



**Mikroorganismy s dekarboxylázovou aktivitou ve
vybraných fermentovaných potravinách**
Disertační práce

Vedoucí práce:
prof. MVDr. Ing. Tomáš Komprda, CSc.

Vypracoval:
Eva Rejchrtová

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem práci: Mikroorganismy s dekarboxylázovou aktivitou ve vybraných fermentovaných potravinách vypracoval/a samostatně a veškeré použité prameny a informace uvádím v seznamu použité literatury. Souhlasím, aby moje práce byla zveřejněna v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách ve znění pozdějších předpisů a v souladu s platnou *Směrnicí o zveřejňování vysokoškolských závěrečných prací*.

Jsem si vědom/a, že se na moji práci vztahuje zákon č. 121/2000 Sb., autorský zákon, a že Mendelova univerzita v Brně má právo na uzavření licenční smlouvy a užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona.

Dále se zavazuji, že před sepsáním licenční smlouvy o využití díla jinou osobou (subjektem) si vyžádám písemné stanovisko univerzity, že předmětná licenční smlouva není v rozporu s oprávněnými zájmy univerzity, a zavazuji se uhradit případný příspěvek na úhradu nákladů spojených se vznikem díla, a to až do jejich skutečné výše.

V Brně dne: 18. října 2015

.....
podpis

Děkuji prof. MVDr. Ing. Tomášovi Komprdovi, CSc. za vstřícný přístup, cenné rady a metodické vedení při řešení disertační práce. Děkuji všem spolupracovníkům, kteří se zapojili do rozsáhlého projektu s olomouckými tvarůžky.

Poděkování patří také Interní grantové agentuře AF Mendelovy univerzity v Brně za financování projektu. „Zpracovaná disertační práce byla finančně podpořena z prostředků specifického vysokoškolského výzkumu prostřednictvím projektu IGA AF č. IP(TP)10/2010 a č. IP 6/2011“.

ABSTRAKT

Disertační práce se zabývá mikroorganismy s dekarboxylázovou aktivitou v sýrech zrajících pod mazem (olomouckými tvarůžky) a stanovením biogenních aminů (BA).

Cílem práce bylo stanovení vlivu sledovaných faktorů (doby skladování, tvaru, ročního období, skladovací teploty, výrobních fází) na mikroorganismy s dekarboxylázovou aktivitou a na množství biogenních aminů. Vzorky sýrů byly odebírány v průběhu výroby, na konci doby trvanlivosti při dvou různých skladovacích teplotách (5 °C, 20 °C) a následně po 66 dnech skladování při dvou různých teplotách (5 °C, 20 °C).

U sýrů zrajících pod mazem byl prokázán nárůst sledovaných mikroorganismů během skladování, mezi 40. až 50. dnem skladování docházelo však k postupnému poklesu. Po 66 dnech skladování sýrů zrajících pod mazem při různé teplotě bylo statisticky prokázáno, že sledované mikroorganismy byly ovlivněny teplotou skladování.

Vliv tvaru výrobku (tyčinky vs. Kolečka) nebyl prokázán ($P > 0,05$) u počtu enterokoků, *Brevibacterium linens* a *E. coli*, u zbývajících mikroorganismů (kvasinky a plísně, celkový počet mikroorganismů a bakterie mléčného kvašení) se hodnoty průkazně lišily. V případě tvarů tyčinek dosahovaly počty mikroorganismů vyšších hodnot. Ani u jednoho ze sledovaných mikroorganismů nebyl statisticky prokázán vliv umístění zracích vozíků v sušárně.

Obsah tyraminu v sýru během výroby a skladování rostl. Průměrná hodnota obsahu tyraminu na konci výroby (11. den) byla $380 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, na konci expirace (po 42 dnech od zahájení výroby) však dosahovala již $900 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$. Na rozdíl od histaminu, jehož obsah se během celého experimentu významně neměnil.

Vliv teploty skladování byl prokázán ($P < 0,05$) u všech sledovaných BA kromě histaminu, kde po 66 dnech skladování ode dne výroby nebyl statisticky průkazný rozdíl ($P > 0,05$). Hodnota sumy BA dosažená na konci doby trvanlivosti byla $4139 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$. Teplota skladování a stáří vzorku tvořily nejvíce zastoupenou část z vysvětlené variability u sýru zrajícího pod mazem ze všech sledovaných faktorů.

Klíčová slova: biogenní aminy, zrající sýry, bakterie mléčného kvašení, bakterie rodu *Enterococcus*

ABSTRACT

Dissertation thesis deals with the decarboxylase activity of microorganisms and the determination of biogenic amines (BA) in smear ripened cheeses (called „Olomoucké tvarůžky“). The aim of the study was to find out the influence of these factors (storage periods, shape, season, storage temperature, production phases) on the microorganisms with decarboxylase activity and the amount of biogenic amines. Cheese samples were collected during the production, and also at the end of the expiration period at two different storage temperatures (5 °C, 20 °C) followed by 66 days of storage at two different temperatures (5 °C, 20 °C). For smear ripened cheeses, an increase was proved in the monitored microorganisms during the storage but a gradual decrease was detected between 40th and 50th day of storage. After 66 days of storage of smear ripened cheeses at different temperatures. Storage temperature significantly affected ($P < 0,05$) counts of the tested mikroorganisms. The influence of the product shape was not proved ($P > 0.05$) regarding counts of enterococci, *Brevibacterium linens* and *E. coli*, in the remaining microorganisms (yeasts and molds, the total number of microorganisms, lactic acid bacteria), the values differed significantly ($P > 0.05$). In the case of shape of bars, the microorganisms reached higher values. The influence of the location of ripening trucks in the dryer was not statistically proved in the monitored microorganisms ($P > 0.05$). Tyramine content increased during the production and storage. The average value of tyramine content reached $380 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ at the end of production (11th day), while at the end of expiration (42 days after the start of production) was up to $900 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$. Histamine, content was not significantly changed during the experiment ($P > 0.05$). The influence of storage temperature was established ($P < 0.05$) in all studied BA except histamine. Sum of BA, reached $4139 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ at the end of the shelf life. From all monitored factors storage temperature and age of the cheese accounted for the most of the explained variability in smear ripened cheeses.

