obrázek č. 3: Obsah sušiny v průběhu zrání sýrů

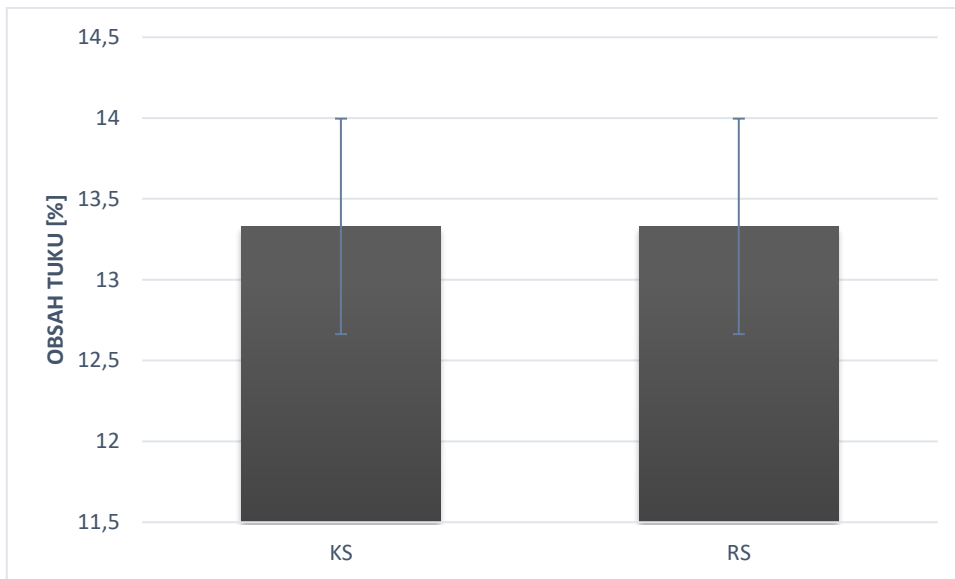
V průběhu zrání byl u modelových šarží sýrů pozorován vývoj jejich sušiny. Jejich hodnoty byly téměř srovnatelné, průměrná hodnota obsahu sušiny byla $44,72 \pm 0,55$ %. Z grafu lze vyčíst, že u šarže modelového vzorku R (sýr s degradujícím kmenem) byl stanoven mírně nižší obsah sušiny, a to v průměru $43,62 \pm 0,42$ %. U modelového vzorku K byla sušina mírně vyšší, průměrná hodnota byla $45,82 \pm 0,67$ %. Dále lze vyčíst, že po 14 dnech došlo k mírnému nárůstu sušiny, ale po 28 dnech došlo u obou šarží k poklesu. Po 56 dnech došlo opět k nepatrnému nárůstu obsahu sušiny, který byl téměř srovnatelný s obsahem sušiny po 84 dnech. Z uvedených výsledků lze však konstatovat, že změny v obsahu sušiny u obou sledovaných šarží sýrů nebyly významné. Mírný nárůst sušiny v průběhu zrání obou šarží sýrů vznikl pravděpodobně z důvodu mírného odpaření vody ze sýrů (Fox, 2004).

6.1.2 Stanovení obsahu tuku

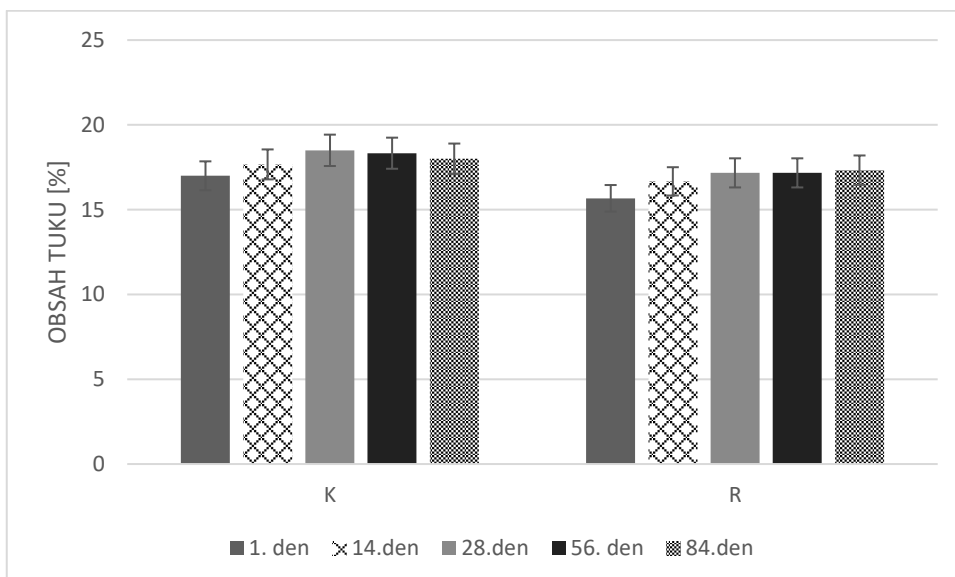
Jako další stanovení bylo provedeno stanovení obsahu tuku, a také stanovení obsahu tuku v sušině. Obrázek č. 4 a Obrázek č. 5 uvádí obsah tuku v průběhu zrání v sýřenině a sýrech.

Obsah tuku v sýřenině (Obrázek č. 4) obou vzorků sýrů byl stanoven na stejnou hodnotu, a to 13,33 %. Z výsledků lze konstatovat, že přidavek protektivního kmene neměl vliv na obsah tuku v sýřenině (zachycení tukových kuliček v trojrozměrné proteinové síti sýřeniny).

Z Obrázku č. 5 lze vyčíst, že průměrný obsah tuku ve vzorcích sýrů se pohyboval v rozpětí 16,8 – 17,9 %. Výsledky šarže sýrů K jsou vyšší, průměrná hodnota byla stanovena na $17,9 \pm 0,27$ %. U sýrů šarže R činila průměrná hodnota tuku $16,8 \pm 0,25$ %.

