

Možnosti ovlivnění dekarboxylázové aktivity v systému přírodního sýra

Possibilities of influencing the decarboxylase activity in the nature cheese system

Autor: **Mgr. Richard Adámek, Ph.D.**

Studijní program: Chemie a technologie potravin (P2901)

Studijní obor: Technologie potravin (2901V013)

Školitel: doc. Ing. Vendula Pachlová, Ph.D.

Konzultant: prof. RNDr. Leona Buňková, Ph.D.

Oponenti: doc. Ing. Libor Červenka, Ph.D.
doc. Ing. Mária Greifová, Ph.D.
prof. Ing. Miroslava Kačániová, Ph.D.

Zlín, září 2022

© Richard Adámek

Vydala **Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně** v edici **Doctoral Thesis Summary**.
Publikace byla vydána v roce 2022.

Klíčová slova: přírodní sýr, zrání, bezpečnost potravin, biogenní aminy, mikrobiologie

Keywords: natural cheese, ripening, food safety, biogenic amines, microbiology

Plná verze disertační práce je dostupná v Knihovně UTB ve Zlíně.

ISBN 978-80-7678-099-6

PODĚKOVÁNÍ

Mé velké díky patří zejména vedoucí této práce, paní doc. Ing. Vendule Pachlové, Ph.D., za odborné vedení, cenné rady, ochotu a veškerý vynaložený čas, který mi věnovala během doktorského studia. Stejně poděkování patří i paní prof. RNDr. Leoně Buňkové, Ph.D. za konzultace a rady převážně z oblasti mikrobiologie. Dále bych chtěl poděkovat paní Ing. et Ing. Ludmile Zálešákové za pomoc v chemických laboratořích a paní Ing. Veronice Kučabové a Ing. Olze Vlčkové za pomoc v mikrobiologických laboratořích. V neposlední řadě bych chtěl poděkovat všem mým kolegům z Ústavu technologie potravin, a hlavně mé rodině za podporu po celou dobu studia.

Tato práce vznikla za podpory interních grantů Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně (IGA/FT/2018/003; IGA/FT/2019/006; IGA/FT/2020/006; IGA/FT/2021/004; IGA/FT/2022/005; NAZV projekt č. QK1710156).

ABSTRAKT

Cílem předložené práce je studium možností redukce obsahu biogenních aminů v reálném systému přírodního sýra. Vysoká koncentrace biogenních aminů v potravinách představuje pro spotřebitele zdravotní riziko, kterého je třeba se vyvarovat. Pro naplnění cíle byly použity jako technologický trend vybrané mikrobiální kmeny mléčných tyčinek schopné redukce koncentrace biogenních aminů, jejichž aktivita byla potvrzena v předešlých studiích *in vitro*. Kromě použitých mikroorganismů byl dále sledován vliv použitého obalového materiálu (smrštitelná fólie, kopolymerní nátěr a potravinářský vosk) na akumulaci biogenních aminů v průběhu zrání. Vzorčky modelových přírodních sýrů byly v průběhu celé zrající periody průběžně odebírány a podrobeny chemické (stanovení obsahu sušiny, obsahu tuku, obsahu soli, hodnoty pH, posouzení vývoje proteolýzy prostřednictvím stanovení volných aminokyselin a kvantifikace biogenních aminů), fyzikální (měření vývoje texturních vlastností) a mikrobiologické analýze (stanovení celkového počtu mikroorganismů, plísni, kvasinek, bakterií mléčného kvašení, *Enterobacteriaceae* a *Enterococcus*). Použité doplňkové mikrobiální kmeny neměly vliv na základní chemické parametry a na tvrdost přírodních sýrů, zatímco použití různého obalového materiálu ovlivnilo obsah sušiny a texturní profil. Aktivitou vybraných doplňkových kmenů došlo k zásadní redukci akumulace biogenních aminů během zrání přírodních sýrů. Mikrobiálním kmenem s nejintenzivnější degradační aktivitou byl *Lacticaseibacillus casei* CCDM 198, u kterého byla prokázána nejúčinnější degradační aktivita vůči fenylethylaminu, kadaverinu a putrescinu.

ABSTRACT

The aim of the presented work is to study the possibilities influencing decarboxylase activity in the real system of natural cheese. High concentrations of biogenic amines in food pose a health risk to consumers that should be avoided. To fulfil the goal, selected microbiological strains with decarboxylation activity were used as a technological trend, which was confirmed in previous *in vitro* studies. In addition to the microorganisms used, the effect of the packaging material used (shrink film, Plasticoat copolymer coating and food wax) on the accumulation of biogenic amines during ripening was also monitored. Samples of model natural cheeses were continuously taken during the entire ripening period and subjected to chemical (determination of dry matter content, fat content, salt content, pH values, assessment of development of proteolysis and quantification of biogenic amines), physical (measurement of textural development) and microbiological analysis (determination of total number microorganisms, fungi, yeasts, lactic acid bacteria, *Enterobacteriaceae* and *Enterococcus*). The adjunct microbial strains used did not affect the basic chemical parameters and the hardness of the natural cheeses, while the use of different packaging materials had a significant effect on the dry matter content and the textural profile. The selected adjunct strains significantly influenced the course of biogenic amine accumulation during ripening of natural cheeses. The microbial strain with the most intense degradation activity was *Lactocaseibacillus casei* CCDM 198 which showed the most effective degradation activity against phenylethylamine, cadaverine and putrescine.

OBSAH

| | |
|---|-----------|
| 1. SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY | 8 |
| 1.1 BIOGENNÍ AMINY..... | 9 |
| 1.1.1 OBECNÁ CHARAKTERISTIKA BIOGENNÍCH AMINŮ | 9 |
| 1.1.2 MOŽNOSTI REDUKCE OBSAHU BIOGENNÍCH AMINŮ V POTRAVINÁCH | 10 |
| 2. CÍL PRÁCE | 13 |
| 3. ZVOLENÉ METODY ZPRACOVÁNÍ..... | 14 |
| 3.1 LABORATORNÍ VÝROBA VZORKŮ PŘÍRODNÍCH SÝRŮ | 15 |
| 3.2 CHEMICKÁ ANALÝZA | 17 |
| 3.2.1 ZÁKLADNÍ CHEMICKÁ ANALÝZA | 17 |
| 3.2.2 POKROČILÁ CHEMICKÁ ANALÝZA..... | 19 |
| 3.3 TEXTURNÍ PROFILOVÁ ANALÝZA | 21 |
| 3.4 MIKROBIOLOGICKÁ ANALÝZA | 21 |
| 3.5 CHEMOMETRIE (STATISTICKÉ VYHODNOCENÍ DAT) | 21 |
| 4. HLAVNÍ VÝSLEDKY A DISKUZE | 22 |
| 4.1 VÝSLEDKY A DISKUZE K EXPERIMENTU I..... | 22 |
| 4.1.1 MIKROBIOLOGICKÁ ANALÝZA | 22 |
| 4.1.2 STANOVENÍ VOLNÝCH AMINOKYSELIN | 23 |
| 4.1.3 STANOVENÍ BIOGENNÍCH AMINŮ..... | 23 |
| 4.2 VÝSLEDKY A DISKUZE K EXPERIMENTU II | 25 |
| 4.2.1 MIKROBIOLOGICKÁ ANALÝZA | 25 |
| 4.2.2 STANOVENÍ VOLNÝCH AMINOKYSELIN | 26 |
| 4.2.3 STANOVENÍ BIOGENNÍCH AMINŮ..... | 26 |
| 4.3 VÝSLEDKY A DISKUZE K EXPERIMENTU III..... | 28 |
| 4.3.1 MIKROBIOLOGICKÁ ANALÝZA | 28 |
| 4.3.2 STANOVENÍ VOLNÝCH AMINOKYSELIN | 29 |
| 4.3.3 STANOVENÍ BIOGENNÍCH AMINŮ..... | 30 |
| 4.4 VÝSLEDKY A DISKUZE K EXPERIMENTU IV | 31 |
| 4.4.1 MIKROBIOLOGICKÁ ANALÝZA | 32 |
| 4.4.2 STANOVENÍ VOLNÝCH AMINOKYSELIN | 32 |
| 4.4.3 STANOVENÍ OBSAHU BIOGENNÍCH AMINŮ | 33 |
| 5. PŘÍNOS PRÁCE PRO VĚDU A PRAXI | 38 |

| | | |
|------------|--|-----------|
| 6. | ZÁVĚR..... | 41 |
| 7. | SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY | 43 |
| 8. | SEZNAM ZKRATEK..... | 51 |
| 9. | PUBLIKAČNÍ AKTIVITA AUTORA..... | 52 |
| 10. | CURRICULUM VITAE | 54 |

1. SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

Chuť a vůně jsou charakteristické vlastnosti sýrů. Tyto vlastnosti jsou výsledkem biochemických reakcí, při kterých vzniká většina sensoricky aktivních látek (Calzada et al., 2013; Fox et al., 2004; Roginski et al., 2002). Řada změn je pozorována už během výroby sýrů s tím, že nejvýznamnější částí celé výroby je proces zrání, při kterém dochází k nejrozsáhlejším chemickým i fyzikálním změnám. Během zrání sýrů dochází zejména k rozkladu kaseinu, což vede k akumulaci volných aminokyselin, které mohou být aktivitou přítomné mikroflóry přeměňovány na řadu sensoricky aktivních látek, ale rovněž mohou být dekarboxylací přeměněny na biogenní aminy (Church et al., 2002).

Biogenní aminy patří mezi nízkomolekulární látky, které disponují biologickou aktivitou. Někteří zástupci biogenních aminů (serotonin, histamin a tyramin) hrají důležitou roli ve fyziologii člověka i zvířat. U rostlin představují klíčovou roli biogenní aminy jako putrescin, spermidin a spermin. Obecně lze říci, že biogenní aminy mohou vznikat v potravinách ve vyšších koncentracích aktivitou jak zákysových (*Streptococcus*, *Lactobacillus* a odvozené rody, *Lactococcus*, *Leuconostoc*), tak zejména kontaminujících mikroorganismů (především *Escherichia*, *Enterobacter*, *Salmonella*, *Shigella* a *Enterococcus*) a mohou pro konzumenta představovat zdravotní riziko (Laleye et al., 1987; Halász et al., 1994; Edwards et al., 1981; Stratton et al., 1991). Nejčastějším mechanismem vzniku biogenních aminů je dekarboxylace aminokyselin. Konkrétně se v sýrech během zrání akumuluje nejčastěji tyramin, který bývá obsažen mimo jiné i v červeném víně, kvasnicích, anebo v rybách (Kaplan et al., 1974). Současná konzumace potravin a nápojů s možným vysokým obsahem biogenních aminů pak může výrazně zvýšit pravděpodobnost zhoršení zdravotního stavu konzumenta. Z tohoto pohledu je žádoucí hledání možných cest, jak snížit obsah biogenních

aminů v potravinách. Předložený text využívá pojmenování mikroorganismů dle nové nomenklatury (Zheng et al., 2020).

1.1 Biogenní aminy

1.1.1 Obecná charakteristika biogenních aminů

Biogenní aminy (BA) jsou nízkomolekulární dusíkaté sloučeniny vznikající při metabolických procesech zvířat, rostlin i mikroorganismů (Vale & Gloria, 1998). Můžeme je zařadit dle chemické struktury do tří hlavních skupin:

- a) alifatické – putrescin, kadaverin, spermin, spermidin
- b) aromatické – tyramin, fenylethylamin
- c) heterocykly – histamin, tryptamin

Někteří autoři navíc zařazují kadaverin, putrescin, spermin a spermidin mezi polyaminy (Křížek & Kalač, 1998).

BA slouží i jako prekurzory pro syntézu hormonů, alkaloidů a nukleových kyselin (Santos, 1996). Hrají důležitou roli v regulaci růstu buněk a genové exprese, a tím tedy ovlivňují syntézu proteinů (Kusano et al., 2008; Galgano et al., 2012). BA mohou pro člověka znamenat zdravotní riziko, neboť při větší koncentraci v lidském těle může dojít k jejich nitrosaci za vzniku *N*-nitrososloučenin (Křížek & Kalač, 1998), které jsou považovány za karcinogenní látky. Při metabolické detoxifikaci BA v organismu hrají hlavní roli enzymy monoaminoxidáza, diaminoxidáza a histaminmethyltransferáza (Santos, 1996). BA vznikají převážně enzymaticky z aminokyselin endogenní dekarboxylační aktivitou mikroorganismů, ale v některých případech mohou vznikat aminací nebo transaminací aldehydů a ketonů (Juneja & Sofos, 2010).

1.1.2 Možnosti redukce obsahu biogenních aminů v potravinách

Pro redukci BA v potravinách byly doposud navrženy různé strategie, např. inhibice bakterií produkujících tyto aminy, použití vhodné pasterace s cílem rozsáhlé inaktivace mikroorganismů včetně dekarboxyláza-aktivních, snížení proteolytické aktivity (snížení obsahu volných aminokyselin) nebo zkrácení doby zrání.

V této kapitole budou zmíněny nejvýznamnější techniky využívané pro redukci obsahu dekarboxyláza-aktivních mikroorganismů při výrobě sýrů. Pro redukci bakterií již v syrovém mléce se nejčastěji používají následující postupy:

- a) baktofugace,
- b) pasterace,
- c) mikrofiltrace,
- d) vysokotlaká homogenizace.

Baktofugací je vysokorychlostním odstředěním eliminována většina bakterií a spor. Hlavním cílem je odstranit nežádoucí mikrobiální kmeny, resp. jejich spory (*Clostridium tyrobutyricum*), které přežívají pasterační záhřev a mohou se podílet na vývoji nežádoucích vad a znehodnocení výsledného produktu (Fox et al., 2004).

Během pasterace mléka dochází k snížení počtu mikroorganismů s cílem zajistit zdravotní nezávadnost produktu eliminací patogenních mikroorganismů (Li et al., 2021). Současně je také záhřevem částečně inaktivován pyridoxal fosfát, který je kofaktorem dekarboxylační aktivity (Ladero et al., 2011.) BA nejsou termicky labilní, a proto ani po vysokoteplotním ošetření nebývá jejich obsah zredukován. Z legislativního hlediska, dle Nařízení Evropského Parlamentu a Rady (ES) č. 853/2004, kterým se stanoví zvláštní hygienická pravidla pro potraviny živočišného

původu, se pastérace mléka dosahuje následujícími ošetřeními: i) vysokou teplotou po krátkou dobu (nejméně 72 °C po dobu 15 sekund); ii) nízkou teplotou po dlouhou dobu (nejméně 63 °C po dobu 30 minut) nebo iii) jakoukoli jinou kombinací času a teploty vedoucí k rovnocennému účinku.