Keywords: biogenic amines, ripened cheeses, lactic acid bacteria, bacteria of the genus *Enterococcus*

OBSAH:

1	ÚVOD	9
2	CÍL PRÁCE	10
3	LITERÁRNÍ PŘEHLED	11
3.1	Mléko	11
3.1.1	Mikrobiologie mléka a mléčných produktů	12
3.2	Mléčné produkty	15
2.2.1	Průmyslový tvaroh	15
3.2.2	Sýry	16
3.2.2.1	<i>Sýry zrající pod mazem</i>	17
3.2.2.1.1	<i>Olomoucké tvarůžky</i>	17
3.2.2.1.1.1	<i>Vady kyselých sýrů (olomouckých tvarůžků)</i>	21
3.3	Biogenní aminy (BA)	21
3.3.1	Výskyt biogenních aminů v potravinách	25
3.3.2	Legislativní požadavky na limity BA	27
3.3.3	Možnosti stanovení BA	27
3.4	Mikroorganismy s dekarboxylázovou aktivitou	28
3.4.1	Bakterie mléčného kvašení (LAB)	28
3.4.2	Rod <i>Enterococcus</i>	29
4	MATERIÁL A METODY	32
4.1	Materiál	30
4.1.2	Sýry zrající pod mazem	30
4.2	Metody	32
4.2.1	Mikrobiologické rozborů	32
4.2.1.1	<i>Stanovení <i>Brevibacterium linenes</i> kultivačním médiem MI7 (Noack, Rakousko)</i>	32
4.2.1.2	<i>Stanovení celkového počtu mikroorganismů podle normy ČSN ISO 2293</i>	33
4.2.1.3	<i>Stanovení celkového počtu bakterií mléčného kvašení (BMK) podle normy ČSN ISO 13721</i>	34

4.2.1.4	<i>Stanovení bakterií rodu Enterococcus</i>	35
4.2.1.5	<i>Stanovení plísní a kvasinek</i>	36
4.2.1.6	<i>Stanovení E. coli</i>	36
4.2.2	Testování tyrosindekarboxylázové a histidindekarboxylázové aktivity u izolovaných BMK, enterokoků a <i>Brevibacterium linenes</i> v dekarboxylačním médiu (DCM)	37
4.2.3	Konfirmace schopnosti izolátů BMK, enterokoků a startovacích kultur produkovat tyramin a histamin v DCM metodou HPLC	39
4.2.4	Rodová a druhová identifikace enterokoků pozitivních v dekarboxylačním médiu	39
4.2.4.1	<i>EN-COCCUStest</i>	39
4.2.5	Stanovení biogenních aminů/polyaminů	40
4.2.6	Detekce genů kódujících bakteriální dekarboxylázy	41
4.2.7	Pomocné analýzy	42
5	VÝSLEDKY A DISKUSE	43
5.1	Vliv testovaných faktorů na počty mikroorganismů (MO)	43
5.1.1	Stáří vzorku (včetně doby skladování)	43
5.1.2	Výrobní fáze sledovaného produktu	46
5.1.3	Teploty při skladování sledovaného produktu	53
5.1.4	Tvar výrobku	55
5.1.5	Roční období	56
5.1.6	Umístění stojanu v sušárně	57
5.2	Vliv sledovaných faktorů na množství biogenních aminů (BA)	58
5.2.1	Stáří vzorku	58
5.2.2	Teplota při skladování	59
5.2.3	Tvar výrobku	63
5.2.4	Roční období	64
5.2.5	Souhrnné srovnání všech testovaných faktorů	66

5.3	Screening dekarboxylázové aktivity, detekce genů pro tyrosindekarboxylázu a histidindekarboxylázu	67
5.4	Stanovení pomocných ukazatelů (pH, sušina, NaCl)	72
6.	ZÁVĚR	75
7.	SEZNAM LITERATURY	77
	SEZNAM TABULEK	85
	SEZNAM OBRÁZKŮ	86

1 ÚVOD

Za biogenní aminy (BA) považujeme nízkomolekulární bazické dusíkaté látky, které vznikají nejen v potravinách a potravinových surovinách nejčastěji dekarboxylací aminokyselin působením bakteriálních dekarboxylačních enzymů (Komprda, 2004).

Stanovení hodnoty biogenních aminů v potravinách je důležité pro vyhodnocení možného rizika alimentární intoxikace při příjmu velkého množství potravin s vysokým obsahem BA. Vysoký obsah BA může způsobit závažná onemocnění (zvýšení krevního tlaku, bolesti hlavy, krvácení do mozku aj.).

Stanovit toxikologický limit je obtížné, protože obsah biogenních aminů v potravinách ovlivňuje spousta vnitřních i vnějších faktorů (pH, teplota a doba skladování, obsah solí aj.). Je důležité sledovat počty mikroorganismů vyznačující se dekarboxylázovou aktivitou a také množství BA obsažených v potravine, ale zároveň i vliv vnitřních i vnějších faktorů, které mohou do značné míry ovlivnit množství BA v potravine.

U fermentovaných potravin jsou BA jejich pravidelnou a hlavně přirozenou součástí, jejich vysoký obsah v potravinách je však nežádoucí, a proto se snažíme vysokému obsahu BA v potravinách předcházet např. použitím mikrobiálních kultur bez dekarboxylačních enzymů, úpravou doby skladování, pH atd.

2 CÍL PRÁCE

Cílem práce bylo stanovit u vzorků sýrů zrajících pod mazem počty mikroorganismů (MO) se zaměřením na mikroorganismy vyznačující se dekarboxylázovou aktivitou (*Enterococcus* a bakterie mléčného kvašení) a zjistit vliv vybraných faktorů (doby skladování, tvaru výrobku, ročního období, skladovací teploty, výrobních fází) na obsah MO ve vzorku.

Dále bylo cílem stanovení množství biogenních aminů (BA) a zjištění vlivu sledovaných faktorů (doby skladování, tvaru výrobku, ročního období, skladovací teploty, výrobních fází) na obsah BA ve vzorcích.

Díličními cíli bylo stanovení dekarboxylázové aktivity u vybraných izolátů bakterií rodu *Enterococcus* a LAB (bakterií mléčného kvašení).

3 LITERÁRNÍ PŘEHLED

3.1 Mléko

Mléko je produkt mléčných žláz samic savců v období laktace. Základním úkolem mléka je zdroj výživy mláďat v prvních dnech laktace, v tomto případě mluvíme o tzv. mlezivu či kolostru. Tento druh mléka je produkován prvních pár dní po porodu mláďate, obsahuje protilátky a vitaminy potřebné pro získání potřebné imunity (tzv. pasivní imunita). Toto mléko není vhodné pro použití v potravinářství, patří mezi mléka tzv. nezralá. V potravinářství se používají mléka patřící do skupiny tzv. mlék zralých, nejčastěji bývá využíváno mléko kravské (tab.1).

Tab.1 Přibližné složení mléka (WALSTRA, 2006)

Složka	Průměrný obsah v mléce (% w/w)	Rozsah ^a (% w/w)	Průměrný obsah v sušině (% w/w)
Voda	87,1	85,3 – 88,7	-
Sušina bez tuku	8,9	7,9 – 10,0	-
Tuk v sušině	31	22 – 38	-
Laktóza	4,6	3,8 – 5,3	36
Tuk	4	2,5 – 5,5	31
Protein ^b	3,3	2,3 – 4,4	25
Kasein	2,6	1,7 – 3,5	20
Minerální látky	0,7	0,57 – 0,83	5,4
Organické kyseliny	0,17	0,12 – 0,21	1,3
Různé	0,15	-	1,2

Poznámka: Typické pro mléka nížinných plemen

a) Tyto hodnoty jsou zřídka překročeny, např. v 1 až 2 % vzorků oddělených dojením zdravých krav s výjimkou mléka a mleziva získaného krátce před porodem.

b) Nebílkovinné dusíkaté sloučeniny nejsou součástí dodávky.