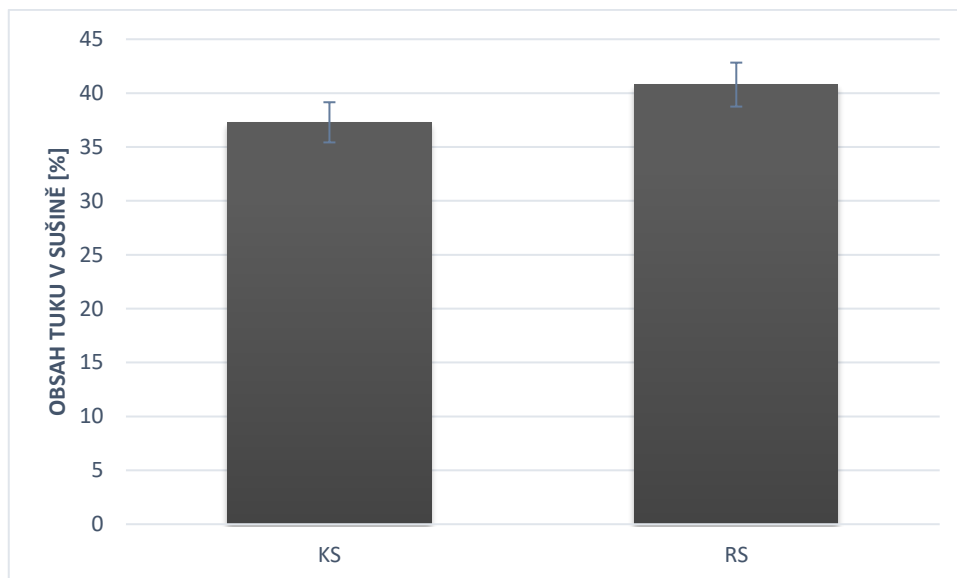


Obrázek č. 4: Obsah tuku v sýřenině



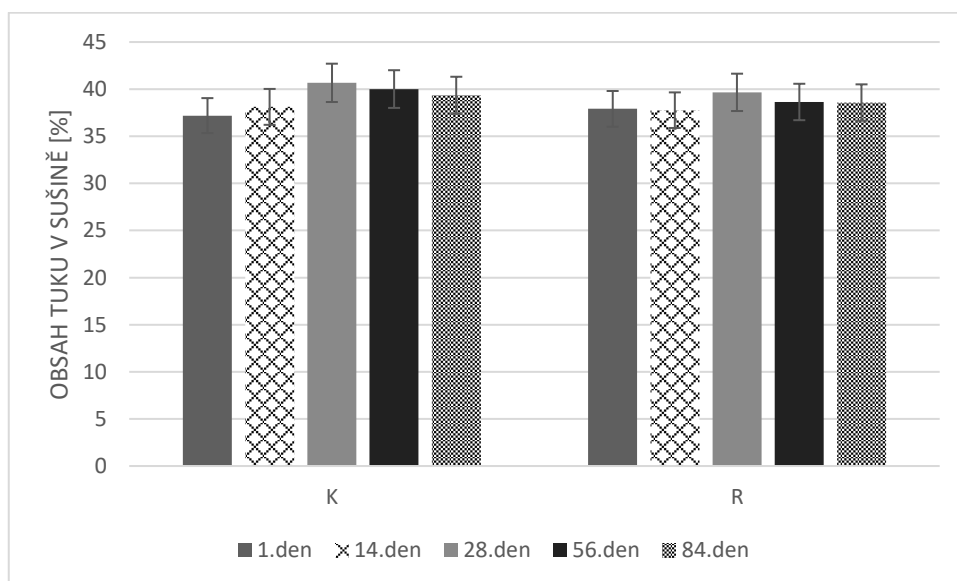
Obrázek č. 5: Obsah tuku v průběhu zrání sýrů

Obsah tuku v sušině v sýřeninách (Obrázek č. 6) obou vzorků se pohyboval v rozmezí hodnot od 37,29-40,79 %. Na Obrázku č. 7 je zobrazen vývoj obsahu tuku v sušině v průběhu zrání.



Obrázek č. 6: Obsah tuku v sušině v sýřenině

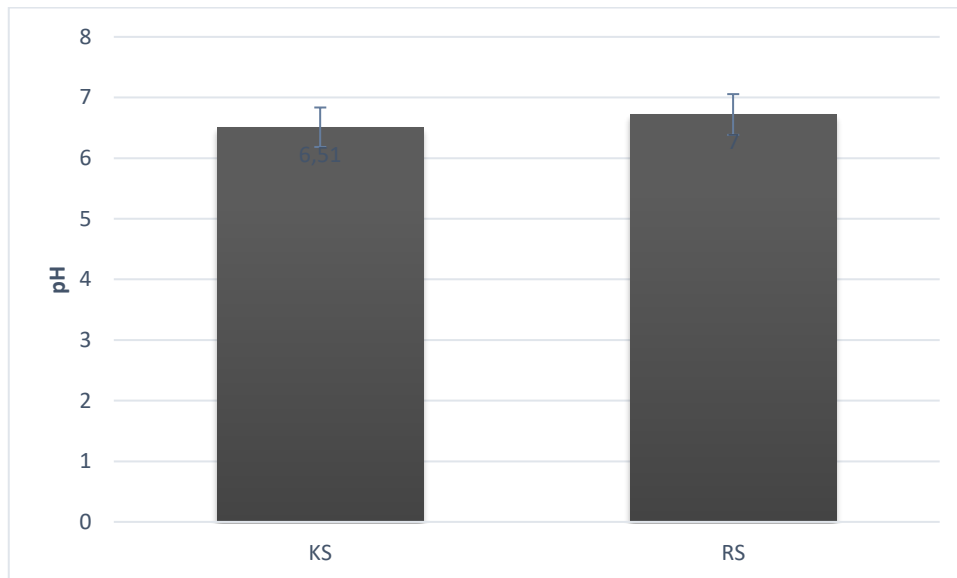
U vzorku K činila průměrná hodnota tuku v sušině $39,07 \pm 0,62$ %, a u vzorku R $37,91 \pm 0,33$ %. Z těchto hodnot je patrné, že oba modelové vzorky sýrů řadíme do skupiny polotučných sýrů, u nichž se obsah tuku v sušině pohybuje v rozmezí 25-45 % (Kadlec, 2012). Z grafu lze vyčíst, že u vzorku K byl po 28. den nárůst obsahu tuku v sušině o 3,48 %, poté následoval mírný pokles hodnot. U vzorku R s degradujícím kmenem lze pozorovat, že taktéž jako u vzorku K došlo po 28 dnech k nárůstu obsahu tuku v sušině, ale jen o 1,75 %, a poté také následoval mírný pokles hodnot. Lze ovšem říci, že nebyl zaznamenán rapidní nárůst či pokles obsahu tuku v sušině v průběhu zrání. Současně se od sebe modelové šarže sýrů v obsahu tuku v sušině významně nelišily, což značí o správně provedené standardizaci.



Obrázek č. 7: Obsah tuku v sušině v průběhu zrání

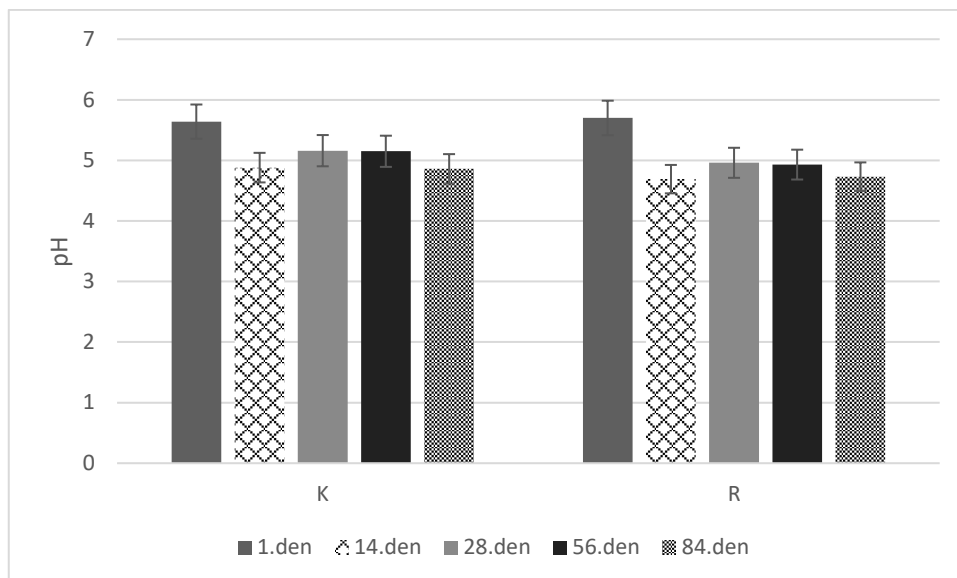
6.1.3 Stanovení pH

Jako další stanovení bylo provedeno stanovení pH v sýřenině sýru a stanovení pH v průběhu zrání sýrů. Výsledky byly zaznamenány do grafu (Obrázek č. 8 a Obrázek č. 9).



Obrázek č. 8: Obsah pH v sýřenině

Z Obrázku č. 8 lze vyčíst, že hodnoty pH byly nejvyšší na počátku zrání sýrů. Tato vysoká hodnota pH vzniká v důsledku toho, že na počátku zrání sýrů je vysoký obsah laktózy, kterou ještě přítomné mikroorganismy nestihly zfermentovat. V prvních hodinách dochází k rozkladu laktózy pomocí BMK na kyselinu mléčnou, což způsobí pokles pH. U sýřenin se hodnoty pH pohybovaly v rozmezí 6,51-6,72, což jsou hodnoty pH vyšší než u sýrů. Rozdílné pH hodnoty sýřenin a sýrů byly stanoveny z důvodu toho, že při lisování dochází k poklesu hodnoty pH aktivitou přítomných mikroorganismů, tudíž v prokysaných sýrech musí být počáteční hodnota pH nižší (McSweeney et al., 2017).