Mikrofiltrace patří mezi úspěšné technologie používané pro snížení počtu bakterií a spor v mléce průmyslovým odvětvím (Head & Bird, 2013). Hlavním problémem této technologie je však ucpání membrány vyvolané adsorpcí a usazováním částic na aktivním filtračním povrchu membrány. Zanesení této membrány bylo vždy předmětem studia a v poslední době jsou už i nová řešení, která jsou založena na rovnoměrném transmembránovém tlaku na filtrační ploše, kde je udržován jednotný tok permeátu (Fernández-García & Rodríguez, 2014).

Z pohledu omezení aktivity nežádoucích mikroorganismů se jako nejúspěšnější úprava mléka při výrobě sýru jeví vysokotlaké (400–600 MPa) ošetření po pastéraci (Arqués et al., 2006; O'Reilly et al., 2000). Toto ošetření zničí nejen skupiny mikroorganismů schopné dekarboxylace (mikroorganismy, které přežily pastérační záhřev), ale současně jsou také inaktivovány enzymy podporující dekarboxylaci aminokyselin za tvorby BA (Calzada et al., 2013).

Dále se v potravinářském průmyslu jako prevence vzniku BA využívají i mikroorganismy schopné metabolizace BA. Kromě kmenů produkujících BA existují také mikrobiální kmeny, které mají schopnost produkovat enzymy se schopností oxidovat BA v potravinách (La Gioia et al., 2011). Při tomto detoxifikačním procesu se nejvíce uplatňují enzymy aminoroxidázy (Ladero et al., 2010), což jsou tedy enzymy zodpovědné za degradaci BA. Při metabolizaci BA se konkrétně uplatňují dva typy aminoroxidáz: (i) monoaminoxidáza a (ii) diaminooxidáza. Tyto enzymy se běžně vyskytují v eukaryotách, plísních (např. *Aspergillus niger*) a bakteriích. Působením

těchto enzymů jsou BA degradovány na netoxické produkty, které jsou dále vylučovány buňkou (Gardini et al., 2002). Tyto enzymy nejprve metabolizují BA deaminací s produkcí NH_3 a H_2O_2 v přítomnosti kyslíku. Vzniklé aldehydy jsou dále oxidovány na odpovídající kyseliny, které mohou být transportovány do centrálního metabolismu buněk (Cooper, 1997). Tato metabolická cesta může být využita i jako zdroj NH_3 v médiích chudých na dusík. Nejvyšší aktivity aminosydázy dosahují v neutrálním až alkalickém prostředí za přítomnosti kyslíku (Dapkevicius et al., 2000).

Mnoho mikroorganismů dokáže tyto enzymy produkovat, a proto je vhodné tyto kmeny aplikovat již při výrobě jako startovací kultury (Chong et al., 2011) se současným zřetelem na požadované vlastnosti produktu, neboť přidání vybraných startovacích kultur je jedním z hlavních nástrojů schopných působit proti akumulaci BA v potravinách. Speciálně u sýrů má použití startovacích kultur zásadní vliv na celý technologický proces (Cogan et al., 2007). Navíc použití vybraných startovacích kultur zaměřených na omezení akumulace BA v mléčných výrobcích bylo přezkoumáno i Linaresem et al. (2012). Doposud byly využity různé vybrané startovací kultury se schopností snižovat koncentraci BA ve finálních produktech, jako je např. klobása (Gardini et al., 2002), víno (García-Ruiz et al., 2011), rybí omáčka (Zaman et al., 2011) nebo sýry (Nieto-Arribas et al., 2009).

Schopnost některých mikroorganismů degradovat BA v různých potravinách využilo několik autorů. Mezi nejčastěji takto využívané mikroorganismy patří – *Brevibacterium*, mléčné tyčinky, *Pediococcus* a *Micrococcus* (Leuschner et al., 1998). Co se sýrů týče, byla tato degradační aktivita zaznamenána u rodů *Lactocaseibacillus casei* a *Lactiplantibacillus plantarum* (Fadda et al., 2001; Herrero et al., 2012).

2. CÍL PRÁCE

Hlavním cílem disertační práce bylo:

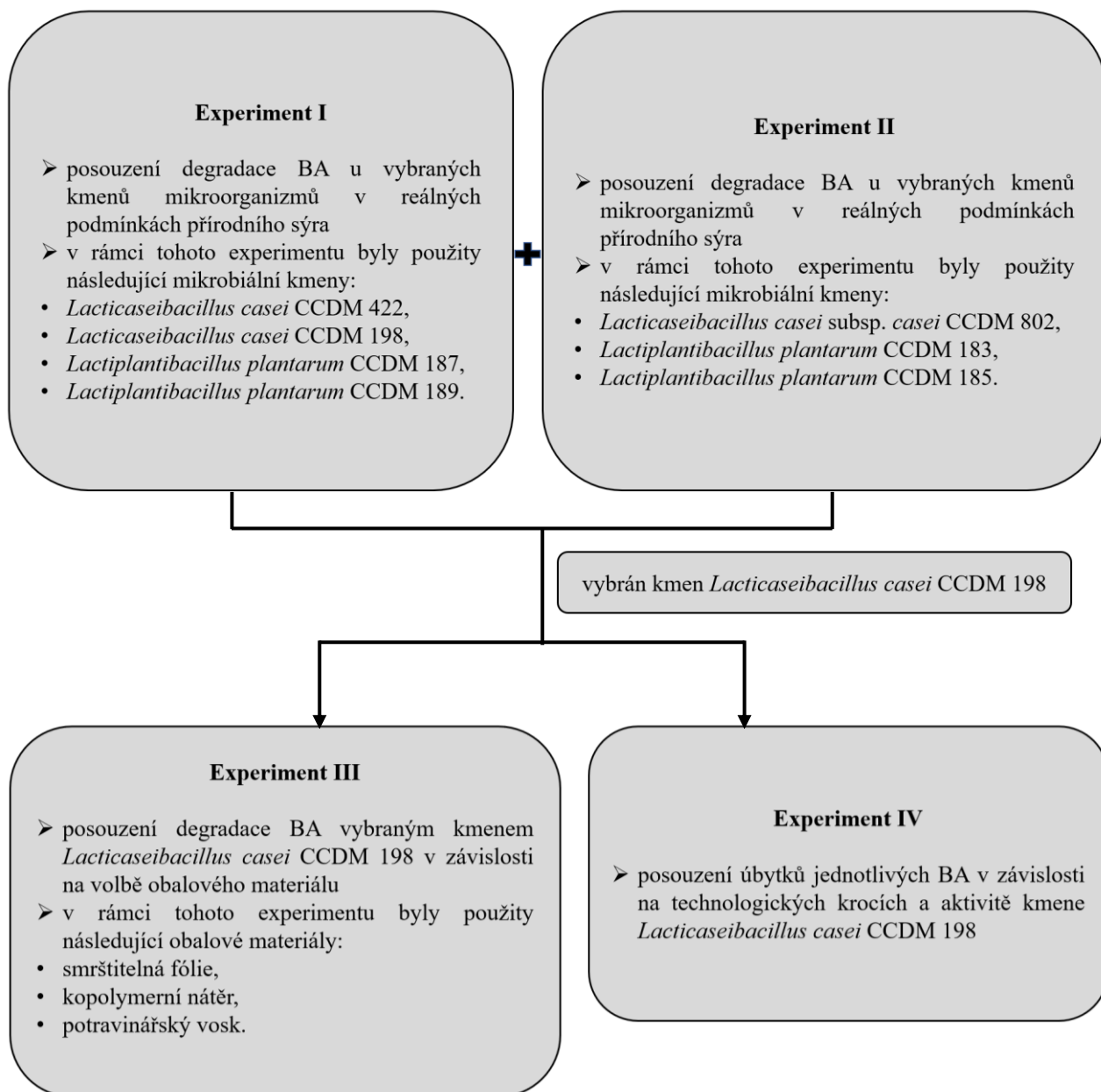
1. Posouzení míry degradace BA u vybraných kmenů mikroorganismů v reálném systému přírodního sýra.
2. Posouzení vlivu zvoleného obalového materiálu na koncentraci BA v přírodním sýru s vybraným kmenem schopným nejúčinnější degradace BA.
3. Posouzení úbytků jednotlivých BA v závislosti na technologických krocích a aktivitě kmene se schopností degradace BA.

Pro naplnění pak byly provedeny dílčí úkoly:

- 1) Výroba modelových vzorků přírodních sýrů s aplikovanými vybranými kmeny mikroorganismů, které jsou schopny degradace biogenních aminů.
- 2) Základní i pokročilá chemická analýza modelových vzorků zaměřená zejména na sledování intenzity proteolýzy modelových vzorků přírodních sýrů prostřednictvím obsahu volných aminokyselin a akumulace biogenních aminů.
- 3) Sledování změn texturních vlastností jednotlivých modelových vzorků přírodních sýrů v průběhu zrání a skladování (platí pro Experiment III).

3. ZVOLENÉ METODY ZPRACOVÁNÍ

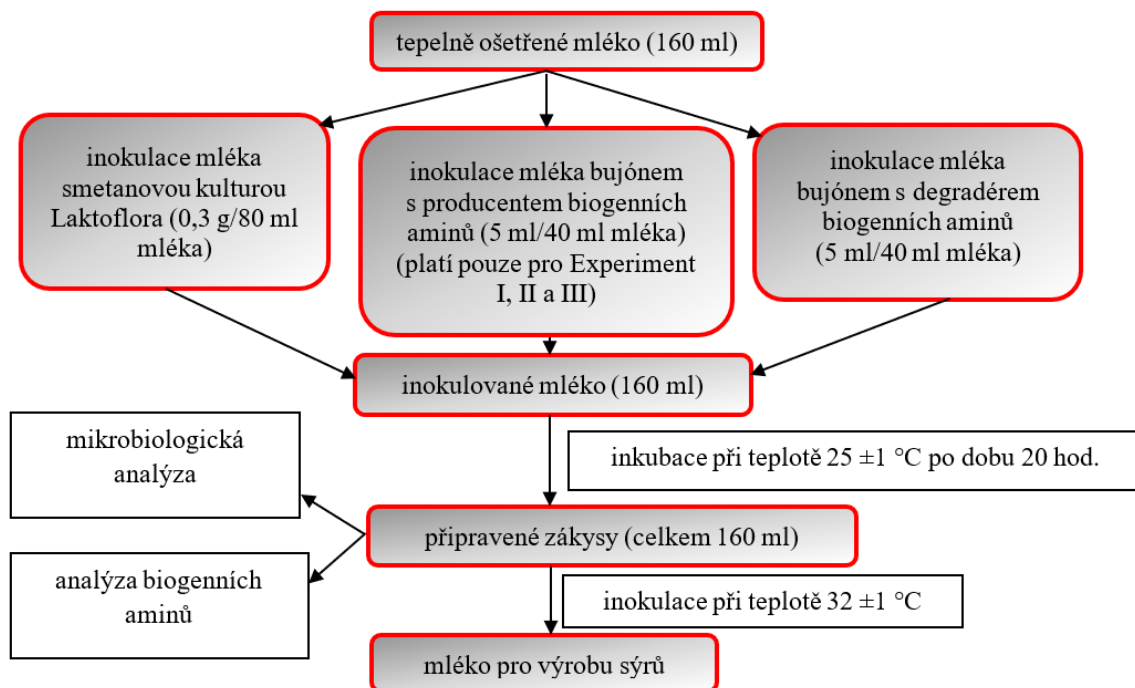
Předložená disertační práce byla rozdělena na 4 experimenty, které byly navrženy pro naplnění dílčích cílů. Rozdělení a cíle těchto experimentů přehledně znázorňuje Obr. 1.



Obr. 1: Schéma vývoje jednotlivých experimentů.

3.1 Laboratorní výroba vzorků přírodních sýrů

Nejprve byly připraveny provozní zákysy (Obr. 2), které se nechaly inkubovat při teplotě 25 ± 1 °C po dobu 20 hodin. Celkem byly připraveny tři zákysy: (i) smetanový zákys; (ii) zákys obsahující producenta BA a (iii) zákys obsahující degradéra BA.



Obr. 2: Schéma přípravy provozního zákysu.

Modelové sýry byly následně vyrobeny na základě již osvědčeného postupu (Flasarová et al., 2016). Syrové mléko bylo ohřáto na teplotu 37 ± 1 °C a následně odstředěno na laboratorní odstředivce (FT15B, Armfield, Velká Británie). Po odstředění mléka byl pomocí butyrometrické metody stanoven obsah tuku v získané smetaně a společně s odstředěným mlékem byla provedena standardizace na požadovaný obsah tuku v mléce, resp. ve finálním produktu. Celkový objem mléka pro vlastní výrobu modelových vzorků sýrů byl 35 l. Následně byla provedena pasterace standardizovaného mléka záhřevem na teplotu 72 ± 1 °C po dobu 30 s. Po dosažení teploty 72 ± 1 °C bylo

mléko okamžitě ochlazené ve výrobníku přírodních sýrů (MSKD-1, Driml, Česká republika) a nechalo se vytemperovat na inokulační a sýřicí teplotu 32 ± 1 °C. Po temperaci byl přidán provozní zákys společně se 17,5 ml CaCl_2 (36% roztok, Milcom a.s., Česká republika), který se přidává za účelem podpoření sýření. Poté byla směs promíchána a byly přidány předem připravené provozní zákysy, které obsahovaly smetanovou kulturu (Laktoflora, Milcom, Praha, Česká republika) a vybrané mikrobiální kmeny (producent/degradér). Aplikovaná kultura se nechala 20 minut reaktivovat v mléce před vlastním sýřením. Sýření bylo provedeno přidavkem 5,4 ml syřidla (Chymax M200, 190 IMCU/ml, Chr. Hansen, Dánsko) zředěného 9 ml pitné vody. Po aplikaci bylo syřidlo v mléce rozptýleno a mléko se ponechalo 30 minut v klidu při 32 ± 1 °C. Vzniklá sýřenina byla opatrně nakrájena pomocí sýrařské ruční harfy příčným i podélným směrem a ponechala se 10 minut v klidu, přičemž došlo k uvolnění syrovátky. Dále následovalo pomalé míchání sýřeniny po dobu 20 minut, při kterém docházelo k drobení a vytužování sýrařských zrn a zároveň k vypuzení dalšího podílu syrovátky. Následně byla vyloučená syrovátka odebrána v množství 10,5 l. Po odebrání syrovátky následovalo dohřívání, při kterém byla přidána pitná voda o objemu 7 l a teplotě 60 ± 1 °C, aby výsledná teplota vzrostla na 37 ± 1 °C. Po dosažení této teploty byla sýrařská zrna míchána po dobu 30 minut za konstantní teploty 37 ± 1 °C (regulace teploty byla dosažena pomocí mezipláště výrobníku sýrů), aby došlo k podpoření odchodu syrovátky (tzv. dosoušení zrna) a ke zvýšení podílu sušiny v sýřenině. Po dosoušení byla sýřenina slita do předlisovací vany, ve které se nechala 20 minut předlisovat pomocí zátěže o hmotnosti 3 kg. Předlisovaná sýřenina byla rozdělena do 12 forem a modelové sýry se lisovaly pomocí lisu (Driml, Česká republika) s postupně se navyšujícím tlakem 5,3 kPa, 15,8 kPa a 26,3 kPa po 30minutových intervalech. Po uplynutí 90 minut bylo závaží sejmuto a sýry byly otočeny. Po přetočení byly sýry opět lisovány tlakem 26,3 kPa po dobu 90 minut. Po vylisování se sýry nechaly