Požadavky na mléko, mléčné výrobky, mražené krémy, jedlé tuky a oleje jsou stanoveny ve vyhlášce Ministerstva zemědělství 77/2003 Sb. a v zákonu č.110/1997 Sb., o potravinách a tabákových výrobcích a o změně a doplnění některých souvisejících zákonů, ve znění zákona č.119/2000 Sb. a zákona č. 146/2002 Sb., a v souladu s právem Evropských společenství, pro mléko a mléčné výrobky, mražené krémy a jedlé tuky a oleje. Mléčné výrobky jsou členěny na druhy, skupiny a podskupiny

3.1.1 Mikrobiologie mléka a mléčných produktů

Mléko a mléčné výrobky představují vhodné prostředí pro růst mikroorganismů, které svou metabolickou činností mohou ovlivnit negativně, ale i pozitivně biologickou hodnotu výrobku (Griger a Holec, 1990). Mikroorganismy obsažené v mléce mohou způsobit různé změny, jež jsou závislé především na druhu mikroorganismu a také na složce mléka, kterou konkrétní mikroorganismy rozkládají.

Mléko od zdravých dojnic obsahuje malý počet mikroorganismů (10^1 - 10^3 v 1 ml). Po nadojení dochází k výrazným změnám v původním složení mikroorganismů, a to zejména v důsledku kontaminace různého původu (ovzduší, dojíací zařízení, vemen, ruce pracovníků, voda, hmyz apod.)

Pro mikrobiologické hodnocení mléka se nejčastěji využívají jako ukazatele: celkové počty mezofilních mikroorganismů, počet psychrotrofních mikroorganismů, počet koliformních bakterií a počty enterokoku, kvasinek a plísní či počty sporulujících bakterií (Havlová a kol. 1993). Celkovou hygienu získávání mléka charakterizuje hodnota celkového počtu mikroorganismů (CPM), jedná se o indikátor znečištění z hlediska manipulace s mlékem, nedodržení hygieny či porušení řetězce chlazení. Za limitní hodnotu se považuje 100 000 KTJ/1 ml mléka. Tento údaj nám ovšem nesdělí nic o výskytu případných patogenních mikroorganismů v mléce. Jeden s patogenů, který se může vyskytovat v tepelně neošetřeném mléku, je *Listeria monocytogenes*, ten se tepelným záhřevem inaktivuje. Mléko nebo jiné mlékárenské výrobky mohou být následně sekundárně kontaminovány *L. monocytogenes*, a to nejčastěji při nedodržení sanitárního řádu a při selhání kontroly výroby za pomoci HACCP (Šviráková a kol. 2008).

Mikroorganismy obsažené v mléce mohou vyvolávat různé změny, které závisí na druhu mikroorganismu a složce mléka, na kterou působí. Mléko určené pro potravinářský průmysl musí být tepelně opracováno. Mezi nejčastější změny, které mohou vyvolat mikroorganismy v mléce patří změny vzniklé fermentační činností, proteolýzou, lipolýzou, tvorbou alkalické reakce mléka, změny barvy, aj. (Cempírková a kol.1993).

Proteolýzu mohou způsobovat zejména bakterie rodu *Micrococcus*, *Streptococcus faecalis*, některé druhy rodu *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Alcaligenes*, *Clostridium*, *Flavobacterium*.

Sladovou a karamelovou chuť způsobují mikrokoky a *Bacillus subtilis*, hořkou chuť *Pseudomonas fluorescens*, *Streptococcus liquefaciens*, mikrokoky, *Mucor*, *Penicillium*, kovovou příchutí *Lactococcus lactis*, *Leuconostoc* – při nízkých teplotách. Rybí pachutí bývá vyvolána *Pseudomonas ichtiosmia*.

Barevné změny, např. modránání mléka způsobuje *Pseudomonas cyanogenes*, žloutnutí mléka, fluorescence - *Pseudomonas fluorescens*, červené skvrny způsobuje *Serratia marcescens*.

Srážení mléka a tvorbu plynu způsobuje *E. coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Clostridium butyricum* a kvasinky rodu *Candida*. Žluknutí mléka způsobují lipolytické mikroorganismy *Pseudomonas*, *Proteus*, *Alcaligenes*, *Bacillus*, *Micrococcus*, *Clostridium*, plísňe a kvasinky (Gorner a Valík, 2004).

V případě biogenních aminů včetně tyraminu nebývá výskyt v čerstvém mléce a nefermentovaných mléčných výrobcích vysoký méně jak 1 mg/kg (Greifová a kol., 2003). U sýrů může být naopak množství biogenních aminů, především tyraminu a histaminu vysoké (Kalač a kol., 2005; Komprda a kol., 2007).

Mikroorganismy vyskytující se v mléce patří mezi neopomenutelnou složku, mají negativní, ale i pozitivní význam. Mluvíme-li o negativním významu, jedná se především o mikroorganismy syrového mléka a to jak o patogenní, tak technologicky škodlivé, jde-li o pozitivní význam mikroorganismů jedná se především o využití ušlechtilých mikroorganismů, tzv. mlékařských kultur.

I když se pasterací v mléce ničí všechny vegetativní formy mikroorganismů, nezničí se část sporogenní mikroflóry, která má schopnost přežít nepříznivé tepelné vlivy a působí negativně při výrobním procesu. Do takto upravené suroviny se pak zavádějí v další části výrobního procesu tzv. užitečné mikroorganismy ve formě čistých

mlékařských kultur. Jejich úkolem je vyvolat v mléce, vlastně v celém dalším výrobním procesu fermentaci, nutnou k výrobě másla, sýrů a ostatních výrobků, nebo zajistit těmto výrobkům potřebný ochranný účinek látkami, které vznikají při výrobním procesu pomocí mikroorganismů.

Definice čistých mlékařských kultur: Jedná se o klíčové výrobní prostředky, kterými se do suroviny (mléka, smetany, syrovátky), zbavené všech patogenních i pokud možno nežádoucích a technologicky škodlivých mikroorganismů vůbec, zavádějí vybrané účelově zaměřené druhy specifických mikroorganismů, aby byl jimi vyvolán a zajištěn správný průběh výrobního procesu a dosaženo žádoucí jakosti výsledného výrobku (Teplý, 1960). U nás se začaly čisté mlékařské kultury používat v posledních letech 19. stol.