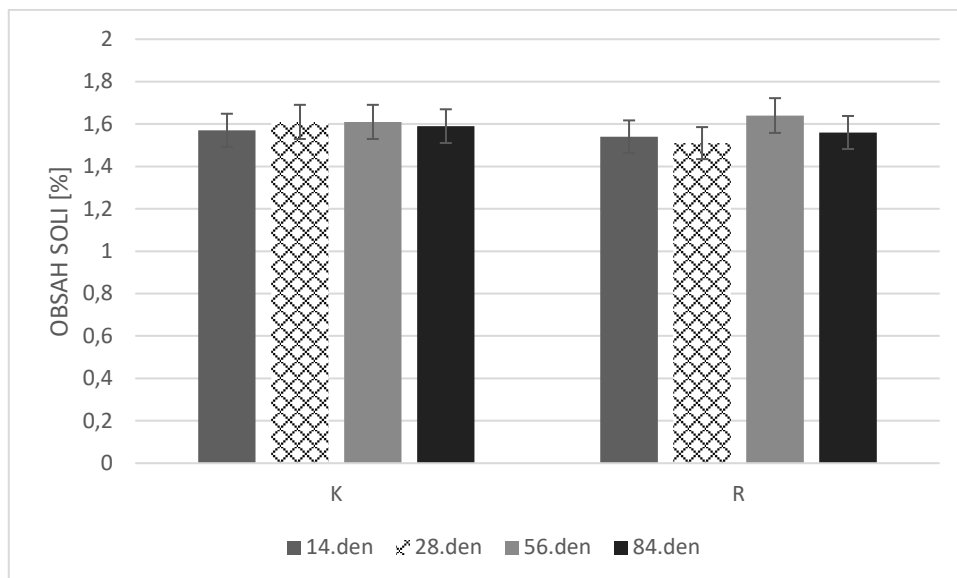
Obrázek č. 9: Obsah pH v průběhu zrání sýrů

V průběhu zrání sýrů (mezi 1. a 14. dnem zrání) došlo k opětovnému snížení pH, což je patrné i z Obrázku č. 9. Hodnoty pH u vzorku K začínaly v průběhu zrání na hodnotě 5,64, a v průběhu zrání klesly na hodnotu 4,86. U vzorku R s degradujícím kmenem bylo zaznamenáno také snížení hodnot, a to z hodnoty 5,7 na hodnotu 4,73. Z grafu lze ovšem vyčíst i to, že během 28. a 56. dne dochází k mírnému nárůstu pH. Tento nárůst je způsoben produkty vznikajícími v průběhu proteolýzy (Fox, 2004).

6.1.4 Stanovení soli

V průběhu zrání bylo analyzováno i stanovení soli v sýrech. Na Obrázku č. 10 jsou uvedeny průměrné hodnoty v průběhu zrání. Hodnoty byly stanoveny až od 14. dne, jelikož počáteční odběr sýrů byl proveden před solením sýrů, tedy obsah soli by byl u těchto sýrů téměř nulový.

Obsah soli u modelových šarží sýrů se nikterak významně v průběhu zrání neměnil. U vzorku K činil průměrný obsah soli $1,6 \pm 0,07$ %, a u vzorku R s degradujícím kmenem byl stanoven na průměrnou hodnotu $1,56 \pm 0,06$ %, z čehož lze usoudit, že obsah soli byl u obou šarží srovnatelný a nemohl ovlivnit mikrobiologické a biochemické změny v průběhu zrání.



Obrázek č. 10: Obsah soli v průběhu zrání sýrů

6.2 Mikrobiologický rozbor

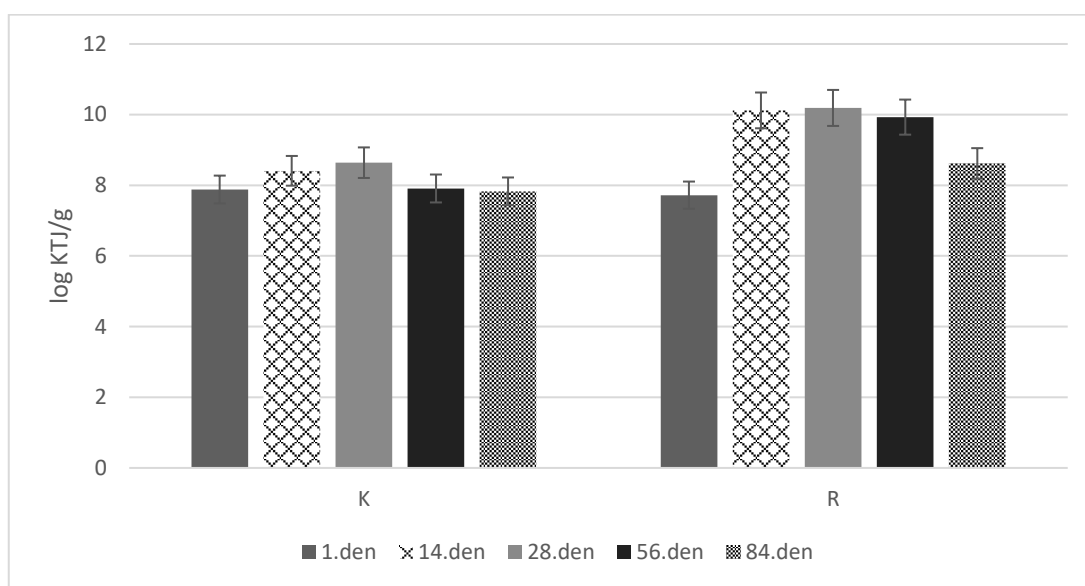
Modelové vzorky sýrů byly dále podrobeny mikrobiologickému rozboru. Bylo provedeno kvantitativní stanovení celkového počtu mikroorganismů (CPM), bakterií rodu *Lactobacillus* (respektive mléčné tyčinky) a *Lactococcus* (mléčné koky), koliformních bakterií, enterokoků, kvasinek a plísní. Výsledky byly shrnuty v následujících grafech. Pro kontrolu byl mikrobiologické analýze podroben i zákys použitý při výrobě sýrů.

Tabulka č. 6: Počet mikroorganismů v zákyse pro výrobu modelových vzorků sýrů

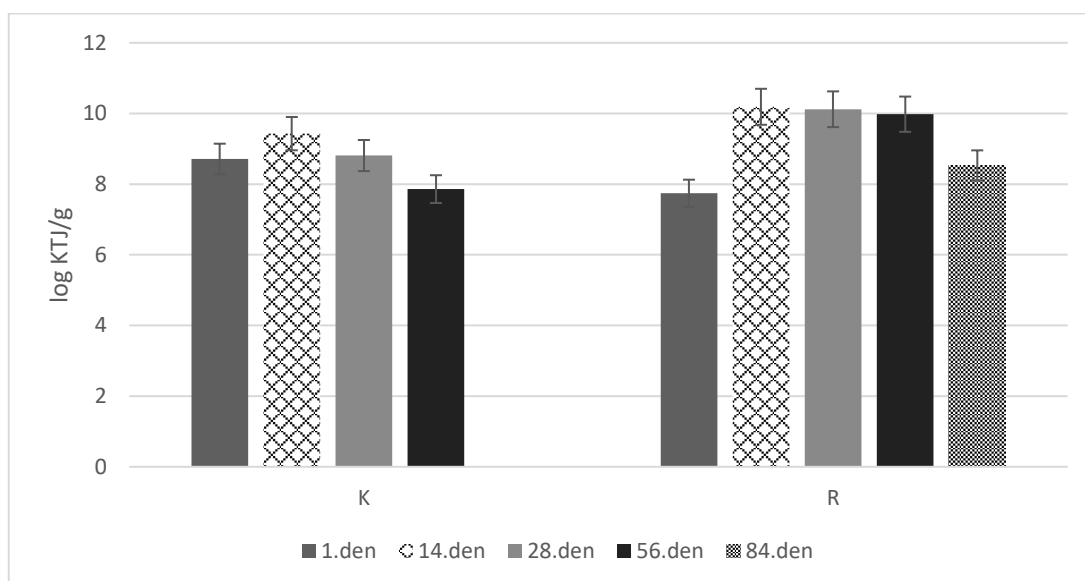
označení vzorku	ZÁKYS [log KTJ/g]					
	CPM	mléčné koky	mléčné tyčinky	enterokoky	koliformní bakterie	plísňe a kvasinky
smetanový zákys K	9,15	10,57	0	0	0	0
smetanový zákys R	9,04	8,97	0	0	0	0
zákys s degradérem	11,19	0	10,8	0	0	0

Z Tabulky č. 6 můžeme vyčíst, že počty bakterií byly vyšší v zákyse s degradérem. Počty enterokoků a koliformních bakterií byly nulové, což značí o tom, že nedošlo ke kontaminaci během přípravy těchto zákysů.