do druhého dne prokysat ve zrací komoře při 8 ± 1 °C. Po prokysání byly sýrové bloky soleny v solných lázních o koncentraci 20 % (w/w) při teplotě 12 ± 1 °C po dobu 3 hodin. Prosolené sýry byly navíc ošetřeny antimykotickou suspenzí Delvacid (DSM Food Specialities, Nizozemsko). Po tomto ošetření byly ponechány 30 minut v klidu kvůli oschnutí a následně byly zabaleny do smrštitelné folie ve vakuové baličce (Henkelman, Nizozemsko) a ponořeny na 2 sekundy do horké vody, aby došlo ke smrštění obalové folie. V případě Experimentu III bylo pro vlastní výrobu použito trojnásobné množství surovin na jednu výrobní šarži tak, aby mohly být vedle smrštitelné folie aplikovány také další obalové materiály – kopolymerní nátěr Plasticoat a červený potravinářský vosk. Kopolymerní obalový nátěr Plasticoat byl na povrch sýrů rovnoměrně nanesen v celkovém počtu 5 vrstev s tím, že každá nová vrstva byla vždy nanesena až po důkladném zaschnutí vrstvy předešlé. Další vzorky modelových sýrů byly obaleny do potravinářského vosku, který byl nejprve roztaven v rozehrátém kotlíku. Následně byly sýry důkladně ponořeny do vosku tak, aby došlo k jejich kompletnímu obalení. Poté se takto obalené sýry ponechaly stát až do ztuhnutí vosku. Tímto způsobem byly vyrobené vzorky přírodních sýrů uskladněny ve zrací komoře při 12 ± 1 °C a postupně odebírány k analýzám 1., 14., 28., 56., 84. a 168. den od samotné výroby (Flasarová et al., 2016). Průměrné základní chemické parametry sýrů byly pH = $5,19 \pm 0,12$; obsah sušiny: 53,98-55,88 %; obsah tuku v sušině: 44,2-45,2 % a obsah soli: 1,37-1,45 %.

3.2 Chemická analýza

3.2.1 Základní chemická analýza

Stanovení pH

Hodnota pH byla stanovena pomocí vpichového pH metru (Eutech Instruments, Nizozemsko). Výsledná hodnota pH byla stanovena jako

průměrná hodnota ze šesti měření prováděných na různých místech modelového vzorku přírodního sýra (Flasarová et al., 2016).

Stanovení obsahu sušiny

Obsah sušiny byl ve vzorcích přírodních sýrů stanoven sušením do konstantního úbytku hmotnosti (dle normy ČSN EN ISO 5534). Sušící misky s mořským pískem byly předem vysušeny pomocí sušárny (Venticell, Brněnská Medicinská Technika a. s., Česká republika) a zváženy. Následně do nich byly naváženy 3 g modelového vzorku sýra, které byly promíchány s mořským pískem. Takto připravené vzorky byly umístěny do sušárny a sušeny při 105 ± 1 °C do konstantního úbytku hmotnosti. Vysušené vzorky byly uzavřeny do exsikátoru do vychladnutí a poté zváženy. V každém modelovém vzorku byl obsah sušiny stanoven celkem třikrát (ISO Standard No. 5534, 2004).

Stanovení obsahu soli

Stanovení obsahu soli ve vzorcích přírodních sýrů bylo provedeno pomocí argentometrické titrace s potenciometrickou detekcí, při které byly zaznamenávány hodnoty potenciálu až do dosažení bodu ekvivalence, který byl indikován potenciálovým skokem indikační elektrody. Vzorek sýra byl rozmixován a ze vzniklé směsi bylo odebráno množství 0,5 g, které bylo rozmělněno v třecí misce s 10 ml destilované vody vytemperované na 60 °C. Takto připravený vzorek byl okyselen 2 ml HNO_3 (zředěné destilovanou vodou v poměru 1:4; $\text{HNO}_3:\text{H}_2\text{O}$) a doplněn na 120 ml destilovanou vodou tak, aby byly obě elektrody (indikační stříbrná elektroda a referentní argentchloridová elektroda) dostatečně ponořeny. Vzorek byl v průběhu titrace míchán magnetickou míchačkou a titrován roztokem AgNO_3 o koncentraci 0,1 mol/l, dokud hodnota napětí nedosáhla alespoň 400 mV (Indra & Mizera, 1992). Spotřeba odměrného roztoku v bodě ekvivalence byla

určena výpočtem z druhých derivací titrační křivky. Stanovení bylo provedeno celkem třikrát.

Stanovení tuku v přírodním sýru

Do tukoměru byly naváženy 3 g vzorku, které byly přelity H_2SO_4 tak, aby se tělo tukoměru zaplnilo z 4/5. Naplněný tukoměr byl umístěn do vodní lázně o teplotě 70-80 °C, přičemž byly tukoměry občas protřepány. Po kompletním rozpuštění celé navážky byla operace ukončena. Dále byl přidán 1 ml amylalkoholu pro zostření fázového rozhraní a tolik H_2SO_4 , až hladina na stupnici dosáhla o 3 dílky níže, než byla předpokládaná tučnost vzorku. Posléze byly tukoměry vytemperovány při teplotě 65-68 °C a uzavřeny pryžovou zátkou. Převrácením tukoměrů byl promíchán obsah. Dále následovalo odstředování při 6000 ot/min po dobu 6 minut. Na závěr byly tukoměry opět vytemperovány a obsah tuku byl odečten ze stupnice. Stanovení bylo provedeno ve třech opakováních (Indra & Mizera, 1992).

3.2.2 Pokročilá chemická analýza

Stanovení obsahu volných aminokyselin

Vzorek sýra byl po stanovené době zrání lyofilizován (lyofilizátor; ALPHA 1-4 LSC, CHRIST, LABICOM s.r.o., Česká republika). Před analýzou byla provedena extrakce ze sušené hmoty sýra (Buňková et al., 2009). Extrakce byla provedena třístupňově pomocí HClO_4 o koncentraci 0,6 mol/l (MERCK, Darmstadt, Německo). Do zkumavky byl navážen přesně 1 g lyofilizovaného vzorku a k němu přidáno 10 ml HClO_4 o koncentraci 0,6 mol/l (MERCK, Darmstadt, Německo). Následně byly vzorky dokonale protřepány ručně a pak ponechány 45 minut na třepačce (LT2). Po usazení sýrové hmoty byl supernatant slit do 25ml odměrné baňky. Získaný supernatant v odměrné baňce byl doplněn po rysku HClO_4 o koncentraci 0,6 mol/l (MERCK, Darmstadt, Německo) a přefiltrován. Před analýzou byl

extrakt ještě navíc zfiltrován přes stříkačkový filtr o porozitě 0,45 μm . Takto připravený vzorek byl analyzován na automatickém analyzátoru aminokyselin AAA 400 (Ingos, Praha).

Stanovení obsahu biogenních aminů

Stejně jako pro analýzu volných aminokyselin byly vzorky po stanovené době zrání rozmixovány, lyofilizovány a byla provedena třístupňová extrakce (Dadáková et al., 2009) pomocí HClO_4 o koncentraci 0,6 mol/l (MERCK, Darmstadt, Německo). Poté byl odebrán 1 ml, který byl převeden do derivatizační nádoby, do které bylo přidáno 100 μl vnitřního standardu (1,7-heptandiamin v koncentraci 500 mg/l; SIGMA – ALDRICH, Darmstadt, Německo), 1,5 ml karbonátového pufru o pH 11,0–11,1 a 2 ml čerstvě připraveného roztoku dansylchloridu o koncentraci 5 g/l v acetonu (SIGMA-ALDRICH, Darmstadt, Německo). Následně byla derivatizační nádoba uzavřena a třepána 20 hodin na třepačce v temnu. Druhý den bylo přidáno 200 μl roztoku prolinu (MERCK, Darmstadt, Německo) a opětovně třepáno na třepačce po dobu 1 hodiny. Posléze byly přidány 3 ml heptanu (CHROMASOLV®, for HPLC, $\geq 99\%$ - SIGMA – ALDRICH, Darmstadt, Německo) a 3 minuty byly vzorky třepány ručně. Po oddělení vrstev byl z heptanové vrstvy odebrán 1 ml, který byl přemístěn do vialky. Heptan byl odpařen při 60 ± 1 °C v termobloku (EVATERM, Labicon s.r.o., Česká republika) pod proudem dusíku (tlaková lahev, Linde Gas a.s., Otrokovice). Suchý odparek byl ve vialce zředěn 1,5 ml acetonitrilu (CHROMASOLV® Plus, for HPLC, $\geq 99.9\%$, SIGMA – ALDRICH, Darmstadt, Německo). Do okamžiku analýzy byl takto připravený vzorek uchován v mrazícím zařízení při -18 °C. Před vlastní analýzou byl vzorek zfiltrován přes stříkačkový filtr s porozitou 0,22 μm . Vzorky byly analyzovány metodou HPLC (Smělá et al., 2004).

3.3 Texturní profilová analýza

Hodnocení textury bylo provedeno pouze u Experimentu III a to instrumentálně pomocí textuometru TA.XT Plus (Stable Micro Systems, Velká Británie). Na vzorky přírodních sýrů byl aplikován kompresní test. Kompresní test byl založen na dvojitým stlačení vzorku o 25 % jeho výšky pomocí cylindrické desky o průměru 100 mm. Stanovení bylo provedeno celkem třikrát.

3.4 Mikrobiologická analýza

Modelové vzorky přírodních sýrů byly podrobeny mikrobiologickému rozboru, který byl zaměřen na stanovení celkového počtu mezofilních aerobních a fakultativně anaerobních mikroorganismů, enterobakterií (včetně koliformních bakterií), mléčných tyčinek, mezofilních laktokoků, enterokoků a kvasinek a plísní.

3.5 Chemometrie (statistické vyhodnocení dat)

Výsledky experimentů byly vyhodnoceny analýzou rozptylu. Pro vyhodnocení výsledků byly využity neparametrické metody, a to Kruskal-Wallisův test a Wilcoxonův test.

4. HLAVNÍ VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1 Výsledky a diskuze k experimentu I

V rámci prvního experimentu bylo cílem sledovat vliv použitých doplňkových kultur na redukcí biogenních aminů v reálném systému přírodního sýra. Mimo jiné byl sledován i vliv na základní chemické parametry (hodnoty pH, obsah sušiny, tuku a soli), intenzitu proteolýzy prostřednictvím stanovení obsahu volných aminokyselin a rozvoj přítomné mikroflóry. V Experimentu I byly využity kmeny se schopností degradace BA: *Lacticaseibacillus casei* CCDM 422 (Lb.c422), *Lacticaseibacillus casei* CCDM 198 (Lb.c198), *Lactiplantibacillus plantarum* CCDM 187 (Lb.p187), *Lactiplantibacillus plantarum* CCDM 189 (Lb.p189). Kontrolní vzorky bez doplňkového kmene a rovněž vzorky s doplňkovými kmeny byly inokulovány BA produkujícím kmenem *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 946 pro simulaci dekarboxylační aktivity.

4.1.1 Mikrobiologická analýza

Kontrolní vzorky, které nebyly naočkovány žádným kmenem degradujícím BA, vykazovaly postupný nárůst celkového počtu mikroorganismů (CPM) až do 28. dne a následně tyto hodnoty postupně klesaly. Kontrolní vzorky navíc obsahovaly nejnižší počet CPM ze všech vzorků modelových sýrů na konci doby zrání.

Co se týče mléčných koků, tak byly zaznamenány určité rozdíly. Předpokládá se, že jde především o startérové bakterie ze základní mezofilní kultury. Hodnoty obsahu koků u kontrolních vzorků během zrání postupně klesaly, zatímco u vzorků s doplňujícím kmenem se počet koků v některých odběrových dnech dokonce zvýšil. Na konci doby zrání byl však zaznamenán pokles v případě všech vzorků.

Počet mléčných tyčinek vykazoval nárůst ve všech vzorcích po celou dobu zrání. Vyšší počet mléčných tyčinek byl pozorován na začátku zrání u všech šarží s doplňkovým kmenem degradujícím BA ve srovnání s kontrolním vzorkem ($P < 0,05$), čímž byla nepřímo potvrzena přítomnost zvolených doplňkových kmenů v jednotlivých modelových vzorcích sýrů.

4.1.2 Stanovení volných aminokyselin

Celková koncentrace volných aminokyselin měla po celou dobu experimentu rostoucí charakter, což znamená, že u všech vzorků modelových sýrů byla zaznamenána rostoucí proteolýza, která byla vždy vyšší u vzorků s doplňkovými kulturami ve srovnání s kontrolním vzorkem. Bezprostředně po výrobě sýrů (1. den) byla koncentrace volných aminokyselin u všech zkoumaných modelových vzorků srovnatelná. První velký rozdíl byl zaznamenán 84. den zrání, kdy celkový obsah volných aminokyselin u vzorků Lb.c198 vzrostl v průměru o 28 % ve srovnání s kontrolou. Na konci doby zrání (168. den) došlo k výraznému zvýšení obsahu aminokyselin u všech modelových vzorků přírodního sýra.