Funkce kultur ve výrobě jednotlivých druhů mléčných výrobků je různá. V zásadě však lze rozdělit funkci čistých mlékařských kultur do několika skupin podle základního účelu, ke kterému ve výrobě slouží:

- a) kysací funkce
- b) zrání
- c) dieteticko - léčebná funkce

Kysací funkce čistých mlékařských kultur spočívá v tvorbě kyseliny mléčné, čímž vzniká kyselé prostředí. Pro prokysávací činnost se používají např. *Streptococcus cremoris*, *Str. lactis*.

Zrání mléčných výrobků záleží jednak na působení čistých mlékařských kultur, jednak na chemických změnách a také změna koloidního stavu. Průběh zrání výrobku je posouzen jejich chutí, vůní, konzistencí a vzhledem.

Dieteticko- léčebná funkce mléka spočívá v tom, že mléko jako potravina působí proti civilizačním chorobám a vlivům pracovního prostředí. Pokud se jedná o výživovou stránku mléčných výrobků vyráběných za použití čistých mlékařských kultur, jde o přeměnu bílkovin mléka ve stravitelnější formy a o tvorbu vitamínů, zvláště vitamínů skupiny B.

Mikroorganismy čistých mlékařských kultur tvoří bakterie, kvasinky a plísně. Růst mikroorganismů je podmíněn přísunem živin, přístupem vzduchu, chemickým i fyzikálním prostředím, vhodnou teplotou, potřebným stupněm vlhkosti.

Typy čistých mlékařských kultur:

- kultura základní
- kultura jogurtová
- kultura acidofilní
- kultura kefirová
- kultura sýrařské – doplňkové kultury sýrařské – kultura propionová
- kultura mazová

Mlékárenské startovací kultury můžeme rozdělit dále na dva typy homofermentativní a heterofermentativní. V případě homofermentativního kvašení dochází buď k tvorbě kyseliny mléčné (př. *Lactococcus lactis sp. lactis*), nebo k tvorbě kys. mléčné a dalších chuťových látek (př. *Lactobacillus delbruecki spp.bulgaricus*). Zatímco u heterofermentativního kvašení dochází k tvorbě kys. mléčné a octové (př. *Leuconostoc mesenteroides sp. cremoris*).

3.2 Mléčné produkty

Za mléčný výrobek považujeme potravinu vyrobenou zpracováním mléka.

2.2.1 Průmyslový tvaroh

Průmyslový tvaroh je hlavní surovinou pro výrobu olomouckých tvarůžků. Vyrábí se z šetrně pasterovaného odtučněného mléka pomocí kyselého srážení, a to výhradně za pomoci MO (smetanová kultura, termofilní zákys) bez účasti syřidel. Po dosažení hodnoty 110 -120 SH se koagulát vychladí, aby nedocházelo k dalšímu rozkladu laktózy. Po vylisování syrovátky se hmota pomele a udusá do polyethylenových pytlů a posype kuchyňskou solí (Lukášová a kol., 2001).

3.2.2 Sýry

Sýry jsou plnohodnotnou potravinou. Obsahují všechny podstatné složky mléka při sníženém obsahu vody, přičemž bílkoviny získávají v průběhu zpracování chuť a stravitelnost. Sýrem rozumíme mléčný výrobek vyrobený vysrážením mléčné bílkoviny z mléka působením syřidla nebo jiným vhodným koagulačním činidlem, prokysáváním a oddělením podílu syrovátky.

Existuje mnoho druhů sýrů. Jejich základní rozdělení vyplývá z vyhlášky 77/2003 Sb., kterou se stanoví požadavky pro mléko a mléčné výrobky, mražené krémy a jedlé tuky a oleje. Základní rozdělení sýrů je na přírodní, tavené a syrovátkové. Přírodní se dále dělí na podskupiny: nezrající terminované, zrající, zrající pod mazem, zrající v celé hmotě, s plísní na povrchu, s plísní uvnitř hmoty, dvouplísňové, v solném nálevu a jako poslední podskupina jsou uvedeny sýry podle konzistence ve vztahu k vodě a tuku prosté sušiny na extra tvrdé, tvrdé, polotvrdé poloměkké a měkké. Další klasifikace přírodních sýrů bývá podle obsahu tuku v sušině (vysokotučné, plnotučné, polotučné, atd.) nebo podle technologických znaků, druhů mléka, typu zrání.

Během zrání sýrů běží tři hlavní biochemické procesy glykolýza, lipolýza a proteolýza, které se podílejí na finální struktuře chuti a vůně. Podmínkou vzniku toxického množství BA v sýrech je proteolýza, která je při zrání sýrů považována za jeden z nejdůležitějších pochodů ovlivňujících kvalitu sýrů (Černý a kol., 2009). Na proteolýze se podílejí nativní proteázy z mléka, proteázy kyselých kultur, enzymy ze syřidel, proteázy kontaminující mikroflóry a hlavně bakterie startovacích kultur (Greif a kol., 2006).

Významnou fází výroby sýrů jejich zrání. Téměř všechny mladé sýry mají velmi podobné složení bílkovin, tuku a cukrů. Jejich typické sensorické vlastnosti vznikají až při fermentaci. Nejdůležitější částí zrání sýrů je fermentace bílkovin. U mladých sýrů se uskutečňuje působením proteolytických enzymů bakterií mléčného kvašení použitých při jejich výrobě.

Chuť sýrů také významně ovlivňují aminokyseliny. Při hlubokém zrání jsou aminokyseliny dále metabolizované, což je významné především u sýrů zrajících pod mazem, na tvorbě aromatu se zde podílí především *Brevibacterium linens*.

Při zrání sýrů jsou přeměňovány samozřejmě i ostatní důležité látky jako je mléčný tuk, dochází ke změnám popelovin a změnám obsahu vody. V průběhu zrání se

vlivem vysušování mění a_w a spolu s ní se mění i fyzikální, chemické a mikrobiologické parametry sýrů (Gorner a Valík, 2004).

Startovací bakterie a non-startovací mléčné bakterií přispívají k vzhledu, aromatu a vývoji sýrů. Důležité je zachovat vysokou úroveň hygieny a porozumět požadavkům typického povrchu flóry (Guarcello a kol., 2005). Výsledky studie Buňková 2013 ukazuje, že BA a PA se vyskytují v sýrech zcela běžně, a to může představovat vážné riziko pro naše zdraví.

Z výživového hlediska sýr obsahuje všechny nezbytné aminokyseliny (AMK), zvláště lysin, který v rostlinných bílkovinách chybí. Tuk v sýru je bohatý na vitaminy A, E. Sýr se vyznačuje vysokým obsahem minerálních látek především Ca také velkým množstvím stopových prvků (Šustová, 2008).