Celkový počet mikroorganismů v modelových vzorcích sýrů je znázorněn na Obrázku č. 11. Na obrázku lze pozorovat u obou vzorků sýrů pozvolný nárůst mikroorganismů do 28. dne, poté následoval úbytek mikroorganismů. Vzorek K, ke kterému byly přidány pouze biogenní aminy, dosahoval v průběhu zrání pouze malých změn ve vývoji mikroorganismů. U vzorku R, který obsahoval také degradér *Lacticaseibacillus casei* CCDM 198, můžeme od 14. dne pozorovat vyšší nárůst mikroorganismů, 28. den dosahoval nejvyššího nárůstu, a to 10,49 log KTJ/g. Následně hodnoty CPM u vzorku R po 28. dnu klesaly, stejně jako u modelového vzorku K.



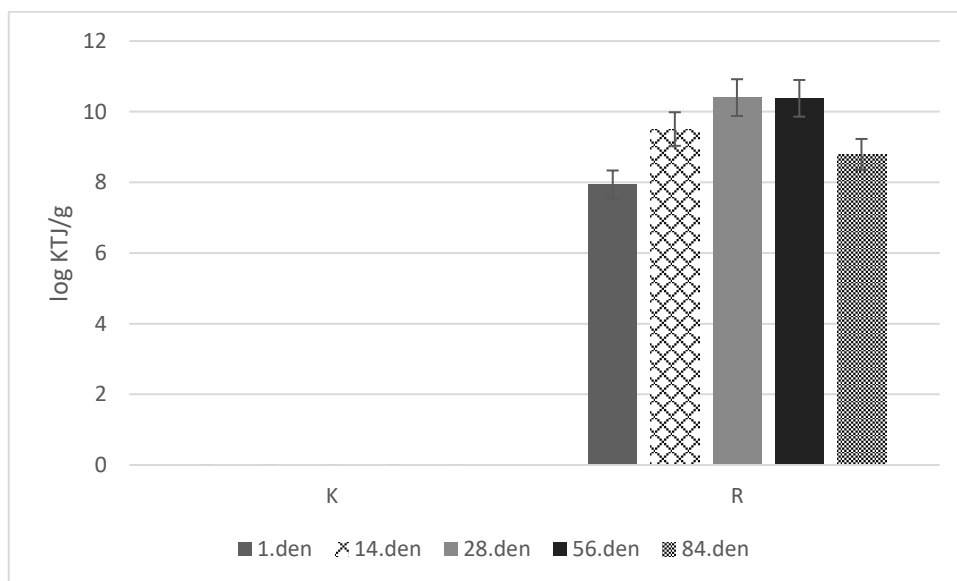
Obrázek č. 11: Celkový počet mikroorganismů v průběhu zrání sýrů



Obrázek č. 12: Mléčné koky v průběhu zrání sýrů

Na obrázku č. 12 můžeme pozorovat vývoj mléčných koků v průběhu zrání sýrů. U obou modelových vzorků sýrů můžeme sledovat nejvyšší nárůst mléčných koků po 14 dnech zrání. U vzorku K došlo po 14 dnech zrání k poklesu obsahu bakterií, kdy 56. den byl tento obsah nejnižší, a to 8,16 log KTJ/g. Po 84 dnech již mléčné koky v sýru nebyly detekovány. U vzorku R byl nárůst mléčných koků mírně vyšší. Jejich obsah vzrůstal, stejně jako u vzorku K, do 14. dne, poté následoval mírný pokles.

Obrázek č. 13 znázorňuje vývoj obsahu mléčných tyčinek. U vzorku K, u kterého byl přídavek pouze biogenních aminů, nebyl nárůst mléčných tyčinek zaznamenán. U vzorku R, ke kterému byl přidán degradér *Lactocaseibacillus casei* CCDM 198, byl zaznamenán nárůst až do 28. dne zrání. Po 28 dnech následoval pokles počtu mléčných tyčinek. První den zrání u vzorku R byl počet mléčných tyčinek nejnižší, a to 7,94 log KTJ/g, nejvyšší počet kolonií v průběhu zrání činil 10,40 log KTJ/g, a v posledním měsíci zrání počet kolonií klesl na 8,79 log KTJ/g.



Obrázek č. 13: Mléčné tyčinky v průběhu zrání sýrů

Mléčné koky a mléčné tyčinky jsou považovány za startovací bakterie, jejichž hlavním úkolem je produkce kyselin během výroby. Nicméně přispívají také ke zrání sýrů, protože jejich enzymy se podílí na proteolýze, lipolýze a přeměně aminokyselin, které mohou být využity pro vznik biogenních aminů (Fox, 2004).

Dále byl pomocí mikrobiologické analýzy proveden rozbor enterokoků a koliformních bakterií. U vzorku K, ani u vzorku R nebyla přítomnost těchto bakterií zaznamenána, z čehož můžeme usoudit, že při výrobě sýrů byla dodržena všechna hygienická opatření a nedošlo

ani k sekundární kontaminaci sýrů. Enterokoky a koliformní bakterie mají negativní dopad na kvalitu sýra, mohou způsobovat i pozdní duření sýrů (McSweeney et al., 2017).

6.3 Stanovení obsahu biogenních aminů

V průběhu zrání modelových vzorků sýrů bylo provedeno stanovení biogenních aminů. Ještě před samotnou analýzou modelových vzorků sýrů byla provedena analýza technologických ztrát biogenních aminů do syrovátky v průběhu výroby sýrů, která je shrnuta níže v Tabulce č. 7.

Tabulka č. 7: Technologické ztráty BA v průběhu výroby sýrů

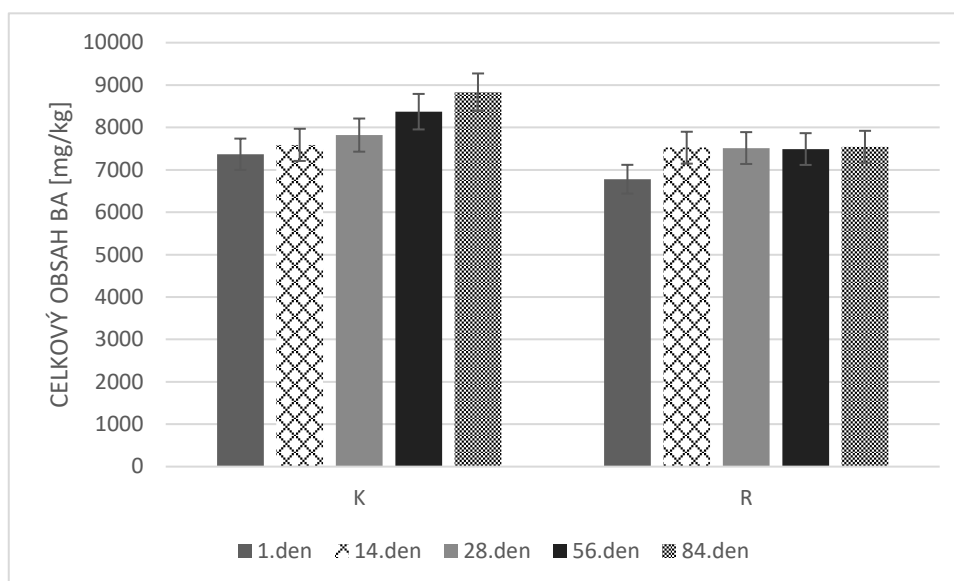
ztráty biogenních aminů [mg/kg]				
označení vzorku	množství fenylethylaminu	množství putrescinu	množství kadaverinu	množství tyraminu
K	1730,1	1973,3	874,4	2477,3
R	1922,1	2138,0	1004,5	2586,1

Pro stanovení technologických ztrát biogenních aminů byl odebrán vzorek před dohříváním, před lisováním a při lisování syrařského zrna, abychom určili, kolik biogenních aminů přešlo do syrovátky. U vzorku K, který obsahoval pouze přídavek biogenních aminů, byla tato ztráta vypočtena na 48,06 % fenylethylaminu, 54,81 % putrescinu, 24,29 % kadaverinu a 62,82 % tyraminu. U vzorku R, který kromě přídávku biogenních aminů obsahoval i degradér *Lacticaseibacillus casei* CCDM 198, byly tyto technologické ztráty stanoveny na 53,39 % fenylethylaminu, 59,39 % putrescinu, 27,90 % kadaverinu a 71,84 % tyraminu.