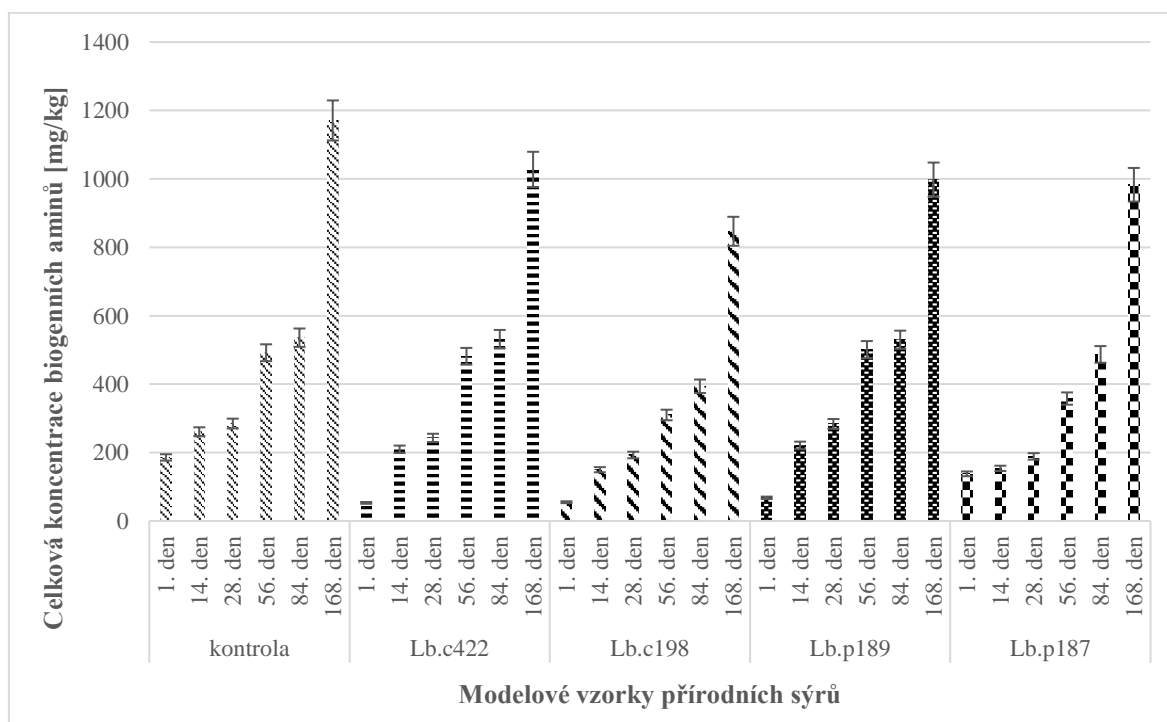
Uvolňování aminokyselin z proteinové matrice sýra je způsobeno především enzymatickou aktivitou přítomné mikroflóry. Výsledná koncentrace volných aminokyselin je však ovlivněna i jejich konverzí na sekundární produkty, které mohou přispět k rozvoji sensorických vlastností sýra (Battelli et al., 2019). Intenzita proteolýzy závisí zejména na již zmíněné proteolytické aktivitě přítomné mikroflóry, která navíc uvolňuje intracelulární proteolytické enzymy do sýrové matrice i po jejím buněčném rozpadu (Fenelon & Guinee, 2000).

4.1.3 Stanovení biogenních aminů

Celkový obsah BA v kontrolní šarži na konci zrání byl $1171 \pm 120,2$ mg/kg (168. den od výroby) (Obr. 3). V případě vzorků

s doplňkovou kulturou byly hodnoty na konci zrání vždy nižší v porovnání s kontrolní šarží. Nejnižší koncentrace byla stanovena ve vzorcích Lb.c198 (847,0 ±46,4 mg/kg), kde byl stanoven téměř o třetinu nižší celkový obsah BA v porovnání s kontrolní šarží bez BA-degradujícího kmene. Vzorky Lb.c198 obsahovaly po 28 dnech zrání o 32 %, po 56 dnech o 37 %, po 84 dnech o 32 % a po 168 dnech o 28 % (P < 0,05).

Vzhledem k tomu, že BA jsou termostabilní, tak další tepelné zpracování potravin je nevyloučí, pokud jsou již v potravině přítomny (Ruiz-Capillas & Herrero, 2019). Použití doplňkových kultur schopných snížit BA spolu s vysoce kvalitními surovinami a správnými hygienickými výrobními postupy může být nejlepším způsobem pro výrobu produktů se sníženými zdravotními riziky spojenými s BA (Tittarelli et al., 2019).



Obr. 3: Celková koncentrace biogenních aminů [mg/kg] ve vzorcích modelových sýrů s různými kmeny *Lactobacillus casei* a *Lactiplantibacillus plantarum* během 168denního skladování.

4.2 Výsledky a diskuze k experimentu II

V rámci druhého experimentu bylo opět vyrobeno několik modelových šarží přírodního sýra, které byly během výroby inokulovány dalšími vybranými kmeny mikroorganismů s cílem posoudit vliv použitých doplňkových kultur na redukci biogenních aminů v přírodních sýrech. Současně byly sledovány základní chemické parametry (hodnoty pH, obsah sušiny, tuku a soli), intenzita proteolýzy a rozvoj přítomné mikroflóry. Pro Experiment II byly vybrány kmeny *Lacticaseibacillus casei* subsp. *casei* CCDM 802 (Lb.c802), *Lactiplantibacillus plantarum* CCDM 183 (Lb.p183) a *Lactiplantibacillus plantarum* CCDM 185 (Lb.p185). Všechny modelové vzorky sýrů byly obdobně jako v Experimentu I navíc kvůli posouzení degradační aktivity doplňkových kmenů inokulovány BA produkujícím kmenem *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 946, přičemž byla současně vyrobená také kontrolní šarže pouze s producentem BA (bez kmenů schopných degradace BA).

4.2.1 Mikrobiologická analýza

U všech modelových vzorků přírodních sýrů byl zaznamenán mírně rostoucí trend celkového počtu mikroorganismů (CPM) do 28. dne zrání a poté začal počet postupně klesat, avšak pouze v případě kontrolních vzorků byl pozorován významný rozdíl v CPM v průběhu jejich zrání ($P < 0,05$).

Počet mléčných koků u kontrolních vzorků se držel relativně konstantně po celou dobu zrání, až na poslední den (168. den), kdy byl počet v porovnání s 1. dnem mírně nižší (nicméně se nejednalo o statisticky významný rozdíl). V případě modelových přírodních sýrů inokulovaných doplňkovým kmenem (Lb.c802, Lb.p183 a Lb.p185) byl od začátku zrání patrný rostoucí trend až do 84. dne ($P < 0,05$).

Nejvyšší počet mléčných tyčinek byl zaznamenán na začátku zrání a poté až do konce experimentu postupně klesal. Obdobně jako v případě

mléčných koků se však nejednalo o významnou změnu ($P > 0,05$). Pro všechny vzorky je totožná skutečnost, že na konci zrání (168. den) byly pozorovány nižší počty mléčných tyčinek v porovnání s hodnotami na začátku zrání (1. den) ($P > 0,05$). Toto snížení je pravděpodobně způsobeno, buněčným rozpadem (Lortal & Chapot-Chartier, 2005).

4.2.2 Stanovení volných aminokyselin

V případě všech šarží modelových vzorků přírodních sýrů došlo v průběhu zrání k postupnému nárůstu celkového obsahu volných aminokyselin. Na začátku zrání měly všechny vzorky podobnou koncentraci aminokyselin ($P > 0,05$). Nejintenzivnější skokový nárůst u kontrolních vzorků a dále také u modelových vzorků s doplňkovou kulturou nastal až mezi 84. a 168. dnem. Nejvyšší koncentrace volných aminokyselin na konci zrání (168. den) byla zaznamenána u kontrolních vzorků, zatímco vzorky inokulované doplňkovým kmenem měly finální obsah aminokyselin srovnatelný ($P > 0,05$).

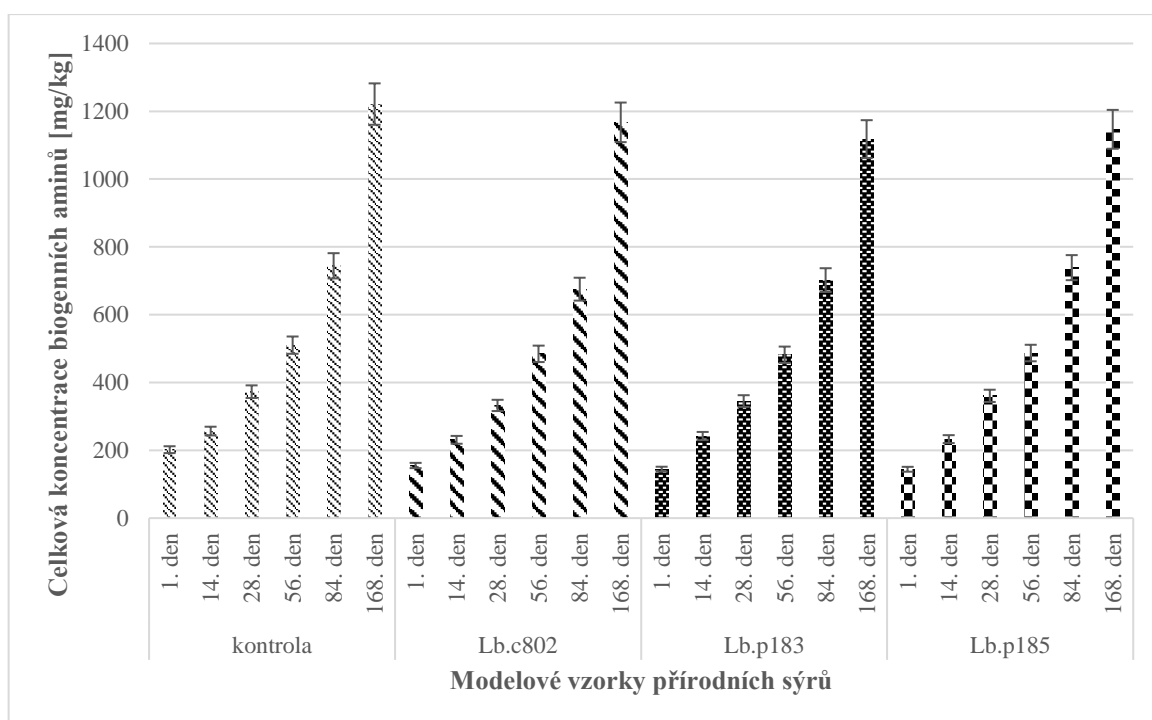
Za hlavní faktor rozpadu kaseinové matrice je v sýrech považována zejména enzymatická aktivita přítomných mikroorganismů, která je navíc i po jejich buněčném rozpadu stále aktivní vlivem uvolnění intracelulárních proteolytických enzymů (Duanis-Assaf et al., 2020). Vzniklé aminokyseliny mohou být dále konvertovány na sloučeniny s negativním dopadem na zdraví konzumenta, jako jsou např. biogenní aminy (Jayasinghe et al., 2022).

4.2.3 Stanovení biogenních aminů

Nejvyšší celkový obsah BA na konci zrání (168. den) byl zaznamenán u kontrolních vzorků a činil $1221,3 \pm 15,4$ mg/kg (Obr. 4). Nižší koncentrace v porovnání s kontrolou byly zaznamenány u všech šarží s doplňkovým kmenem. Na konci zrání byla zaznamenána nejnižší koncentrace BA u vzorků Lb.p183 $1117,9 \pm 12,4$ mg/kg. Z výsledků celkové koncentrace BA lze srovnat

rozsah degradace BA v modelových vzorcích přírodních sýrů Lb.p183 s kontrolními vzorky následovně: po 56 a 84 dnech o 6 % a po 168 dnech dokonce o 9 % nižší koncentrace BA ve vzorcích Lb.p183 v porovnání s kontrolní šarží.

Přestože ze získaných dat lze konstatovat, že degradační aktivita doplňkového kmene *Lactiplantibacillus plantarum* CCDM 183 pozvolna rostla až do konce skladování (168. den), bohužel úbytek celkového obsahu BA ve srovnání s kontrolními sýry není tak markantní, jak se předpokládalo.



Obr. 4: Celková koncentrace biogenních aminů [mg/kg] ve vzorcích modelových sýrů s různými kmeny *Lactocaseibacillus casei* a *Lactiplantibacillus plantarum* během 168denního skladování.

4.3 Výsledky a diskuze k experimentu III

V rámci tohoto experimentu byl sledován vliv vybrané protektivní kultury (*Lacticaseibacillus casei* CCDM 198), která z výsledků předešlých experimentů prokázala nejintenzivnější schopnost degradace biogenních aminů v reálných podmínkách přírodního sýra, a použitého obalového materiálu (smrštitelná fólie, ochranný kopolymerní nátěr Plasticoat a červený potravinářský vosk). Všechny modelové vzorky sýrů byly kvůli posouzení degradační aktivity doplňkového kmene inokulovány BA produkujícím kmenem *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 946, přičemž kontrolní vzorky neobsahovaly degradační kmen *Lacticaseibacillus casei* CCDM 198. V průběhu zrání byly navíc sledovány základní chemické parametry (hodnoty pH, obsah sušiny, tuku a soli), texturní změny, intenzita proteolýzy a rozvoj přítomné mikroflóry. V případě vzorků zabalených do kopolymerního nátěru byl obsah sušiny na konci zrání vyšší ($73,6 \pm 1,89$ %) v porovnání s ostatními vzorky. Odběry a analýzy těchto vzorků probíhaly stejným způsobem jako u předešlých experimentů.

4.3.1 Mikrobiologická analýza

Celkový počet mikroorganismů (CPM) se u kontrolních vzorků (kontrola F a V) postupně zvyšoval až do 56. dne zrání ($P < 0,05$), zatímco mírný nárůst u vzorků s doplňkovým kmenem (Lb.c198F a Lb.c198V) byl pouze do 28. dne ($P > 0,05$). Vzorky modelových sýrů zabalených do kopolymerního nátěru měly odlišný průběh. CPM se zvyšoval u kontrolních vzorků (kontrola P) do 28. dne a u vzorků s doplňkovým kmenem (Lb.c198P) pouze do 14. dne, avšak tato navýšení nebyla statisticky významná. Na druhé straně počet CPM významně klesal od 56. dne až do konce skladování (168. den).

V případě mléčných koků (tj. startovací kultury) byl počet vyšší na začátku zrání (1. den) u všech vzorků ve srovnání s posledním dnem

(168. den). Tento pokles byl však statisticky významný pouze u vzorků zabalených do kopolymerního nátěru.