3.2.2.1 Sýry zrající pod mazem

I pro výrobu sýrů se používají startovací kultury, které hrají důležitou roli při rozvoji typické chuti a vůně a dávají unikátní vlastnosti určitému druhu sýra či jiným mléčným produktům. Povrch nátěru zrajících sýrů, jako je Tilsit, Limburg, Romadur, Chaumes a kyselých tvarohových sýrů je pokryt vrstvou kvasinek a bakterií (Eliskases-Lechner a kol., 1995; Bockelmann, 2002; Brennan a kol., 2002).

Růst kvasinek je důležitý pro většinu sýrů zrajících pod mazem (Guarcello a kol., 2005). *Debaryomyces hansenii* je nezbytné pro odkyselení, a tím i pro rozvoj nátěru bakterie (Bockelmann, 2002). *Kluyveromyces marxianus* a *Candida krusei* přispívají k textuře a vývoji vůně u kyselých tvarohových sýrů (Bockelmann a kol., 2002). Také *Geotricum candidum* přítomné na povrchu měkkých sýrů je důležité pro jejich vzhled a správný rozvoj chuti (Spinnler a kol., 2001; Bockelmann a kol., 2003). Sýry s mazem na povrchu potřebují přiměřenou vlhkost, aby byl podporován rychlý rozvoj mikroflóry a vytvoření mazu (Šustová, 2008)





3.2.2.1.1 Olomoucké tvarůžky

První písemná zmínka se objevila v soupisu pozůstalosti z Olomouce z roku 1583, zde se poprvé objevuje pojmenování tvarůžky, až později došlo k rozšíření názvu na olomoucké tvarůžky. Proslavily se na výstavě ve Vídni v roce 1872. Evropská

komise přijala nařízení o zápisu do CHZO (Chráněné zeměpisné označení) dne 4. srpna 2010 Olomoucké tvarůžky (Beránková, 2010). Právě olomoucké tvarůžky dnes úspěšně vyrábí jediná společnost A. W. spol. s.r.o v Lošticích od roku 1867.

Tvarůžky tvoří samostatné odvětví sýrů zrajících pod mazem vyrobený jedná se skupinu kyselých sýrů vyráběných z průmyslového tvarohu (Cempírková a kol., 1997). Olomoucké tvarůžky jsou odtučněný měkký sýr zrající pod mazem, vyrobeny z netučného kyselého tvarohu. Vyznačují se ojedinělou chutí, typickou vůní a zlatožlutým mazovým povrchem, způsobeným mazovými bakteriemi (*Brevibacterium linens* a kvasinkami). Vyrábějí se z nesýřeného kyselého tvarohu, který je charakteristický svou drobivou strukturou a vysokou kyselostí. Při výrobě se tvaroh drtí, promíchává s NaCl a nechává se odležet v zásobnících. Smícháním tvarohové hmoty se zracími komponenty (ušlechtilými mlékárenskými kulturami a regulátory kyselosti) a jejím následným mletím se připraví jemná tvarohová směs pro formování. Formovací směs se vytvaruje do požadovaného tvaru. Vzniklé polotovary se ukládají na podložky, které se přemístí do zracích místností. Po prozrání proběhne tzv. omytí tvarůžků a vytvoří se vhodné podmínky pro další stupeň zrání. Dochází k rozmnožení aerobní proteolytické mikroflóry, jejíž enzymatickou činností dochází ke vzniku zlatožlutého mazu tak typického pro olomoucké tvarůžky (A.W. spol. s.r.o Loštice).

Tab. 2 Charakteristika tvarůžku během doby data minimální trvanlivosti (<http://www.tvaruzky.cz/O-tvaruzkach.aspx>)

Stupeň zralosti	Zbývá do konce DMT (data minimální trvanlivosti) vyznačeného na obale			
	4 týdny (28 dnů)	3 týdny (21 dnů)	2 týdny (14 dnů)	1 týden (4 dnů)
Tvar	bez deformace	bez deformace	mírně deformovaný	středně deformovaný
Barva povrchu	zlatožlutá	zlatožlutá	zlatožlutá až oranžová	oranžovožlutá až hnědooranžová
Průřez lomu	nažloutlá zlatá vrstva s výrazným bílým tvarohovým jádrem	nažloutlá zralá vrstva s patrným tvarohovým jádrem	Zlatožlutá zralá vrstva s nažloutlým jádrem	Zlatožlutá barva v celém průřezu a povrchu
Pružnost omakem	pevná	mírně pružná	pružná	pružná až měkkí
Chuť	tvarohová	mírně charakteristická	středně charakteristická až pikantní	charakteristická až pikantní
Vůně	tvarohová až jemně charakteristická	jemně charakteristická, tvarohová	středně charakteristická	charakteristická
				

***Brevibacterium linens* (řád Actinomycetales, čeleď Brevibacteriaceae)**

Tyto proteolytické bakterie se vyznačují tvorbou oranžovo-červeného barviva. Jedná se o aerobní gram-pozitivní tyčinky rostoucí v širokém rozmezí teplot (7 - 32°C) a pH 6 až 9. Vyznačují se dobrou tolerancí na vyšší obsah soli, mohou dobře růst i v medium obsahující až 15% soli. Používají se při výrobě sýrů zrajících pod mazem (romadúr, tvarůžky..). Katabolická aktivita této bakterie při aerobním zrání je zodpovědná za tvorbu chuti. Je součástí mazové kultury při výrobě olomouckých

tvářůžků, kde roste v počátku v koloniích po omytí se tzv. roztírají po celém povrchu. Vhodné prostředí pro jejich růst je neutrální pH. Na začátku zrání se hodnota pH pohybuje okolo 5, zvýšení pH a dosažení vhodných podmínek pro *Brevibacterie* zajistí kvasinky. Deaminují aminokyseliny uvolněné z bílkovin na příslušné ketokyseliny a uvolňují amoniak, který vniká do hmoty sýra a snižuje jejich kyselost.



Obr. 1 *Brevibacterium linens*

<https://www.google.cz/search?q=obr%C3%A1zek+brevibacterium&biw=1920&bih=936&tbn=isch&tbo=u&source=univ&sa=X&ved=0CCEQsARqFQoTCMXn5OrExMcCFURYFAodhmQF-A&dpr=1#imgsrc=OBR6Lg16SckHiM%3A>

Kvasinky

Kvasinky jsou heterotrofní eukaryotní mikroorganismy. Český název dostal z schopnosti většiny druhů zkvašovat monosacharidy a některé disacharidy, případně trisacharidy na etanol a oxid uhličitý (Šilhánková, 2008). Kvasinky patří mezi další MO, které nacházejí své uplatnění při výrobě sýrů zrajících pod mazem a sýrů s plísní na povrchu zrajících jsou součástí mazové kultury při výrobě olomouckých tvářůžků. Kvasinky zahajují aerobní fázi zrání a v krátkém čase jejich počty dosahují až 10^8 - 10^9 /g. Po čase jejich počty klesají a následně se rozvíjí bakteriální složka mazové kultury nebo plísně. Nejvýznamnějšími kvasinkami z pohledu zrání sýrů jsou *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces marxianus*, *Debaryomyces hansenii*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Geotrichum candidum*, *Cryprococcus catenulata* a *Yarovia lipolytica*.