Tabulka č. 8: Zůstatek BA v sýrové matrici na dobu zrání

zůstatek biogenních aminů [mg/kg]				
označení vzorku	množství fenylethylaminu	množství putrescinu	množství kadaverinu	množství tyraminu
K	1869,9	1626,7	2725,6	1122,7
R	1677,9	1462,0	2595,5	1013,9

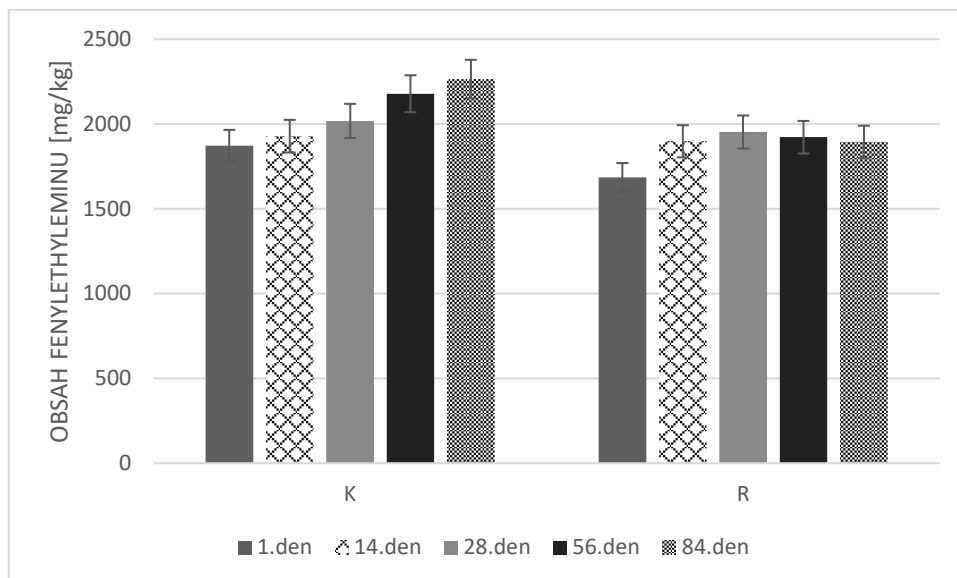
Dále byly analyzovány biogenní aminy v průběhu zrání v modelových vzorcích sýrů. Na Obrázku č. 14 je uveden jejich celkový obsah v průběhu zrání.



Obrázek č. 14: Stanovení celkového obsahu biogenních aminů v průběhu zrání sýrů

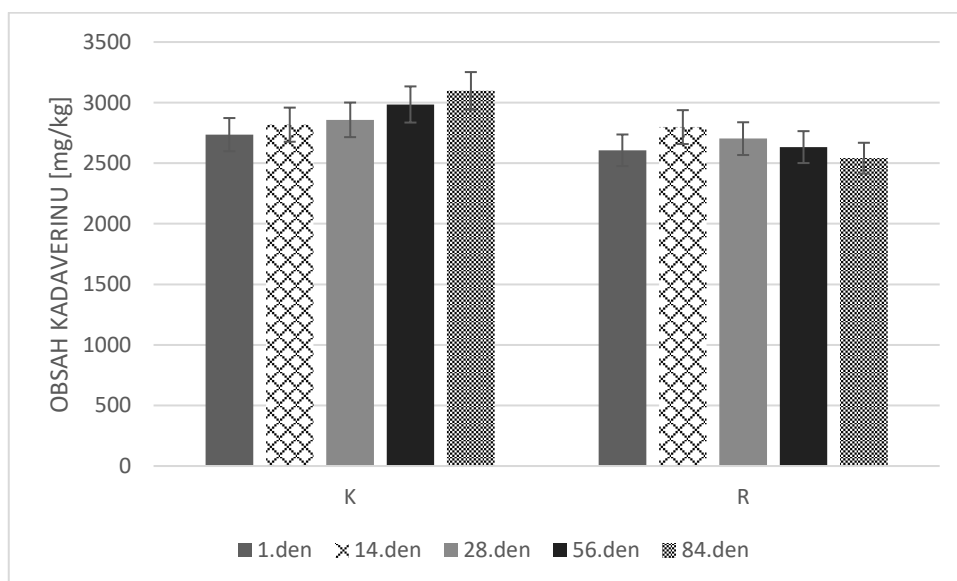
Z grafu (Obrázek č. 14) můžeme pozorovat, že u modelových vzorků (K, R) byl obsah biogenních aminů nejnižší vždy v první den zrání sýrů. U vzorku K následoval postupný nárůst koncentrace biogenních aminů v průběhu zrání sýru, zatímco u vzorku R s degradérem byl vývoj obsahu biogenních aminů po 14. dnu téměř stejný. V první den zrání byl celkový obsah biogenních aminů u vzorku R nižší o 8,0 %, po 14 dnech byl nižší pouze o 0,9 %, po 28 dnech o 3,91 %, po 56 dnech byl nižší již o 10,53 % a po 84 dnech zrání byl u vzorku R zaznamenán pokles biogenních aminů o 14,59 %.

Mezi biogenní aminy, které se nejčastěji vyskytují v sýrech, patří tyramin, kadaverin, fenylethylamin, putrescin a histamin (Fox, 2004). Zmíněné biogenní aminy byly analyzovány i ve vzorcích modelových sýrů K a R. Koncentrace těchto biogenních aminů byla zaznamenána do následujících grafů. Obsah histaminu se v obou modelových vzorcích nacházel pouze v malé koncentraci, proto jeho výsledky nejsou uvedeny. Předpokládá se, že do koncentrace 400 mg/kg histaminu je tato hladina biogenního aminu bezpečná, a lze možné účinky histaminu deaktivovat aminooxidázami ve střevě (Linares, 2011). Z legislativního hlediska je horní hranice histaminu u čerstvých nebo konzervovaných ryb stanovena na hodnotu 100 mg/kg a 200 mg/kg pro fermentované ryby (Evropská komise, 2005). Na následujícím Obrázku č. 15 můžeme pozorovat obsah fenylethylaminu v průběhu zrání sýrů.