Průběh vývoje mléčných tyčinek měl u všech vzorků odlišný vývoj. V případě kontrolních sýrů byl počet tyčinek na konci zrání (168. den) nižší ve srovnání s prvním dnem, nicméně tento pokles byl významný pouze u kontrolních vzorků zabalených do kopolymerního nátěru ($P < 0,05$). Naopak u vzorků s doplňkovým kmenem zabalených do smrštitelné fólie (Lb.c198F) a potravinářského vosku (Lb.c198V) došlo k opačnému vývoji, a tedy k tomu, že na konci zrání (168. den) byl počet mléčných tyčinek mírně vyšší ve srovnání s prvním dnem ($P > 0,05$).

Získané výsledky tedy ukazují na měnící se mikroflóru během zrání, konkrétně na pokles počtu startérových a nárůst počtu non-startérových mikroorganismů. Aktivita mikroorganismů závisí, mimo jiné, na podmínkách prostředí, zrání a zejména na aktivitě vody (Beresford et al., 2001). V případě použití kopolymerního nátěru došlo k postupnému poklesu počtu mikroorganismů v důsledku snížení aktivity vody, neboť tento typ obalu umožňuje odpařování vody (Barlow & Morgan, 2013).

4.3.2 Stanovení volných aminokyselin

Během zrání všech modelových vzorků sýrů docházelo k postupnému nárůstu koncentrace volných aminokyselin. Bezprostředně po výrobě sýrů (1. den) byl obsah volných aminokyselin u všech vzorků srovnatelný ($P > 0,05$). K nejvýraznějšímu nárůstu celkové koncentrace volných aminokyselin došlo mezi 84. a 168. dnem, kdy byl tento obsah ve všech vzorcích téměř dvojnásobný. Sýry obsahující doplňkový degradační kmen (Lb.c198) měly podobný průběh vývoje celkového obsahu volných aminokyselin do 84. dne bez ohledu na použitý obalový materiál.

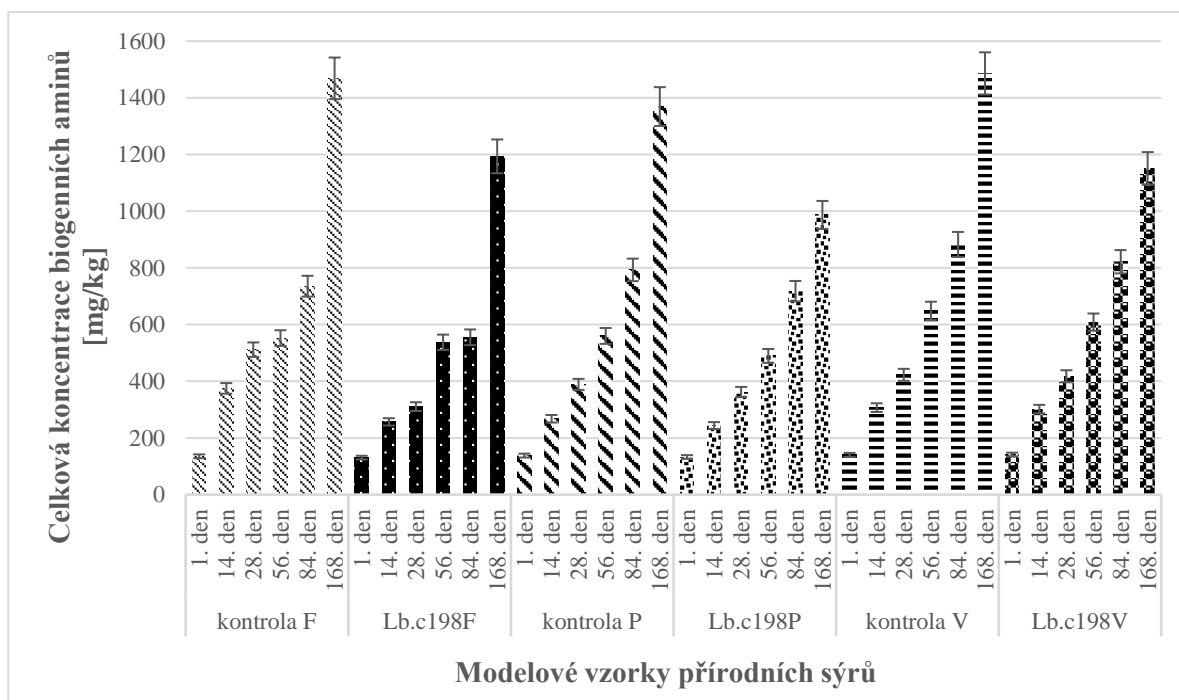
Proteolýza však není způsobena pouze životaschopnými mikroorganismy, ale také enzymy, které se uvolňují do prostředí sýra po lýzy

buněk (Juan et al., 2007). Tato skutečnost pravděpodobně souvisí s vyšší koncentrací volných aminokyselin ve vzorcích zabalených do kopolymerního nátěru, i přestože se počet mikroorganismů během zrání snižoval.

4.3.3 Stanovení biogenních aminů

Během skladování se obsah BA postupně zvyšoval u všech vzorků modelových sýrů (Obr. 5). Nejvyšší konečné obsahy BA na konci zrání sýra (168. den) byly zaznamenány u kontrolních vzorků, konkrétně 1469 ± 30 mg/kg u kontroly F, 1486 ± 27 mg/kg u kontroly V a 1369 ± 28 mg/kg u kontroly P. V případě kontroly P byly na konci zrání pozorovány nejnižší koncentrace BA ve srovnání s ostatními kontrolními vzorky (kontrola F a kontrola V) pravděpodobně v důsledku poklesu mikrobiální aktivity (vzorky obalené kopolymerním nátěrem vykazovaly pokles všech mikroorganismů od 56. dne zrání) a biochemických procesů z důvodu nižší aktivity vody, protože voda unikala skrz obalový kopolymerní materiál ve formě vodní páry (Barlow & Morgan, 2013). Všechny vzorky s doplňkovým degradačním kmenem měly nižší obsah BA ve srovnání s kontrolními vzorky. K nejintenzivnější degradaci BA došlo v případě vzorků Lb.c198P 168. den, protože koncentrace BA byla nižší o 28 % ve srovnání s kontrolou P. Ačkoli byl u vzorků zabalených v kopolymerním nátěru pozorován pokles počtu všech mikroorganismů, lze předpokládat, že enzymatická aktivita aminooxidáz je aktivní i po lýzy buněk (Naila et al., 2010) kmene *Lacticaseibacillus casei* CCDM 198 degradujícího BA.

Jedním z hlavních parametrů podílejících se biochemických reakcí je aktivita vody, která ovlivňuje probíhající proteolýzu, a tím i následnou tvorbu BA prostřednictvím přítomnosti bakterií. S tím úzce souvisí typ použitého obalového materiálu. Smrštitelná fólie a potravinářský vosk nemají takovou propustnost pro vodní páru jako kopolymerní nátěr (Barlow & Morgan, 2013).



Obr. 5: Celková koncentrace biogenních aminů [mg/kg] v modelových vzorcích sýrů s různými obalovými materiály během 168denního zrání.

4.4 Výsledky a diskuze k experimentu IV

Ve čtvrtém experimentu byla sledována látková bilance záměrně přidaných biogenních aminů (tyramin, fenylethylamin, putrescin a kadaverin) v průběhu technologického zpracování přírodních sýrů v závislosti na aktivitě doplňkové kultury se schopností degradace BA. Pro výrobu modelové šarže byla v případě kontrolních vzorků použita pouze základní smetanová kultura, u které byla prokázána zanedbatelná dekarboxylační aktivita, a vzorky Lb.c198 byly inokulovány touto základní smetanovou kulturou a protektivním mikrobiálním kmenem *Lacticaseibacillus casei* CCDM 198. Na základě zjištěných skutečných koncentrací biogenních aminů, které byly přítomny v sýrech ihned po výrobě, bylo spočítáno, až o kolik procent je vybraný kmen (*Lacticaseibacillus casei* CCDM 198) schopen snížit koncentraci biogenních

aminů v matrici přírodního sýra v průběhu zrání. Analýzy těchto vzorků probíhaly stejným způsobem jako u předchozích experimentů.

4.4.1 Mikrobiologická analýza

V případě kontrolních vzorků bylo zaznamenáno zvyšující se zastoupení CPM do 28. dne ($P > 0,05$), zatímco u vzorků Lb.c198 byl od začátku skladování pozorován mírný pokles.

V případě mléčných koků byl u obou modelových šarží zaregistrován stejný trend, tedy že na začátku zrání byl obsah mléčných koků nejvyšší a následně se jejich množství postupně snižovalo až do konce zrání. V případě kontrolních vzorků docházelo k významnému snížení od 56. dne zrání, zatímco u vzorků Lb.c198 byl pozorován výrazný pokles až na konci zrání (168. den).

Vývoj mléčných tyčinek měl u obou šarží ze začátku rostoucí trend, konkrétně u kontrolních vzorků do 56. dne ($P > 0,05$) a v případě vzorků Lb.c198 až do 84. dne s tím, že ke statisticky významnému nárůstu docházelo od 56. dne.

Bakterie mléčného kvašení jsou početná skupina mikroorganismů podílející se na průběhu zrání sýrů. Jejich počet ve zrajících sýrech závisí na několika faktorech, zejména na obsahu vody, koncentraci soli nebo na hodnotě pH prostředí (Beresford et al., 2001). Právě obsah soli a hodnota pH mohou být jedním z důvodů, proč obsah mléčných koků v průběhu zrání postupně klesal, zatímco v případě mléčných tyčinek rostl, neboť mléčné koky jsou ke změnám jmenovaných faktorů mnohem náchylnější (Caridi et al., 2003).

4.4.2 Stanovení volných aminokyselin

V průběhu tvorby volných aminokyselin byl po celou dobu experimentu registrován rostoucí trend u obou šarží. Tento fakt dokazuje, že u všech vzorků

přírodních sýrů probíhala intenzivní proteolýza, která byla zaznamenána ve srovnání s kontrolou vždy vyšší u vzorků Lb.c198, avšak až na konci zrání (168. den) byl tento rozdíl statisticky významný ($P < 0,05$).

Na začátku zrání (1. den) byl obsah volných aminokyselin u obou šarží podobný ($P > 0,05$) a stejně se jevil i postupný nárůst koncentrace volných aminokyselin až do 84. dne. Po 84. dni došlo k strmému nárůstu u všech modelových sýrů, konkrétně u kontrolních vzorků o 38 % a v případě vzorků Lb.c198 o 50 %. Celková koncentrace volných aminokyselin na konci zrání (168. den) byla u vzorků Lb.c198 vyšší o 19 % a dosahovala hodnoty $8,789 \pm 0,253$ g/kg (v případě kontrolních vzorků byl celkový obsah volných aminokyselin $7,153 \pm 0,187$ g/kg).

Postupně se zvyšující koncentrace volných aminokyselin v průběhu zrání je především v důsledku zmíněné enzymatické aktivity přítomných mikroorganismů schopných uvolňovat proteolytické enzymy i po jejich buněčném rozpadu (Fenelon & Guinee, 2000).

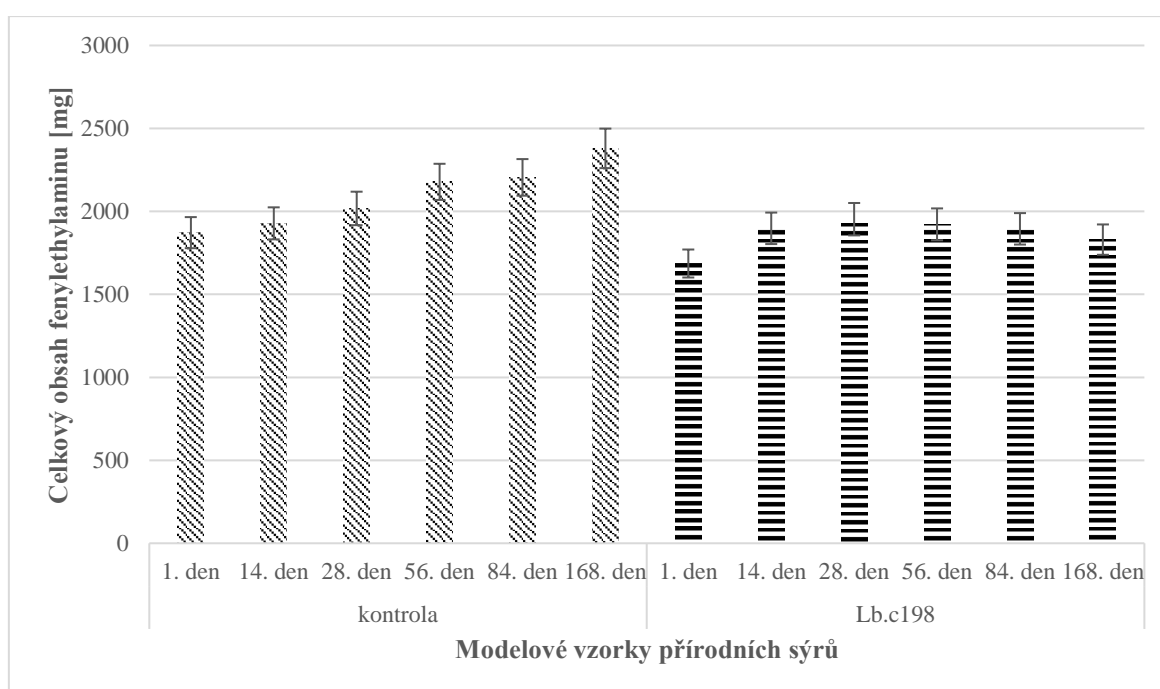
4.4.3 Stanovení obsahu biogenních aminů

Nejhojněji se vyskytující BA v přírodních sýrech jsou fenylethylamin, putrescin, kadaverin, tyramin a histamin (Fox, 2004). Vzhledem k tomu, že histamin se v modelových vzorcích nacházel pouze v nepatrných koncentracích, tak jeho vývoj nebyl posuzován. Studium vlivu degradačního kmene *Lacticaseibacillus casei* CCDM 198 na akumulaci fenylethylaminu, putrescinu, kadaverinu a tyraminu je vyobrazeno na následujících Obr. 6-9.

Obsah fenylethylaminu v modelových přírodních sýrech je znázorněn na Obr. 6. V případě kontrolních vzorků se obsah postupně zvyšoval až do konce zrání (168. den), kde jeho koncentrace narostla až o 21 % v porovnání s 1. dnem pravděpodobně aktivitou non-startérových mikroorganismů. Naopak u vzorků Lb.c198 byl rostoucí charakter fenylethylaminu zaznamenán pouze do 28. dne a následně se postupně

snižoval až do konce zrání (168. den). Po 168 dnech skladování byla u vzorků Lb.c198 naměřena o 23 % nižší koncentrace fenylethylaminu oproti kontrolním vzorkům.