Kvasinky asimilují laktáty, tvoří alkalické metabolity (NH_3), produkují potřebné růstové faktory pro bakterie, působí lipolyticky a proteolyticky a různými metabolity přispívají k tvorbě aromatu těchto sýrů (Gorner a Valík, 2004). Kvasinky proto nejsou

jen doprovodnou mikroflórou zrání těchto sýrů, ale působí i jako kulturní mikroorganismy potřebné při jejich zrání a tvorbě aromatu společně s *Brevibacterium linens* a to hlavně na počátku zrání.

3.2.2.1.1 Vady kyselých sýrů (olomouckých tvarůžků)

Předčasné roztékání – je způsobeno některými MO s vysokou proteolytickou aktivitou (*Bacillus cereus* nebo oospory).

Bílá mazovitost – projevuje se bílým až šedobílým mazem na povrchu (*Oospora lactis*). Tvarůžky tvrdnou neprozrávají a zapáchají.

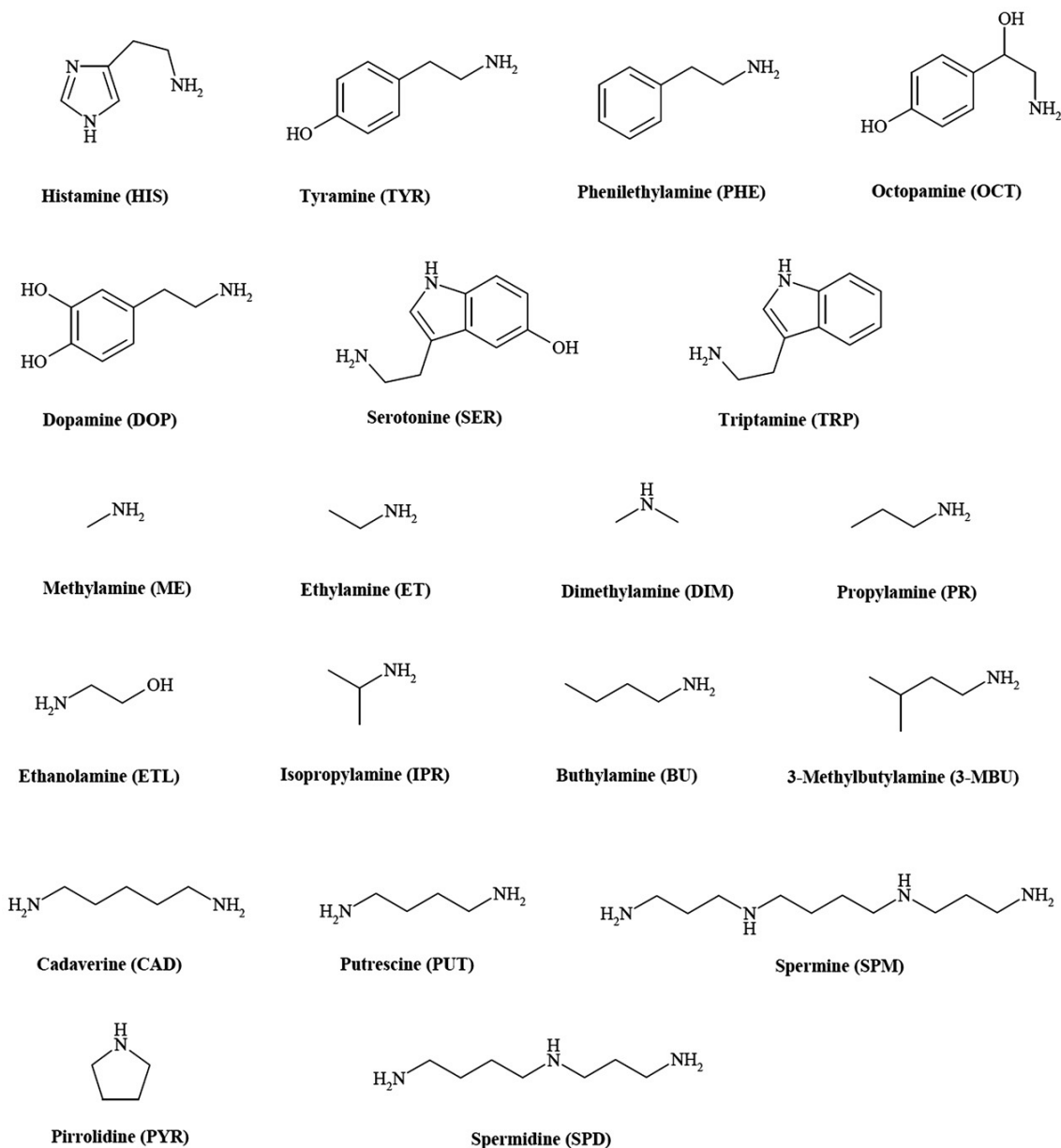
Hořknutí – vyvolávají ho mikroorganismy rozkládající bílkoviny.

Černání – je způsobeno vyšším obsahem železa a mědi u průmyslového tvarohu.

(Lukášová a kol., 2000; Cempírková a kol., 2007)

3.3 Biogenní aminy (BA)

Název biogenní aminy (BA) byl poprvé navržen a použit Guggenheimem v roce 1920, který tak označil skupinu látek zásaditého charakteru přirozeně se vyskytujících v přírodě a majících zvláštní vlastnosti. Dnes za biogenní aminy považujeme nízkomolekulární bazické dusíkaté látky, které vznikají nejen v potravinách a potravinových surovinách nejčastěji dekarboxylací aminokyselin, působením bakteriálních dekarboxylačních enzymů, aminací nebo transaminací aldehydů a ketonů. (Komprda, 2004). Mezi BA řadíme dnes asi 40 sloučenin, z nichž nejznámější jsou: histamin, tyramin, dopamin, putrescin, kadaverin a jiné (Greif a kol.).



Obr. 2 Chemická struktura biogenních aminů (Loizzo, 2013)

Základní podmínkou pro vznik biogenních aminů je přítomnost aminokyselin v daném substrátu, přítomnost mikroorganismů s dekarboxylázovou aktivitou a vhodné podmínky pro růst a množení mikroorganismů (Fernández a kol., 2007; Bover-Cid a kol., 2008). Mezi faktory, které ovlivňují tvorbu BA u bakterií, patří teplota, pH prostředí, aero-anaerobióza, dostupnost uhlíku (např. glukózy) aj. (Greif a kol., 2006; Gardini a kol., 2005; Bover-Cid a kol., 2008).