Obrázek č. 15: Obsah fenylethylaminu v průběhu zrání sýrů

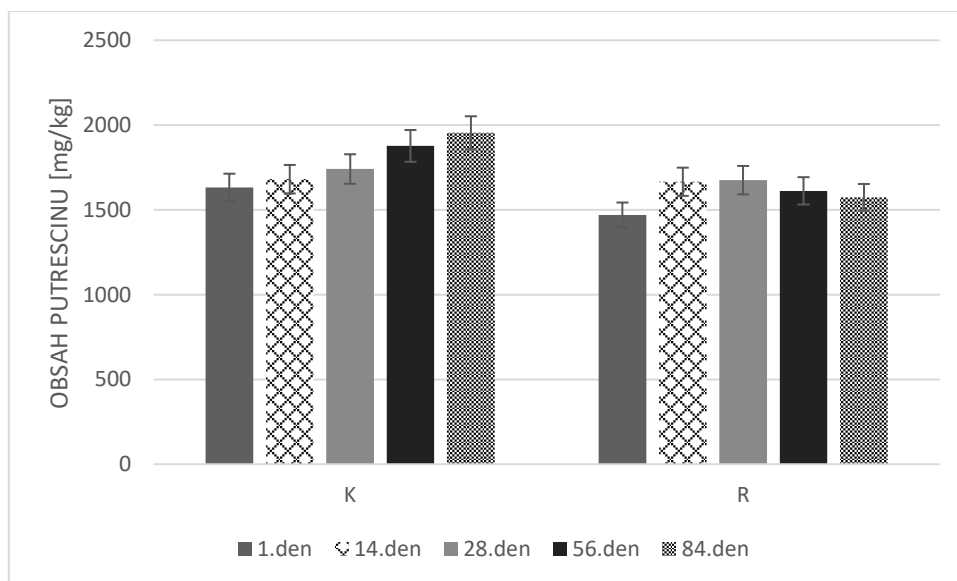
Na obrázku můžeme pozorovat, že koncentrace fenylethylaminu se u vzorku K v průběhu zrání stále zvyšovala, kdy 84. den dosáhla hodnota $2265,37 \pm 1,36$ mg/kg maxima. U vzorku R byla v prvních dnech hodnota $1685,70 \pm 4,46$ mg/kg fenylethylaminu nejnižší, po 28 dnech vzrostla na hodnotu $1952,85 \pm 8,24$ mg/kg, a poté v průběhu zrání mírně klesla. Ve srovnání se vzorkem K je ale patrné, že degradér *Lactocaseibacillus casei* CCDM 198 měl vliv na snížení koncentrace fenylethylaminu v sýru. V první den zrání došlo ke snížení o 9,96 %, 14. den zrání o 1,56 %, 28. den zrání o 3,23 %, 56. den zrání o 11,76 % a v 84. den zrání o 16,34 %. Dalším biogenním aminem s vyššími koncentracemi je kadaverin, jehož vývoj je zaznamenán na Obrázku č. 16.



Obrázek č. 16: Obsah kadaverinu v průběhu zrání sýrů

U vzorku K obsah kadaverinu, stejně jako u fenylethylaminu, postupně vzrůstal. Z grafu můžeme pozorovat, že jeho obsah byl nejnižší v první den zrání na hodnotě $2735,84 \pm 2,72$ mg/kg a nejvyšší v 84. den zrání, a to $3097,11 \pm 2,72$ mg/kg. Modelový vzorek R měl první den nižší nárůst obsahu kadaverinu než vzorek K, hodnota vzorku R v první den zrání byla $2606,54 \pm 7,35$ mg/kg. Po 14 dnech obsah kadaverinu mírně vzrostl na hodnotu $2797,92 \pm 4,90$ mg/kg, obsah kadaverinu vzorku R ale ani po mírném nárůstu nedosáhl hodnoty vzorku K po 14 dnech zrání, která činila $2817,92 \pm 6,41$ mg/kg. Po 28 dnech docházelo k poklesu obsahu kadaverinu u vzorku R až na hodnotu $2541,45 \pm 8,47$ mg/kg, což byl obsah kadaverinu v 84. den zrání sýrů. Po dobu zrání došlo u vzorku R s degradérem k poklesu o 4,73 % v první den, 0,71 % po 14 dnech, 5,43 % po 28 dnech, 11,79 % po 56 dnech a 17,94 % obsahu kadaverinu po 84 dnech, proto lze tedy usoudit, že i v tomto případě měl degradér *Lactocaseibacillus casei* CCDM 198 významný vliv na snížení obsahu kadaverinu.

V nižších koncentracích (ve srovnání s kadaverinem) byl zaznamenán obsah putrescinu, jehož výsledné hodnoty jsou uvedeny na Obrázku č. 17.

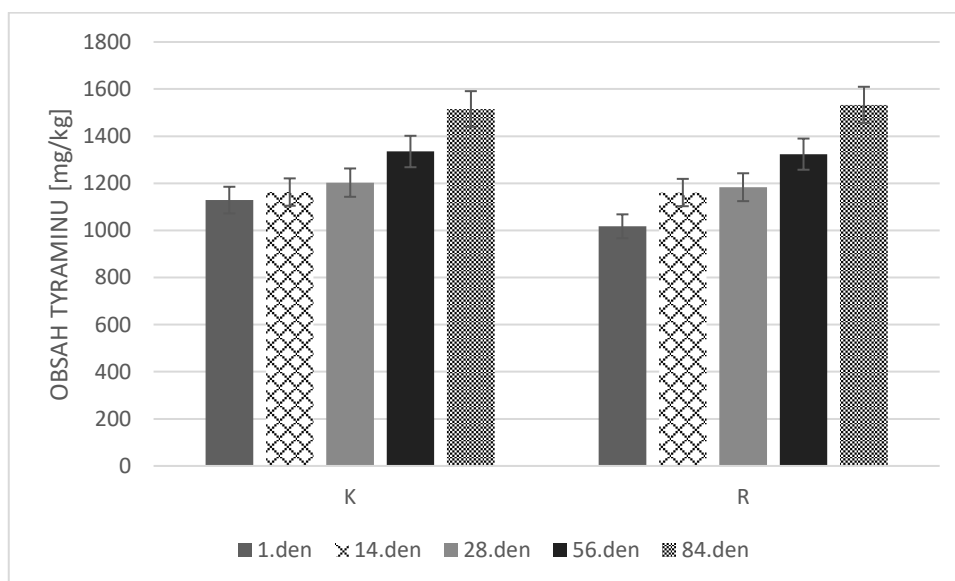


Obrázek č. 17: Obsah putrescinu v průběhu zrání sýrů

Z grafu na Obrázku č. 17 lze vyčíst, že nejvyšší obsah putrescinu ($1954,24 \pm 1,55$ mg/kg) byl zaznamenán u vzorku K v 84. den zrání. Od začátku zrání do 84. dne můžeme u vzorku K sledovat pozvolný nárůst obsahu putrescinu. Naopak u vzorku R, který obsahoval degradující kmen, můžeme pozorovat nižší obsah putrescinu již v první den zrání, a to o 162 mg/kg méně. Po 14 dnech vzrostl obsah putrescinu u vzorku R na hodnotu $1665,74 \pm 9,36$ mg/kg, což je hodnota nižší, než u vzorku K v 14. den zrání. Po 14 dnech zrání již obsah putrescinu u vzorku s degradérem nevzrůstal, naopak docházelo k jeho snižování, a to až na

hodnotu 84. dne zrání $1574,05 \pm 6,24$ mg/kg. Obsah putrescinu byl u vzorku R nižší v první den zrání o 9,93 %, v 14. den zrání o 0,89 %, v 28. den zrání o 3,77 %, v 56. den zrání o 14,12 % a v 84. den zrání o 19,45 %, než u vzorku K, z čehož můžeme usoudit, že kultura *Lacticaseibacillus casei* CCDM 198 má vliv na snížení obsahu putrescinu v sýrech.

Dalším biogenním aminem vyskytujícím se v sýrech je tyramin. Tyramin spolu s histaminem jsou považovány za nejtoxičtější biogenní aminy (Alvarez et al., 2014). Účinky tyraminu jsou spojovány s hypertenzí, poruchami dýchání a bolestmi hlavy (Lawley et al., 2012). Vývoj obsahu tyraminu je znázorněn na Obrázku č. 18.



Obrázek č. 18: Obsah tyraminu v průběhu zrání sýrů

Na obrázku č. 18 lze vidět, že u obou modelových vzorků obsah tyraminu postupně narůstal. Množství obsahu tyraminu bylo u vzorku K i R nejnižší v první den zrání. U vzorku R byl obsah tyraminu v první den zrání nižší o 112 mg/kg ve srovnání s kontrolní šarží vzorků. Po 14 dnech zrání obsah tyraminu dosahoval zhruba stejných hodnot u vzorku K i R, což postupovalo až do 84. dne zrání, kdy hodnota vzorku K činila $1515,45 \pm 2,91$ mg/kg, u vzorku R byla hodnota velmi podobná, a to $1533,17 \pm 2,67$ mg/kg. Z tohoto porovnání můžeme usoudit, že degradující kmen *Lacticaseibacillus casei* CCDM 198 neměl vliv na degradaci tyraminu v sýrech.