Produkce fenylethylaminu vzniká v důsledku aktivity tyrosin dekarboxylačních bakterií, a právě proto je produkce fenylethylaminu spojována zároveň i s produkcí tyraminu. Tato skutečnost již byla prokázána např. i u mikroorganismů z rodu *Enterococcus* či *Staphylococcus* (Bover-Cid et al., 2003).

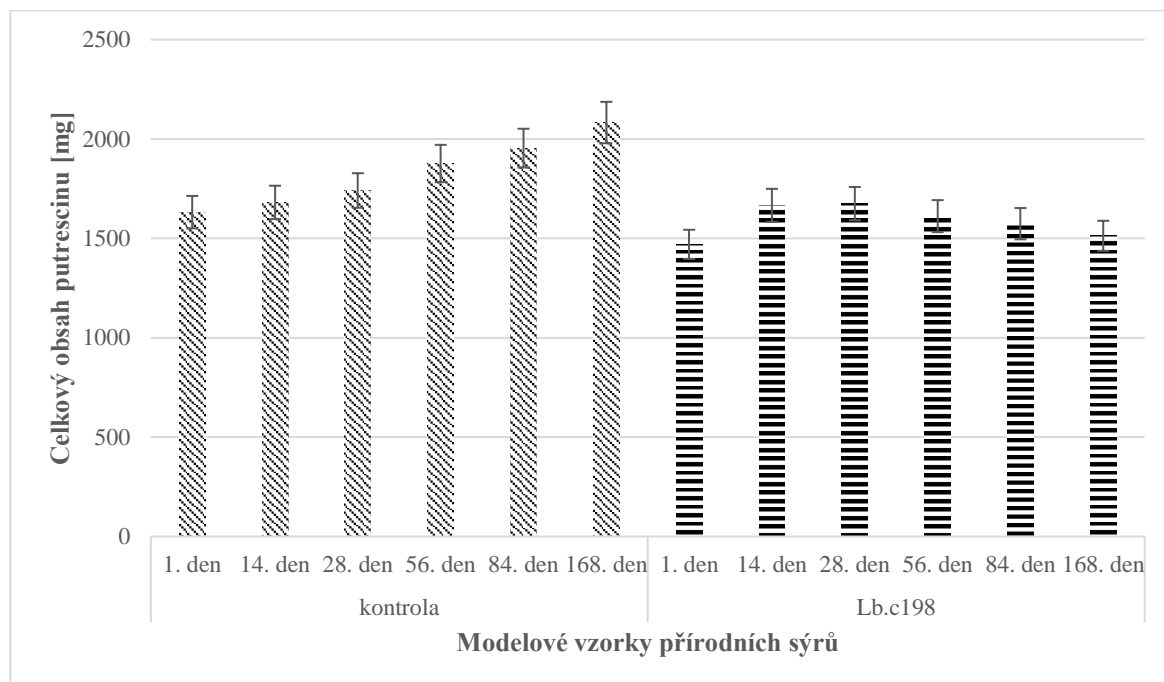


Obr. 6: Celkový obsah fenylethylaminu [mg] ve vzorcích modelových sýrů během 168denního skladování.

Stejně jako v případě fenylethylaminu byl i u putrescinu (Obr. 7) zaznamenán u kontrolních vzorků postupný nárůst obsahu až do konce zrání (168. den), kde se jeho obsah zvýšil až o 22 % v porovnání s 1. dnem. U vzorků s doplňkovým degradačním kmenem Lb.c198 byl pozorován nárůst do 28. dne a poté docházelo ke snižování koncentrace putrescinu až do konce skladování. Po 84 dnech byl obsah putrescinu u vzorků Lb.c198 o 19 % nižší oproti kontrolním vzorkům a konečná koncentrace putrescinu na konci zrání

(168. den) byla u vzorků s degradačním kmenem (Lb.c198) v porovnání s kontrolními vzorky nižší dokonce až o 28 %.

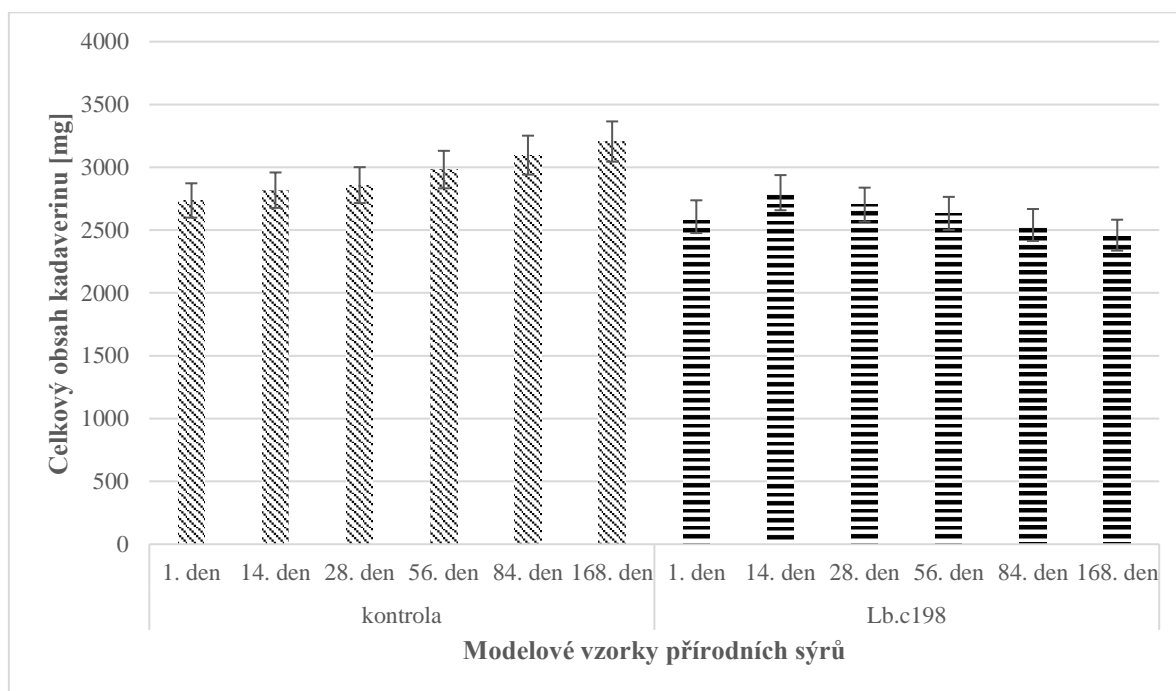
Putrescin se řadí mezi alifatické biogenní diaminy a vzniká dekarboxylací volné aminokyseliny ornitinu aktivitou enzymu ornitindekarboxylázy. Alternativní cestou produkce putrescinu může být prostřednictvím agmatinu z argininu (Lucas et al., 2007).



Obr. 7: Celkový obsah putrescinu [mg] ve vzorcích modelových sýrů během 168denního skladování.

Průběh akumulace kadaverinu (Obr. 8) u kontrolních vzorků má obdobný charakter jako ve dvou předešlých případech, tedy došlo k postupnému navyšování obsahu až do konce zrání (168. den), kde se jeho obsah zvýšil o 15 % v porovnání s 1. dnem. U vzorků Lb.c198 byl zaznamenán rostoucí trend pouze do 14. dne, od kterého docházelo k postupnému snižování koncentrace kadaverinu. Po 84 dnech zrání byl obsah kadaverinu u vzorků Lb.c198 nižší o 18 % v porovnání s kontrolními vzorky, zatímco na konci zrání (168. den) byl obsah kadaverinu nižší o 10 % oproti kontrolním vzorkům.

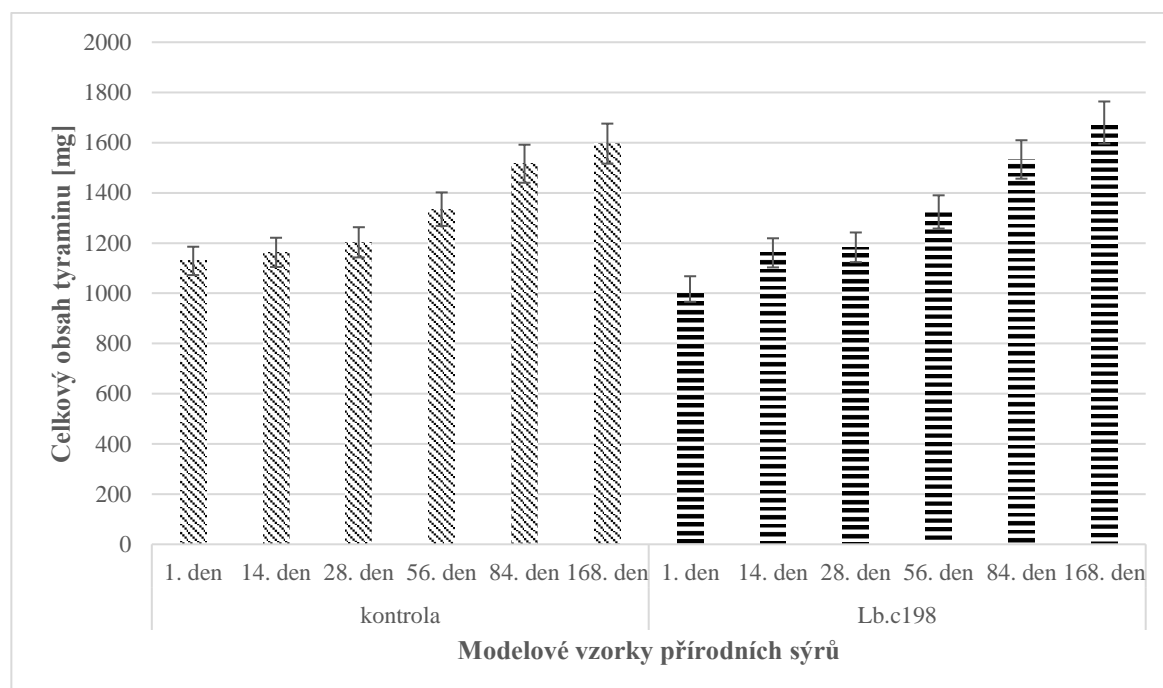
Kadaverin se řadí mezi alifatické biogenní diaminy a vzniká z lysinu působením mikrobiální lysindekarboxylázy. Fyziologická úloha kadaverinu není tolik prozkoumána, avšak stejně jako v případě putrescinu, způsobuje pravděpodobně vyšší konzumace hypotenzi a může reagovat s dusitany za vzniku karcinogenních nitrosaminů (EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ), 2011).



Obr. 8: Celkový obsah kadaverinu [mg] ve vzorcích modelových sýrů během 168denního skladování.

Obsah tyraminu v modelových přírodních sýrech v průběhu zrání je znázorněn na Obr. 9. V případě tohoto biogenního aminu byl zpozorován obdobný trend u obou šarží modelových vzorků přírodních sýrů. Na Obr. 9 lze vidět, že do 28. dne bylo zvýšení obsahu tyraminu mírné a následně byl registrován strmý nárůst až do konce zrání (168. den) bez ohledu na druh modelového vzorku. Ze získaných dat tedy vyplývá, že u kmene *Lactocaseibacillus casei* CCDM 198 nebyla prokázána vysoká degradace tyraminu (hodnoty na konci, resp. v celém skladovacím experimentu, mezi kontrolou a Lb.c198 byly srovnatelné).

Tyramin se řadí mezi heterocyklické biogenní aminy a vzniká dekarboxylací tyrosinu. Právě tyramin je jeden z nejvíce zastoupených biogenních aminů v sýrech, neboť za jeho produkci jsou zodpovědné zejména bakterie mléčného kvašení (laktokoky a laktobacily) a enterokoky (Nieto-Arribas et al., 2009).



Obr. 9: Celkový obsah tyraminu [mg] ve vzorcích modelových sýrů během 168denního skladování.

Jednou z možností, jak omezit produkci BA v potravinách, je využití doplňkových mikrobiálních kmenů, které mají degradační aktivitu vůči BA (Tittarelli et al., 2019). Ze získaných dat lze usoudit, že aplikovaný doplňkový kmen *Lacticaseibacillus casei* CCDM 198 má vliv na výsledné koncentrace fenylethylaminu, putrescinu a kadaverinu, zatímco na vliv tyraminu v průběhu zrání tento kmen nemá žádný výrazný účinek.

5. PŘÍNOS PRÁCE PRO VĚDU A PRAXI

Biogenní aminy jsou nízkomolekulární látky s biologickou aktivitou a některé z nich (serotonin, histamin a tyramin) hrají důležitou roli ve fyziologii člověka, zvířat a rostlin (Medina et al., 2003). Vysoká koncentrace biogenních aminů v potravinách je nežádoucí, neboť s sebou přináší některá zdravotní rizika pro konzumenta. Při jejich nadměrné konzumaci dochází k bolestem hlavy, nevolnosti, problémům s krevním tlakem apod. Obecně mají biogenní aminy ve zvýšeném množství negativní dopad na kardiovaskulární a nervový systém člověka (Novella-Rodríguez et al., 2000). V potravinách mohou ve vyšších koncentracích vznikat nejčastěji činností jak kontaminujících mikroorganismů (především *Escherichia*, *Enterobacter*, *Salmonella*, *Shigella*), tak i startérových nebo non-startérových bakterií mléčného kvašení.

Redukce celkového počtu mikroorganismů v surovinách (ať už tepelným či vysokotlakým ošetřením apod.) je jednou z možností, jak dosáhnout nižší produkce BA během skladování výrobku. Na druhou stranu tyto metody nemusí být vždy dostačující, neboť v průběhu výroby a následného skladování dochází k růstu počtu mikroorganismů (včetně dekarboxyláza pozitivních). Další možností, jak zvýšit kvalitu výrobků, je snížení obsahu BA mikrobiální aktivitou, kde se uplatňuje zejména aminooxidáza, která hraje hlavní roli při rozkladu BA.