Mikroorganismy vykazující dekarboxylázovou aktivitu se mohou dostat do potravin spontánně, nebo by mohly být obsaženy ve startovacích kulturách přidávaných záměrně do potravin (Ladero a kol., 2012.; Silla Santos, 1996). Mezi časté producenty BA patří bakterie mléčného kvašení a řada dalších MO uvedených v tab. 3. Produkce biogenních aminů je vlastnost specifická spíše pro určité kmeny bakterií než vlastnost typická pro daný druh, takže různé kmeny téhož druhu se mohou lišit v produkci BA (Arena, Manca de Nadra , 2001; Kalač a Kříž, 2002). Biogenní aminy mohou být produkovány i kmeny BMK, které se běžně využívají pro technologické účely jako startovací kultury (Buňková a kol., 2009).

Z pohledu BA dělíme potraviny na dvě skupiny: fermentované (připravované některým z kvasných procesů) a nefermentované (Kalač a Kříž, 2002). Další dělení BA je podle chemické struktury na:

- a) **alifatické**: putrescin (PUT), kadaverin (CAD), spermidin (SPD), spermin (SPM) agmatin (AGM),
- b) **aromatické**: tyramin (TYR) a fenyletylamin (PEA)
- c) **heterocyklické**: histamin (HIS), a tryptamin (TRY)
(Komprda, 2005).

Tab. 3 Významné mikroorganismy produkující biogenní aminy (Velíšek, 2002)

Potravina	Mikroorganismy	Produkovávané aminy
Ryby	<i>Morganella morganii</i> , <i>Klebsiella pneumonia</i> , <i>Hafnia alvei</i> , <i>Proteus Vulgaris</i> , <i>Proteus krabilis</i> , <i>Clostridium perfringens</i> , <i>Enterobacter aerogenes</i> , <i>Bacillus sp.</i> , <i>Staphylococcus xylosus</i>	histamin, tyramin, kadaverin, putrescin, agmatin, spermin, spermidin
Sýry	<i>Lactobacillus buchneri</i> , <i>L. bulgaricus</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>L. arabinosae</i> , <i>Streptococcus Faecium</i> , <i>S mitis</i> , <i>Bacillus macerans</i> , <i>propionibacterium sp.</i>	histamin, kadaverin, putrescin, tyramin, tryptamin
Maso a masné výrobky	<i>Pediococcus sp.</i> , <i>Lactobacillus sp.</i> , <i>Pseudomonas sp.</i> , <i>Streptococcus sp.</i> , <i>Micrococcus sp.</i> , čeled' <i>Enterobacteriaceae</i>	histamin, tyramin, kadaverin, putrescin, fenyletylamin, tryptamin
Fermentovaná zelenina	<i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides</i> , <i>Pediococcus sp.</i>	histamin, kadaverin, putrescin, tyramin, fenyletylamin, tryptamin
Fermentované produkty ze sóji	<i>Rhizopus oligosporus</i> , <i>trichosporon beiglli</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i>	histamin, kadaverin, putrescin, tyramin, tryptamin

Některé aminy jsou potřebné pro mnoho důležitých funkcí lidí i zvířat, jsou přítomny ve všech živých organismech a jsou pro organismus nepostradatelné, ale vysoká koncentrace těchto látek může mít nežádoucí účinky. Některé BA působí jako hormony, ale mnoho BA je považováno za neurotransmitery nebo prekurzory pro syntézu hormonů, alkaloidů nebo jiných metabolitů (Halász a kol., 1994; Shalaby, 1996; Silla Santos, 1996). Putrescin a kadaverin mohou také reagovat s dusitanem za vzniku karcinogenních nitrosaminů (Askar a Treptow, 1996).

Pro negativní vliv BA na lidské zdraví je žádoucí, aby se tyto aminy v potravinách vyskytovaly v minimálním množství (Károvičová a Kohajdová, 2005). Data o histaminu a jeho intoxikaci jsou podceňována, protože nemoc je snadno zaměněna za alergické reakce (Silla Santos, 1996). U zdravých jedinců se nachází v trávicím traktu ochranný systém fungující na základě enzymů HMT (histamin-N-metyltransferáza), MAO (monoaminoxidáza) a DAO (diaminoxidáza), které jsou do jisté míry schopny redukovat množství BA. Při vysoké konzumaci potravin s vyšším

obsahem těchto látek může být detoxifikační ochrana nedostačující, zvláště u pacientů užívajících léčiva obsahují jejich inhibitory nebo u alergiků, kteří patří také do rizikové skupiny. Stanovení hodnoty biogenních aminů v potravinách je důležité pro vyhodnocení možného rizika alimentární intoxikace při příjmu velkého množství potravin s vysokým obsahem BA. Toxické dávky je však obtížné stanovit. Velmi záleží na individuálních rozdílech mezi lidmi a zastoupení jednotlivých BA v potravine, na množství potravin, které bylo zkonsumováno (Komprda, 2006).

U některých BA může jejich přítomnost u vnímavých spotřebitelů způsobit několik problémů, například nevolnost, respirační tísně, návaly horka, pocení, bušení srdce, bolest hlavy, jasně červenou vyrážku, ústní pálení, hyper- nebo hypotenzi, jejichž intenzita je závislá na kvantitativních a kvalitativních rozdílech (Stratton a kol., 1991). Vyšší množství BA může vyvolat nežádoucí psychoaktivní a vazoaktivní účinky. Histamin, tyramin a fenyletylamin může dosáhnout výše uvedených nežádoucích účinků přímo. U skupiny polyaminů a diaminu kadaverinu byly za určitých okolností pozorovány i jejich příznivé účinky jako je podpora regenerace a hojení tkáně (Bardócz a kol., 1993) Putrescin a kadaverin nevykazují přímé toxické účinky, nicméně mohou zesílit toxické účinky jiných aminů (Halász a kol., 1994; Silla a kol., 1996). Do skupiny BA označovaných jako polyaminy patří putrescin, spermin a spermidin. S chemického pohledu však putrescin řadí mezi diaminy.

Některé látky, jako je například alkohol, mohou snížit aktivitu enzymů, které se účastní degradace BA v lidských střevech (Shalaby, 1996). Vzhledem k tomu, že sýry jsou často podávány s alkoholickými nápoji, jako je pivo nebo víno, dokonce i nízké koncentrace BA v sýrech mohou způsobit nežádoucí účinky. Pivo a víno často obsahují vysoké množství BA, které by mohly zesílit negativní vliv BA v sýrech na lidské zdraví (Ancín-Azpilicueta a kol. 2008; Buňka a kol., 2012). Pokud jde o dopad BA na lidské zdraví, nejvíce nepříznivých účinků ukazuje histamin a tyramin (Shalaby, 1996).