Na degradaci biogenních aminů má vliv mnoho faktorů. Mezi nejčastější možnosti, jak snížit jejich obsah v potravinách patří výběr vhodné startovací kultury (bez schopnosti produkce BA, nebo se schopností degradace BA) (Linares, 2011), dále hodnota pH, aktivita vody, koncentrace soli (Friaz, 2017) a další. Pro vznik biogenních aminů jsou důležité množství a dostupnost volných AMK, jež jsou dekarboxylázovou aktivitou přeměňovány na příslušné biogenní aminy (Linares, 2011). Snižování vzniklých biogenních aminů je potřebné z hlediska zdravotního dopadu na člověka, u kterého mohou způsobovat zdravotní potíže vedoucí až k těžké intoxikaci (Stratton, 1990).

Dle Foxe (2004) bylo u sýrů holandského typu zjištěno, že schopnost mikroorganismů produkovat biogenní aminy ovlivňuje obsah soli, pH a teplota zrání sýrů. Obsah soli se u modelových vzorků v průběhu zrání nikterak významně neměnil. Průměrný obsah soli se u vzorku K a R pohyboval v rozmezí 1,56-1,60 %. Fox (2004) ve svých výsledcích uvádí, že v sýrech s obsahem soli 2,6 % bylo nalezeno menší množství biogenních aminů, než v sýrech s obsahem soli 4,8 %. Dále uvádí, že při snižujícím se pH dochází i ke snížení biogenních aminů, což se potvrzuje i u našich modelových vzorků K a R. U vzorku K byla hodnota pH po 84 dnech zrání 4,86, a u vzorku R 4,73, u kterého byl také stanoven nižší celkový obsah biogenních aminů.

Podle Bonzar et al. (2017) je tvorba biogenních aminů v potravinách inhibována také mikroorganismy se schopností snižovat hladinu biogenních aminů a živin. Mezi tyto mikroorganismy patří i různé kmeny rodu *Lactobacillus*. Toto tvrzení bylo výsledkem i našeho experimentu, kdy bylo zjištěno, že kmen *Lacticaseibacillus casei* CCDM 198 měl vliv na snížení celkového obsahu biogenních aminů (po 1. dnu o 8,00 %, po 14 dnech o 0,90 %, po 28 dnech o 3,91 %, po 56 dnech o 10,53 % a po 84 dnech o 14,59 %), zejména pak na obsah fenylethylaminu, putrescinu a kadaverinu.

ZÁVĚR

Diplomová práce měla posoudit vývoj obsahu biogenních aminů po dobu 84 dnů mezi kontrolní šarží a šarží inokulovanou kmenem *Lacticaseibacillus casei* CCDM 198, který je schopen degradovat biogenní aminy. V teoretické části byla nejdříve stručně popsána mikrobiologie mléka pro výrobu sýrů, dále byly popsány jednotlivé fáze zrání sýrů, a nakonec byly charakterizovány potenciální rizika spojená s konzumací sýrů, kam byly zahrnuty hlavně biogenní aminy.

V praktické části byly vyrobeny modelové vzorky sýrů s přidavkem biogenních aminů (kadaverinu, tyraminu, fenylethylaminu, histaminu a putrescinu). Druhý modelový vzorek byl navíc doplněn kulturou se schopností degradace biogenních aminů. U obou modelových vzorků byla ve stejný den (1., 14., 28., 56. a 84.) provedena základní chemická analýza, mikrobiologický rozbor a stanovení biogenních aminů.

Z těchto analýz byly zjištěny následující výsledky:

- U obou šarží sýrů byl zaznamenán mírný nárůst sušiny v průběhu zrání, který pravděpodobně vznikl z důvodů mírného odpaření vody ze sýrů
- Obsah tuku v sušině se u obou modelových šarží pohyboval v rozmezí 37,91-39,07 %, díky čemuž vzorky sýrů řadíme do skupiny polotučných sýrů
- Během zrání došlo u vzorků k poklesu pH, a to vlivem rozkladu laktózy na kyselinu mléčnou pomocí BMK
- Obsah soli se u obou modelových šarží nikterak významně v průběhu zrání neměnil
- Mléčné tyčinky byly detekovány pouze u vzorku R
- Enterobakterie, enterokoky ani kvasinky a plísně nebyly u modelových šarží pozorovány, což značí o správné hygienické výrobní praxi
- Degradér biogenních aminů *Lacticaseibacillus casei* CCDM 198 měl vliv na snížení produkce biogenních aminů obsahu kadaverinu, fenylethylaminu a putrescinu
- Degradér biogenních aminů *Lacticaseibacillus casei* CCDM 198 neměl vliv na snižování obsahu tyraminu v průběhu zrání sýrů

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] FERNANDES, Rhea. *Microbiology Handbook – Dairy Products*. 3rd Ed. Royal Society of Chemistry, 2009. ISBN 978-1-62198-172-5.
- [2] GRIFFITHS, Mansel, ed. *Improving the safety and quality of milk*. Boca Raton: CRC Press, c2010. Woodhead Publishing series in food science, technology and nutrition. ISBN 978-1-84569-438-8.
- [3] SMIT, Gerrit. *Dairy Processing – Improving quality*. Cambridge: Woodhead Publishing, 2003. ISBN 978-1-85573-676-4.
- [4] SMETANA, Pavel. *Faremní zpracování mléka v ekologickém zemědělství: kvalita mléka, hygienické požadavky na jeho zpracování, přímý prodej mléka: zásady ekologického chovu skotu, ovcí a koz*. Olomouc: Bioinstitut, 2009. Metodika pro praxi (Bioinstitut). ISBN 978-80-904174-5-8.
- [5] ADAMS, Martin, Maurice MOSS a Peter MCCLURE. *Food Microbiology*. Royal Society of Chemistry, 2016. ISBN 978-1-5231-1940-0.
- [6] HORÁČKOVÁ, Šárka, Kristina BIALASOVÁ a Milada PLOCKOVÁ. *Metabolismus a význam bakterií mléčného kvašení ve fermentovaných mléčných výrobcích. Mlékařské listy* [online]. Ústav mléka, tuků a kosmetiky, VŠCHT Praha, 2018, s. 22-24 [cit. 2021-03-16]. Dostupné z: http://www.mlekarskelisty.cz/upload/soubory/pdf/2018/170-171/veda_170-s.22-24.pdf
- [7] WEIMER, Bart C. *Improving the Flavour of Cheese*. Woodhead Publishing, 2007. ISBN 978-0-8493-9158-3.
- [8] FOX, P., P. MCSWEENEY, T. COGAN a T. GUINEE. *Cheese: chemistry, physics, and microbiology*. 3rd ed. London: Elsevier, 2004. ISBN 978-012-263651-6.
- [9] 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 L139*. 2004.
- [10] KADLEC, Pavel, Karel MELZUCH a Michal VOLDRICH. *Přehled tradičních potravinářských výrob: Technologie potravin*. Ostrava: Key Publishing, 2012. ISBN 978-80-7418-1450.