Přínosy vyplývající z práce pro oblast vědy:

- 1) byl popsán vliv použití vybraných mikrobiálních kmenů se schopností degradace biogenních aminů na:
 - a) základní chemické parametry (hodnoty pH, obsah sušiny, obsah soli, obsah tuku v sušině) přírodních sýrů,
 - b) fyzikální vlastnosti (tvrdost) přírodních sýrů;

- 2) byl sledován vliv vybraných mikrobiálních kmenů na intenzitu proteolýzy v průběhu zrání sýrů;
- 3) byl sledován vliv vybraných mikrobiálních kultur na akumulaci biogenních aminů v přírodních sýrech v průběhu zrání;
- 4) v případě všech modelových vzorků přírodních sýrů byl během zrání sledován vývoj vybraných skupin mikroorganismů:
 - a) celkový počet mikroorganismů,
 - b) mléčné koky a tyčinky,
 - c) koliformní bakterie z čeledi *Enterobacteriaceae*,
 - d) bakterie z rodu *Enterococcus*,
 - e) plísňe a kvasinky;
- 5) byl popsán vliv obalového materiálu v průběhu zrání modelových sýrů inokulovaných vybraným doplňkovým kmenem *Lacticaseibacillus casei* CCDM 198 na:
 - a) vývoj základních chemických parametrů (hodnoty pH, obsah sušiny, obsah soli, obsah tuku v sušině),
 - b) texturní profil přírodních sýrů,
 - c) zastoupení vybraných skupin mikroorganismů (viz bod 2),
 - d) intenzitu proteolýzy,
 - e) vývoj obsahu biogenních aminů;
- 6) byla sledována látková bilance záměrně přidaných biogenních aminů (tyramin, fenylethylamin, putrescin a kadaverin) v průběhu technologického zpracování a zrání přírodních sýrů v závislosti na aktivitě doplňkového kmene *Lacticaseibacillus casei* CCDM 198.

Přínosy vyplývající z práce pro oblast praxe:

- 1) bylo prokázáno, že užití sledovaných doplňkových mikrobiálních kultur s degradující aktivitou vůči biogenním aminům nemá vliv na základní chemické parametry přírodních sýrů v podobě hodnot pH a obsahu sušiny, tuku v sušině a soli jako základních kvalitativních parametrů finálního produktu;
- 2) bylo prokázáno, že užití sledovaných doplňkových mikrobiálních kultur s degradující aktivitou vůči biogenním aminům má výrazný vliv na probíhající proteolýzu a redukci biogenních aminů v průběhu zrání sýrů holandského typu;
- 3) ze sledovaných doplňkových kmenů byl vybrán *Lacticaseibacillus casei* CCDM 198, který prokázal vysoký potenciál pro redukci fenylethylaminu, putrescinu a kadaverinu v průmyslové výrobě přírodních sýrů holandského typu;
- 4) bylo prokázáno, že použití různých obalových materiálů (smrštitelná fólie, kopolymerní nátěr a potravinářský vosk) má vliv na:
 - a) obsah sušiny,
 - b) texturu přírodních sýrů,
 - c) probíhající proteolýzu,
 - d) degradaci biogenních aminů prostřednictvím doplňkové kultury *Lacticaseibacillus casei* CCDM 198.

6. ZÁVĚR

Cílem předložené práce bylo studium možností ovlivňujících dekarboxylázovou aktivitu v reálném systému přírodního sýra a tím v budoucnosti snížit pravděpodobnost nežádoucích účinků biogenních aminů, které spotřebitel přijme prostřednictvím konzumace sýrů. K naplnění cíle byly využity vybrané mikrobiální kmeny, jejichž schopnost redukce biogenních aminů byla potvrzena v předešlých studiích *in vitro*. Kromě použitých mikroorganismů byl dále sledován vliv použitého obalového materiálu (smrštiteľná fólie, kopolymerní nátěr a potravinářský vosk) na akumulaci biogenních aminů v průběhu zrání (168 dní). Vzorky přírodních sýrů byly podrobeny chemické, fyzikální a mikrobiologické analýze vždy po 1., 14., 28., 56., 84. a 168. dni od samotné výroby. V rámci chemické analýzy byl sledován: (i) obsah sušiny; (ii) obsah tuku; (iii) obsah soli; (iv) hodnoty pH; (v) koncentrace volných aminokyselin a (vi) koncentrace biogenních aminů (tryptamin, fenylethylamin, putrescin, kadaverin, histamin, tyramin, spermidin a spermin). Kvantifikace biogenních aminů byla provedena chromatografickou metodou HPLC se spektrofotometrickou detekcí (UV oblast při vlnové délce 254 nm). Fyzikální analýza představovala měření vývoje texturních vlastností přírodních sýrů v průběhu zrání a mikrobiologická analýza zahrnovala stanovení počtu následujících mikroorganismů na příslušných živných půdách: (i) PCA – celkový počet mikroorganismů; (ii) M17 – mléčné koky; (iii) MRS – tyčinky bakterií mléčného kvašení; (iv) Endova půda – koliformní bakterie z čeledi *Enterobacteriaceae*; (v) SB – bakterie rodu *Enterococcus*; (vi) CHYGA – plísňe a kvasinky.

Z předložené disertační práce lze formulovat následující závěry:

- 1) použití doplňkových mikrobiálních kultur nemělo vliv na základní chemické parametry (hodnoty pH, obsah sušiny, obsah soli, obsah tuku v sušině) ani na texturu (tvrdost) přírodních sýrů;
- 2) použití různého obalového materiálu mělo výrazný vliv na obsah sušiny (konkrétně v případě kopolymerního nátěru byl zaznamenán rostoucí trend ve vývoji sušiny) a na texturu přírodních sýrů (sýry zabalené v kopolymerním nátěru vykazovaly výrazněji vyšší hodnoty v tvrdosti);
- 3) vývoj počtu mikroorganismů vykazoval určité rozdíly mezi jednotlivými vzorky;
- 4) intenzivnější proteolýza probíhala zejména u vzorků s doplňkovým mikrobiálním kmenem s degradační aktivitou vůči biogenním aminům;
- 5) byla prokázána degradační aktivita doplňkových mikrobiálních kmenů vůči obsahu biogenních aminů během zrání v reálném systému přírodních sýrů;
- 6) mikrobiálním kmenem s nejintenzivnější degradační aktivitou biogenních aminů byl *Lacticaseibacillus casei* CCDM 198, u kterého byla po 168 dnech prokázána celkově nižší koncentrace biogenních aminů až o 28 %;
- 7) u kmene *Lacticaseibacillus casei* CCDM 198 byla prokázána nejúčinnější degradační aktivita vůči fenylethylaminu, kadaverinu a putrescinu, zatímco na vývoj tyraminu nebyl zpozorován žádný výrazný vliv.

Hlavním důvodem, proč je důležité se nadále věnovat výzkumu zaměřujícímu se na možnosti snížení obsahu biogenních aminů v potravinách, jsou právě zmíněná zdravotní rizika spojená s konzumací potravin s vysokou koncentrací těchto látek. Zároveň může docházet k vyšší akumulaci biogenních aminů prostřednictvím konzumace různých potravin a nápojů ve velmi krátkém časovém období (např. současnou konzumací sýrů a vína) s následným zahlcením konzumentova detoxifikačního systému.

7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

ÁLVAREZ, Miguel A.; MORENO-ARRIBAS, Ma Victoria. The problem of biogenic amines in fermented foods and the use of potential biogenic amine-degrading microorganisms as a solution. *Trends in food science & technology*, 2014, 39.2: 146-155. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2014.07.007>

ARQUÉS, J. L., et al. Inactivation of microbial contaminants in raw milk La Serena cheese by high-pressure treatments. *Journal of dairy science*, 2006, 89.3: 888-891. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(06\)72153-1](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72153-1)

BARLOW, C. Y.; MORGAN, D. C. Polymer film packaging for food: An environmental assessment. *Resources, Conservation and Recycling*, 2013, 78: 74-80. <https://doi.org/10.1016/j.resconrec.2013.07.003>

BATTELLI, Giovanna, et al. Modifications of the volatile and nonvolatile metabolome of goat cheese due to adjunct of non-starter lactic acid bacteria. *LWT*, 2019, 116: 108576. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108576>

BERESFORD, Tom P., et al. Recent advances in cheese microbiology. *International dairy journal*, 2001, 11.4-7: 259-274. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(01\)00056-5](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(01)00056-5)

BOVER-CID, Sara, et al. Contribution of contaminant enterobacteria and lactic acid bacteria to biogenic amine accumulation in spontaneous fermentation of pork sausages. *European Food Research and Technology*, 2003, 216.6: 477-482. <https://doi.org/10.1007/s00217-003-0691-6>

BUŇKOVÁ, Leona, et al. Tyramine production of technological important strains of *Lactobacillus*, *Lactococcus* and *Streptococcus*. *European Food Research and Technology*, 2009, 229.3: 533-538. <https://doi.org/10.1007/s00217-009-1075-3>

CALZADA, J., et al. Proteolysis and biogenic amine buildup in high-pressure treated ovine milk blue-veined cheese. *Journal of dairy science*, 2013, 96.8: 4816-4829. <https://doi.org/10.3168/jds.2012-6409>

CARIDI, A., et al. Ripening and seasonal changes in microbiological and chemical parameters of the artisanal cheese Caprino d'Aspromonte produced from raw or thermized goat's milk. *Food Microbiology*, 2003, 20.2: 201-209. [https://doi.org/10.1016/S0740-0020\(02\)00116-8](https://doi.org/10.1016/S0740-0020(02)00116-8)

COGAN, T. M., et al. Invited review: advances in starter cultures and cultured foods. *Journal of Dairy Science*, 2007, 90.9: 4005-4021. <https://doi.org/10.3168/jds.2006-765>

COOPER, Ronald A. On the amine oxidases of *Klebsiella aerogenes* strain W70. *FEMS Microbiology Letters*, 1997, 146.1: 85-89. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1997.tb10175.x>

DADÁKOVÁ, Eva; KŘÍŽEK, Martin; PELIKÁNOVÁ, Tamara. Determination of biogenic amines in foods using ultra-performance liquid chromatography (UPLC). *Food chemistry*, 2009, 116.1: 365-370. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.02.018>

DAPKEVICIUS, Maria LN Enes, et al. Biogenic amine formation and degradation by potential fish silage starter microorganisms. *International Journal of Food Microbiology*, 2000, 57.1-2: 107-114. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(00\)00238-5](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00238-5)

EDWARDS, Susan T.; SANDINE, William E. Public health significance of amines in cheese. *Journal of Dairy Science*, 1981, 64.12: 2431-2438. [https://doi.org/10.3168/JDS.S0022-0302\(81\)82868-8](https://doi.org/10.3168/JDS.S0022-0302(81)82868-8)

EFSA PANEL ON BIOLOGICAL HAZARDS (BIOHAZ). Scientific opinion on risk based control of biogenic amine formation in fermented foods. *Efsa Journal*, 2011, 9.10: 2393. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2011.2393>

EUROPEAN COMMISSION (EC). No 853/2004 of the European Parliament and of the Council of 29 April 2004 laying down specific hygiene rules for food of animal origin. *Official Journal, L*, 2004, 139, 30-205.

FADDA, S.; VIGNOLO, G.; OLIVER, G. Tyramine degradation and tyramine/histamine production by lactic acid bacteria and *Kocuria* strains. *Biotechnology Letters*, 2001, 23.24: 2015-2019. <https://doi.org/10.1023/A:1013783030276>

FENELON, Mark A.; GUINEE, Timothy P. Primary proteolysis and textural changes during ripening in Cheddar cheeses manufactured to different fat contents. *International Dairy Journal*, 2000, 10.3: 151-158. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(00\)00040-6](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(00)00040-6)

FERNANDEZ, Maria; LINARES, Daniel M.; ÁLVAREZ, Miguel A. Sequencing of the tyrosine decarboxylase cluster of *Lactococcus lactis* IPLA 655 and the development of a PCR method for detecting tyrosine decarboxylating

lactic acid bacteria. *Journal of food protection*, 2004, 67.11: 2521-2529. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-67.11.2521>

FERNÁNDEZ-GARCÍA, E.; TOMILLO, J.; NUÑEZ, M. Formation of biogenic amines in raw milk Hispánico cheese manufactured with proteinases and different levels of starter culture. *Journal of Food Protection*, 2000, 63.11: 1551-1555. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-63.11.1551>

FLASAROVÁ, Radka, et al. Biogenic amine production by *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* strains in the model system of Dutch-type cheese. *Food Chemistry*, 2016, 194: 68-75. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.07.069>

FONTANA, Anthony J. Understanding the importance of water activity in food. *Cereal foods world*, 2000, 45.1: 7-10.

FOX, Patrick F.; MCSWEENEY, Paul LH; PAUL, L. H. Dairy chemistry and biochemistry. 1998. ISBN: 9783319148922 .

FOX, Patrick F., et al. (ed.). *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology, Volume 1: General Aspects*. Elsevier, 2004. ISBN: 9780080500935.

GALGANO, Fernanda, et al. Focused review: agmatine in fermented foods. *Frontiers in Microbiology*, 2012, 3: 199. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00199>

GARBOWSKA, Monika, et al. The Impact of the Adjunct Heat-Treated Starter Culture and *Lb. helveticus* LH-B01 on the Proteolysis and ACE Inhibitory Activity in Dutch-Type Cheese Model during Ripening. *Animals*, 2021, 11.9: 2699. <https://doi.org/10.3390/ani11092699>

GARCÍA, L. Fernández; RODRÍGUEZ, FA Riera. Combination of microfiltration and heat treatment for ESL milk production: Impact on shelf life. *Journal of Food Engineering*, 2014, 128: 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.11.021>

GARDINI, Fausto, et al. Use of *Staphylococcus xylosum* as a starter culture in dried sausages: effect on the biogenic amine content. *Meat science*, 2002, 61.3: 275-283. [https://doi.org/10.1016/S0309-1740\(01\)00193-0](https://doi.org/10.1016/S0309-1740(01)00193-0)

GIANOTTI, Valentina, et al. A new hydrophilic interaction liquid chromatography tandem mass spectrometry method for the simultaneous determination of seven biogenic amines in cheese. *Journal of Chromatography A*, 2008, 1185.2: 296-300. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.02.038>

HALÁSZ, Anna, et al. Biogenic amines and their production by microorganisms in food. *Trends in Food Science & Technology*, 1994, 5.2: 42-49. [https://doi.org/10.1016/0924-2244\(94\)90070-1](https://doi.org/10.1016/0924-2244(94)90070-1)

HEAD, Laura E.; BIRD, Michael R. The removal of psychotropic spores from Milk Protein Isolate feeds using tubular ceramic microfilters. *Journal of Food Process Engineering*, 2013a, 36.1: 113-124. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4530.2011.00661.x>

HERRERO-FRESNO, Ana, et al. Lactobacillus casei strains isolated from cheese reduce biogenic amine accumulation in an experimental model. *International journal of food microbiology*, 2012, 157.2: 297-304. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.06.002>

CHONG, C. Y., et al. The effects of food processing on biogenic amines formation. *International Food Research Journal*, 2011, 18.3.