- [11] DEETH, C. Hilton a Michael J. Lewis. *High Temperature Processing of Milk and Milk Products*. John Wiley and sons, 2017. ISBN 9781118460467.
- [12] WEIMER, Bart C. *Improving the Flavour of Cheese*. Cambridge: Woodhead Publishing, 2007. ISBN 978-0-8493-9158-3.
- [13] CHANDAN, Ramesh C., Arun KILARA a Nagendra P. SHAH. *Dairy Processing and Quality Assurance*. 2nd Ed. John Wiley and Sons, 2016. ISBN 978-1-118-81031-6.
- [14] MCSWEENEY, Paul L.H. Souhrn přednášky o zrání přírodních sýrů. *Mlékařské listy* [online]. Potravinářské revue, 2014, [cit. 2021-03-30]. Dostupné z: http://www.mlekarskelisty.cz/upload/soubory/pdf/2013/141_vi-ix.pdf
- [15] MCSWEENEY, Paul L.H., Patrick F. FOX, Paul D. COTTER a David W. EVERETT. *Cheese – Chemistry, Physics and Microbiology*. 4th Ed. London: Elsevier, 2017. ISBN 978-0-12-417012-4.
- [16] ESKIN, N.A. Michael a Fereidoon SHAHIDI. *Biochemistry of Foods*. 3rd Ed. London: Elsevier, 2013. ISBN 978-0-12-242352-9.
- [17] ŠUSTOVÁ Květoslava. Nutriční aspekty konzumace sýrů. *Mlékařské listy* [online]. Katedra gastronomie a hotelnictví, Brno, 2018, [cit. 2021-04-05]. Dostupné z: http://www.mlekarskelisty.cz/upload/soubory/pdf/2018/170-171/veda_170_s.24-30.pdf
- [18] KOTZEKIDOU, Parthena. *Food Hygiene and Toxicology in Ready-to-Eat Foods*. London: Elsevier, 2016. ISBN 978-0-12-801916-0.
- [19] MOTARJEMI, Yasmine, Gerald MOY a Ewene TODDE. *Encyclopedia of Food Safety*. London: Elsevier, 2014. ISBN 978-0-12-378612-8.
- [20] LINARES, Daniel M., MaCruz MARTÍN, Victor LADERO a Miquel A. ALVAREZ. Biogenic Amines in Dairy Products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2011. DOI: 10.1080/10408398.2011.582813.
- [21] FRIAZ, Juana, Cristina MARTINEZ-VILLALUENGA a Elena PENAS. *Fermented Foods in Health and Disease Prevention*. London: Elsevier, 2017. ISBN 978-0-12-802309-9.
- [22] SPANO G., P. RUSSO, A. LONVAUD-FUNEL, P. LUCAS, H. ALEXANDRE a C. GRANDVALET et al. *Biogenic amines in fermented foods*. *European Journal of Clinical Nutrition*, 2010. DOI: 10.1038

- [23] HOLZAPFEL, Wilhem. *Advances in Fermented Foods and Beverages – Improving Quality, Technologies and Health Benefits*. London: Elsevier, 2015. ISBN 978-1-78242-015-6.
- [24] LAWLEY, Richard, Laurie CURTIS a Judy DAVIS. *Food Safety Hazard Guidebook*. 2nd Ed. Royal Society of Chemistry, 2012. ISBN 978-1-84973-381-6.
- [25] Vyhláška č. 289/2007 Sb. o veterinárních požadavcích na živočišné produkty, které nejsou upraveny přímo použitelnými předpisy Evropských společenství. In: *Sbírka předpisů České republiky*, 2007.
- [26] NAŘÍZENÍ KOMISE (ES) č. 2073/2005 ze dne 15. listopadu 2005 o mikrobiologických kritériích pro potraviny. In: *Úřední věstník Evropské komise L338*, 2005.
- [27] Vyhláška č. 305/2004 Sb., kterou se stanoví druhy kontaminujících a toxikologicky významných látek a jejich přípustné množství v potravinách. In: *Sbírka předpisů České republiky*, 2004.
- [28] HRBEK, Ivan. Syrové mléko aneb kdo a proč nařizuje pasterizaci? *Agris online*, 2013.
- [29] Ministerstvo Zemědělství. *Listerióza*. Informační centrum bezpečnosti potravin [online], [cit. 2021-04-28]. Dostupné z: <https://www.bezpecnostpotravin.cz/>
- [30] FARKYE, Y. Nana. Cheese technology. *International Journal of Dairy Technology*, 2004. DOI: 10.1111/j.1471-0307.2004.00146.x
- [31] Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1829/2003 ze dne 22. září 2003 o geneticky modifikovaných potravinách a krmivech. In: *Úřední věstník L268*, 2003.
- [32] ALVAREZ, Miguel A. a Ma Victoria MORENO-ARRIBAS. The problem of biogenic amines in fermented foods and the use of potential biogenic amine-degrading microorganism as a solution. Spain, 2014. DOI: 10.1016/j.tifs.2014.07.007.
- [33] STRATTON, J., R. HUTKINS a S. TAYLOR. Biogenic amines in cheese and other fermented foods. *Journal of Food Protection*, 1990. ISSN 19449097.
- [34] BONZAR, G., M. FILIPCZAK-FIUTAK, A. PLUTA-KUBICA a I. DUDA. Biogenic amines present in cheese – occurrence and threats. *Medycyna Weterynaryjna* [online], [cit. 2021-04-20]. ISSN 0025-8626. Dostupné z: <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20173098306>

- [35] BUŇKOVÁ, L., P. BUDINSKÝ, G. ADAMCOVÁ, P. PLEVA, a F. BUŇKA. Monitoring výskytu biogenních aminů ve fermentovaných mléčných výrobcích v ČR. *Mlékařské listy*, 2012.
- [36] VELÍŠEK, J. a J. HAJŠLOVÁ. *Chemie potravin II*. Tábor: OSSIS, 2009. ISBN 978-80-86659-16-9.
- [37] DONNELLY, Catherine W. *Cheese and Microbes*. Washington, District of Columbia: ASM Press, 2014. ISBN 978-1-55581-586-8.
- [38] LAW, Barry A. a A. Y. TAMIME, ed. *Technology of Cheesemaking*. Wiley, 2010.
- [39] ÖZER, Barbaros a Gülsün Akdemir EVRENDILEK. *Dairy microbiology and biochemistry: recent developments*. Boca Raton: CRC Press, 2015. ISBN 9780429076497
- [40] RYSER, Elliot T. a Elmer H. MARTH. *Listeria, Listeriosis, and Food Safety*. Boca Raton: CRC Press, 2007. ISBN 9780429115370.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

CPM	Celkový počet mikroorganismů
PSB	Počet somatických buněk
RIL	Rezidua inhibičních látek
ČMK	Čisté mlékařské kultury
BMK	Bakterie mléčného kvašení
ATP	Adenosintrifosfát
AMK	Aminokyselina
PGE	Progastrická esteráza
LPL	Lipoprotein lipáza
BA	Biogenní aminy
CPM	Celkový počet mikroorganismů
KTJ	Kolonie tvořících jednotek
EA	Endův agar
SB	Slanetz-Bartley
PCA	Plate Count agar
KS	Sýřenina kontrolních modelových vzorků K
RS	Sýřenina modelových vzorků R s degradujícím kmenem
K	Kontrolní šarže modelových vzorků
R	Šarže modelových vzorků s degradujícím kmenem

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 Schéma přenosu patogenních mikroorganismů (<i>Escherichia coli</i>).....	14
Obrázek 2 Obsah sušiny v sýřenině.....	43
Obrázek 3 Obsah sušiny v průběhu zrání.....	44
Obrázek 4 Obsah tuku v sýřenině.....	45
Obrázek 5 Obsah tuku v průběhu zrání sýrů.....	45
Obrázek 6 Obsah tuku v sušině v sýřenině.....	46
Obrázek 7 Obsah tuku v sušině v průběhu zrání sýrů.....	46
Obrázek 8 Obsah pH v sýřenině.....	47
Obrázek 9 Obsah pH v průběhu zrání sýrů.....	48
Obrázek 10 Obsah soli v průběhu zrání sýrů.....	49
Obrázek 11 Celkový počet mikroorganismů v průběhu zrání sýrů.....	50
Obrázek 12 Mléčné koky v průběhu zrání sýrů.....	50
Obrázek 13 Mléčné tyčinky v průběhu zrání sýrů.....	51
Obrázek 14 Stanovení celkového obsahu biogenních aminů v průběhu zrání sýrů.....	53
Obrázek 15 Obsah fenylethylaminu v průběhu zrání sýrů.....	54
Obrázek 16 Obsah kadaverinu v průběhu zrání sýrů.....	54
Obrázek 17 Obsah putrescinu v průběhu zrání sýrů.....	55
Obrázek 18 Obsah tyraminu v průběhu zrání sýrů.....	56

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 Stručná charakteristika nežádoucích mikroorganismů v mléce.....	14
Tabulka 2 Stručná charakteristika patogenních mikroorganismů v mléce.....	15
Tabulka 3 Přehled typů pasterace.....	17
Tabulka 4 Základní rozdělení BMK.....	18
Tabulka 5 Stručná charakteristika mikrobiálních kultur.....	20
Tabulka 6 Počet mikroorganismů v zákyse pro výrobu modelových vzorků sýrů.....	49
Tabulka 7 Technologické ztráty BA v průběhu výroby sýrů.....	52
Tabulka 8 Zůstatek BA v sýrové matrici na dobu zrání.....	52