CHURCH, Susan, et al. *The Composition of Foods*, 6th ed. London: Royal Society of Chemistry, 2002, 538 s. ISBN: 9780854044283.

INDRA, Z. & MIZERA, J. Control methods for milk and milk products. Prague: SNTL Publishing, 1992.

JAYASINGHE, G. D. T. M., et al. Critical review on microextraction techniques used in determination of histamine in food samples. *Discover Food*, 2022, 2.1: 1-12. <https://doi.org/10.1007/s44187-022-00008-6>

JUAN, B., et al. Effects of high pressure on proteolytic enzymes in cheese: relationship with the proteolysis of ewe milk cheese. *Journal of Dairy Science*, 2007, 90.5: 2113-2125. <https://doi.org/10.3168/jds.2006-791>

JUNEJA, Vijay K.; SOFOS, John N. *Pathogens and toxins in foods: challenges and interventions*. ASM Press, 2009. ISBN: 9781119737926.

KAPLAN, E. R.; SAPEIKA, N.; MOODIE, I. M. Determination of the tyramine content of South African cheeses by gas-liquid chromatography. *Analyst*, 1974, 99.1182: 565-569. <https://doi.org/10.1039/AN9749900565>

KŘÍŽEK, M.; KALÁČ, P. BIOGENNÍ AMINY V POTRAVINÁCH A JEJICH ROLE VE VYZÍVĚ. *Potravinářské vědy*, 1998, 16.4: 151-159.

KUSANO, T., et al. Polyamines: essential factors for growth and survival. *Planta*, 2008, 228.3: 367-381. <https://doi.org/10.1007/s00425-008-0772-7>

LA GIOIA, Federica, et al. Identification of a tyrosine decarboxylase gene (tdcA) in *Streptococcus thermophilus* 1TT45 and analysis of its expression and tyramine production in milk. *Applied and Environmental Microbiology*, 2011, 77.3: 1140-1144. <https://doi.org/10.1128/AEM.01928-10>

LADERO, Victor, et al. Toxicological effects of dietary biogenic amines. *Current Nutrition & Food Science*, 2010, 6.2: 145-156. <https://doi.org/10.2174/157340110791233256>

LADERO, Victor, et al. Survival of biogenic amine-producing dairy LAB strains at pasteurisation conditions. *International journal of food science & technology*, 2011, 46.3: 516-521. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2010.02508.x>

LALEYE, L. C., et al. Assessment of cheddar cheese quality by chromatographic analysis of free amino acids and biogenic amines. *Journal of Food Science*, 1987, 52.2: 303-305. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1987.tb06599.x>

LEUSCHNER, Renata GK; KURIHARA, Rima; HAMMES, Walter P. Effect of enhanced proteolysis on formation of biogenic amines by lactobacilli during Gouda cheese ripening. *International journal of food microbiology*, 1998, 44.1-2: 15-20. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(98\)00118-4](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(98)00118-4)

LI, Zhibin, et al. Effects of pasteurization, microfiltration, and ultraviolet-c treatments on microorganisms and bioactive proteins in bovine skim milk. *Food Bioscience*, 2021, 43: 101339. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2021.101339>

LINARES, Daniel M., et al. Factors influencing biogenic amines accumulation in dairy products. *Frontiers in microbiology*, 2012, 3: 180. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00180>

LORTAL, Sylvie; CHAPOT-CHARTIER, M.-P. Role, mechanisms and control of lactic acid bacteria lysis in cheese. *International Dairy Journal*, 2005, 15.6-9: 857-871. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2004.08.024>

LUCAS, Patrick M., et al. Agmatine deiminase pathway genes in *Lactobacillus brevis* are linked to the tyrosine decarboxylation operon in a putative acid resistance locus. *Microbiology*, 2007, 153.7: 2221-2230. <https://doi.org/10.1099/mic.0.2007/006320-0>

McSWEENEY, Paul LH. Biochemistry of cheese ripening. *International journal of dairy technology*, 2004, 57.2-3: 127-144. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0307.2004.00147.x>

MEDINA, Miguel Ángel, et al. Biogenic amines and polyamines: similar biochemistry for different physiological missions and biomedical applications. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, 2003, 38.1: 23-59. <https://doi.org/10.1080/713609209>

NAILA, Aishath, et al. Control of biogenic amines in food—existing and emerging approaches. *Journal of food science*, 2010, 75.7: R139-R150. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2010.01774.x>

NIETO-ARRIBAS, P., et al. Technological characterization of Lactobacillus isolates from traditional Manchego cheese for potential use as adjunct starter cultures. *Food Control*, 2009, 20.12: 1092-1098. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2009.03.001>

NOVELLA-RODRÍGUEZ, Sonia; VECIANA-NOGUÉS, M. Teresa; VIDAL-CAROU, M. Carmen. Biogenic amines and polyamines in milks and cheeses by ion-pair high performance liquid chromatography. *Journal of agricultural and food chemistry*, 2000, 48.11: 5117-5123. <https://doi.org/10.1021/jf0002084>

NOVELLA-RODRÍGUEZ, S., et al. Distribution of biogenic amines and polyamines in cheese. *Journal of food science*, 2003, 68.3: 750-756. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2003.tb08236.x>

O'REILLY, Ciara E., et al. Use of hydrostatic pressure for inactivation of microbial contaminants in cheese. *Applied and environmental microbiology*, 2000, 66.11: 4890-4896. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.11.4890-4896.2000>

RAHMAN, Mohammad Shafiur. Food stability beyond water activity and glass transition: macro-micro region concept in the state diagram. *International Journal of Food Properties*, 2009, 12.4: 726-740. <https://doi.org/10.1080/10942910802628107>

ROGINSKI, H., et al. *Encyclopedia of Dairy Sciences*. London: Academic Press, 2002, 2799, ISBN: 0122272358.

RUIZ-CAPILLAS, Claudia; HERRERO, Ana M. Impact of biogenic amines on food quality and safety. *Foods*, 2019, 8.2: 62. <https://doi.org/10.3390/foods8020062>

SANTOS, MH Silla. Biogenic amines: their importance in foods. *International journal of food microbiology*, 1996, 29.2-3: 213-231. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(95\)00032-1](https://doi.org/10.1016/0168-1605(95)00032-1)

SMĚLÁ, D., et al. Chromatographic determination of biogenic amines in meat products during fermentation and long-term storage. *Chemické listy*, 2004, 98.7.

STRATTON, Jayne E.; HUTKINS, Rovert W.; TAYLOR, Steve L. Biogenic amines in cheese and other fermented foods: a review. *Journal of food protection*, 1991, 54.6: 460-470. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-54.6.460>

TITTARELLI, Fabrizia, et al. Biogenic amines producing and degrading bacteria: A snapshot from raw ewes' cheese. *LWT*, 2019, 101: 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.11.030>

VALE, Silvana; GLORIA, M. Beatriz A. Biogenic amines in Brazilian cheeses. *Food Chemistry*, 1998, 63.3: 343-348. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(98\)00019-3](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(98)00019-3)

ZAMAN, Muhammad Zukhrufuz, et al. Novel starter cultures to inhibit biogenic amines accumulation during fish sauce fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 2011, 145.1: 84-91. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.11.031>

ZHENG, Jinshui, et al. A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*. 2020. <https://doi.org/10.7939/r3-egnz-m294>

SEZNAM OBRÁZKŮ

| | |
|---|----|
| <i>Obr. 1: Schéma vývoje jednotlivých experimentů.</i> | 14 |
| <i>Obr. 2: Schéma přípravy provozního zákysu.</i> | 15 |
| <i>Obr. 3: Celková koncentrace biogenních aminů [mg/kg] ve vzorcích modelových sýrů s různými kmeny <i>Lacticaseibacillus casei</i> a <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> během 168denního skladování (Exp I)..</i> | 24 |
| <i>Obr. 4: Celková koncentrace biogenních aminů [mg/kg] ve vzorcích modelových sýrů s různými kmeny <i>Lacticaseibacillus casei</i> a <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> během 168denního skladování (Exp II)..</i> | 27 |
| <i>Obr. 5: Celková koncentrace biogenních aminů [mg/kg] v modelových vzorcích sýrů s různými obalovými materiály během 168denního zrání (Exp III).</i> | 31 |
| <i>Obr. 6: Celkový obsah fenylethylaminu [mg] ve vzorcích modelových sýrů během 168denního skladování (Exp IV)..</i> | 34 |
| <i>Obr. 7: Celkový obsah putrescinu [mg] ve vzorcích modelových sýrů během 168denního skladování (Exp IV).</i> | 35 |
| <i>Obr. 8: Celkový obsah kadaverinu [mg] ve vzorcích modelových sýrů během 168denního skladování (Exp IV).</i> | 36 |
| <i>Obr. 9: Celkový obsah tyraminu [mg] ve vzorcích modelových sýrů během 168denního skladování (Exp IV).</i> | 37 |

8. SEZNAM ZKRATEK

| | |
|-------|--|
| AAA | automatický analyzátor aminokyselin |
| BA | biogenní aminy |
| CCDM | Česká sbírka mlékárenských mikroorganismů |
| CPM | celkový počet mikroorganismů |
| HPLC | vysokoučinná kapalinová chromatografie |
| CHYGA | Chloramphenicol Yeast Glucose Agar (půda pro stanovení plísní a kvasinek) |
| IMCU | mezinárodní mléko srážecí jednotky |
| M17 | půda pro stanovení bakterií rodu <i>Lactococcus</i> |
| MRS | De Man-Rogosa-Sharpe agar (půda pro stanovení tyčinek bakterií mléčného kvašení) |
| PCA | Plate Count Agar (půda pro stanovení celkového počtu mikroorganismů) |
| PEF | pulzní elektrické pole |
| SB | Slanetz-Bartley agar (půda pro stanovení bakterií rodu <i>Enterococcus</i>) |
| UV | ultrafialová oblast |

9. PUBLIKAČNÍ AKTIVITA AUTORA

Jimp

V. Kůrová, V., Salek, R.N., Vašina, M., Vinklárková, K., Zálešáková, L., Gál, R., Adámek, R. & Buňka, F. (2022). The effect of homogenization and addition of polysaccharides on the viscoelastic properties of processed cheese sauce. *Journal of dairy science*. Přijato k publikaci 16. 4. 2022

Adámek, R., Pachlová, V., Salek, R. N., Němečková, I., Buňka, F., & Buňková, L. (2021). Reduction of biogenic amine content in Dutch-type cheese as affected by the applied adjunct culture. *LWT*, 152, 112397.

Salek, R. N., Lorencová, E., Míšková, Z., Lazárková, Z., Pachlová, V., Adámek, R., Bezděková, K. & Buňka, F. (2020). The impact of Chios mastic gum on textural, rheological and melting properties of spread-type processed cheese during storage. *International Dairy Journal*, 104755.

Borková, L., Frydrych, I., Jakubcová, N., Adámek, R., Lišková, B., Gurská, S., Medvedíková, M., Hajdúch, M. & Urban, M. (2020). Synthesis and biological evaluation of triterpenoid thiazoles derived from betulonic acid, dihydrobetulonic acid, and ursonic acid. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 185, 111806.

Borková, L., Adámek, R., Kalina, P., Drašar, P., Džubák, P., Gurská, S., Řehulka, J., Hajdúch, M. & Šarek, J. (2017). Synthesis and cytotoxic activity of triterpenoid thiazoles derived from allobetulin, methyl betulonate, methyl oleanonate, and oleanonic acid. *ChemMedChem*, 12(5), 390-398.

JScopus

Pachlová, V., Adámek, R., Bučková, M., Pleva, P., & Moudrá, K. (2019). The effect of reduction of NaCl content on selected parameters during ripening of cheese. *Potravinarstvo Slovak Journal of Food Sciences*.

Pachlová, V., Adámek, R., Bučková, M., Pleva, P., & Moudrá, K. (2019). The Effect of Reduction of NaCl Content in Natural Cheese on the Production of Biogenic Amines during Ripening. XVI. vedecká konferencia s medzinárodnou účasťou, Piešťany, 28.-29. 3. 2019, Poster.

Konference Den s mlékem (příspěvek ve sborníku: Pachlová, V., Adámek, R. & Buňková, L. (2020). Možnosti snížení obsahu biogenních aminů v sýrech)

10. CURRICULUM VITAE

OSOBNÍ ÚDAJE

Jméno a příjmení: Richard Adámek
Datum a místo narození: 21. 3. 1994, Zlín
Trvalé bydliště: kpt. Nálepky 1225, Otrokovice 76502
Email: richard.adamek@seznam.cz

VZDĚLÁNÍ

2009-2013 **Gymnázium Otrokovice**
2013-2016 **Přírodovědecká fakulta Univerzity Palackého v Olomouci**
bakalářský program: Bioorganická chemie a chemická biologie
2016-2018 **Přírodovědecká fakulta Univerzity Palackého v Olomouci**
magisterský program: Analytická chemie
2018-doposud **Fakulta technologická, Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně**
doktorský program: Chemie a technologie potravin

ŘEŠENÉ PROJEKTY

2019-2021 NAZV, projekt č. QK1710156 v programu ZEMĚ
2018 Projekt Interní grantové agentury UTB ve Zlíně, IGA/FT/2018/003
Role přídatných a jiných funkčních látek ve výrobě potravin
(spoluřešitel)

- 2019** Projekt Interní grantové agentury UTB ve Zlíně, IGA/FT/2019/006
Posouzení vlastností a kvality potravin v závislosti na vybraných faktorech (hlavní řešitel)
- 2020** Projekt Interní grantové agentury UTB ve Zlíně, IGA/FT/2020/006
Vliv vybraných faktorů na vlastnosti a kvalitu potravin (hlavní řešitel)
- 2021** Projekt Interní grantové agentury UTB ve Zlíně, IGA/FT/2021/004
Vliv technologických trendů na kvalitu a vlastnosti vybraných potravin (hlavní řešitel)
- 2022** Projekt Interní grantové agentury UTB ve Zlíně, IGA/FT/2022/005
Technologické trendy ovlivňující kvalitu a vlastnosti vybraných potravin (spoluřešitel)

Mgr. Richard Adámek, Ph.D.

**Možnosti ovlivnění dekarboxylázové aktivity
v systému přírodního sýra**

Possibilities of influencing the decarboxylase activity in the nature cheese
system

Teze disertační práce

Vydala Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně,
nám. T. G. Masaryka 5555, 760 01 Zlín.

Náklad: vyšlo elektronicky

Sazba: autor

Publikace neprošla jazykovou ani redakční úpravou.

Rok vydání 2022

ISBN 978-80-7678-099-6