3.3.1 Výskyt biogenních aminů v potravinách

U fermentovaných potravin jsou BA jejich pravidelnou a hlavně přirozenou součástí. U nefermentovaných potravin jejich obsah indikuje mikrobiální činnosti a jejich množství může být použito na posouzení rozkladu konkrétní potravin. Při skladování potravin může být obsah BA ukazatelem jakosti vstupní suroviny, úrovně

hygieny během výrobního procesu a skladování (Halász a kol., 1994). U živočišných materiálů se BA nejčastěji vyskytují v mase, rybách a sýrech. Sýry mohou být velmi dobrým substrátem pro produkci a kumulaci biogenních aminů, hlavně tyraminu (Greifová a kol., 2003; Roig-Sagués a kol., 2002).

V případě biogenních aminů (včetně tyraminu) nebývá v čerstvém mléce a nefermentovaných mléčných výrobcích jejich obsah vysoký, méně jak 1 mg/kg (Greifová a kol., 2003). U sýrů může být naopak množství biogenních aminů, především tyraminu a histaminu vysoké (Kalač a kol., 2005; Komprda a kol., 2007).

Mikroorganismy s významnou tyrosin-dekarboxylázovou aktivitou v sýrech jsou koliformní bakterie a enterokoky. Během procesu výroby sýrů jsou koliformní bakterie inaktivovány, ale enterokoky jsou více odolné vůči teplu a kyselinám, mohou přežít a produkovat BA v sýrech (Garg a kol., 1991; Giraffa a kol., 1997). Proteolýza, vyskytující se v průběhu zrání sýrů, může zvýšit uvolňování aminokyselin z kaseinu ty mohou být postupně dekarboxylovány bakteriálními enzymy, což vede k hromadění BA. V mnoha případech byla akumulace BA přičítána především aktivitě nestartérové mikroflóry (Spizzirri a kol., 2013).

Tab. 4 Obsah hlavních biogenních aminů u sýrů (Velíšek, 2002)

Sýry	Obsah v mg. kg ⁻¹ (nebo v mg. dm ⁻³) ^a								
	histamin	kadaverin	putrescin	spermidin	spermin	agmatin	fenyletylamin	tyramin	tryptamin
Cheddar	0-1300	4-408	1-996				0-303	1-1500	0-300
Emmental	s-2000	0-460	1-130				0-490	1-1000	0-210
Gouda	0-850	1-140	1-200				0-46	0-670	10-200
Eidam	0-88	s	s					s-320	
Roquefort	0-4100	42-905	44-830				10-25	s-1350	10-1100

^a s = stopy

Působením proteáz a peptidáz přítomných v sýru dochází k proteolýze kaseinu a tvorbě volných aminokyselin a následně BA, přičemž každý typ sýra má

charakteristický profil aminokyselin a BA, který vyplývá ze specifické degradace a syntézy (Polo a kol.,1985). Častou příčinou výskytu BA v sýrech je sekundární kontaminace mikroorganismů z přidané startovací kultury (Roig-Sagués,2002). Sýry obvykle obsahují jednotky až stovky mg/kg histaminu, tyraminu, putrescinu a kadaverinu, jednotky až desítky mg/kg 2-fenyletylamin a velmi malé množství tryptaminu (Silla-Santos, 1996). Obsahy BA však mohou výjimečně dosáhnout i gramových hodnot v 1 kg sýra, což závisí na ošetření výchozí suroviny a technologických faktorech, jako jsou teplota sýření, použití startovacích a plísňových kultur (Kalač a Křížek, 1998). Hodnoty BA ukazují, že obsah aminů se lišil v závislosti na výrobním procesu. Nejvyšších koncentrací dosahovaly tvrdé zrající sýry (Spizzirri a kol., 2013).

3.3.2 Legislativní požadavky na limity BA

Do roku 2004 byly stanoveny legislativní limity pro některé BA v rybách, sýrech, pivu a vínu ve vyhlášce MZd č. 298/1997 Sb. pro histamin 200 mg·kg⁻¹ u ryb a rybích výrobků a 20 mg·kg⁻¹ u piva a vína, u tyraminu byl stanoven přípustný režim 50, 100, 200 mg·kg⁻¹ červeného vína a u sýrů. Od roku 2005 vstoupilo v platnost Nařízení Evropské komise (ES) č. 2073/2005 podle něhož je nový hygienický limit pro histamin 100 mg·kg⁻¹ v rybách a ve výrobcích z ryb, a tento limit může být překročen u dvou z devíti vzorků (z jedné šarže) do hodnoty 200 mg·kg⁻¹. Povinnost vyznačovat obsah BA na obalu legislativa neurčuje.

3.3.3 Možnosti stanovení BA

Vzhledem k tomu, že přítomnost BA má velký vliv na kvalitu a bezpečnost potravin, byly v posledních letech vyvinuty různé metody k jejich identifikaci a kvantitativnímu stanovení. Pro stanovení BA se využívají různé chromatografické techniky, jako je chromatografie na tenké vrstvě, plynová chromatografie, kapalinová chromatografie (LC), také se používají kapilární elektroforetické metody (Spizzirri a kol.,2013)

Protože mnohé aminy a jako takové nelze přímo stanovit UV nebo fluorescenčními, většina metod LC vyžaduje, aby aminy byly před detekcí

derivatizovány (Innocente a kol., 2007; Chiacchierini a kol., 2006; Pereira a kol., 2008). Byly také použity metody LC s elektrochemickou detekcí (Favaro et al., 2007).

V poslední době byly schváleny nové LC metody pro stanovení BA v sýru, ve světle odpařovaným rozptylovým detektorem (ELSD) (Restuccia a kol., 2011). Hlavní výhodou je odstranění derivatizace. Navíc ELSD je cenově dostupnější než hmotnostní spektrometrie a je kompatibilní se širokou škálou rozpouštědel mobilních fází (Spizzirri a kol., 2013).

3.4 Mikroorganismy s dekarboxylázovou aktivitou

Mezi mléčné bakterie, které mohou produkovat dekarboxylázy a podílet se tak na jejich vzniku, patří v mléce např. druhy rodu *Enterococcus*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Photobacterium*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Schigella* a některé bakterie mléčného kvašení (*Lactobacillus*, *Pediococcus* a *Streptococcus*) nebo i probiotické a startovací kultury (Sládková a kol., 2007)

3.4.1 Bakterie mléčného kvašení (LAB)

Jedná se o skupina tvořenou 13 rody gram-positivních bakterií *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Lactosphaera*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Paralactobacillus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, *Weissella*. Svůj název získaly díky schopnosti fermentovat laktózu (a jiné sacharidy) na kyselinu mléčnou. Jsou to gram-positivní nesporulující tyčinky a koky, jsou to nepatogenní bakterie (*Pediococcus* výjimečně způsobující hnilobu). Významně se podílejí na chuti mléčných produktů a v některých případech i na prodloužení jejich trvanlivosti díky své schopnosti tvořit bakteriociny či růst při nízkém pH (do pH 3). Fermentují sacharidy na konečný produkt kyselinu mléčnou, z toho důvodu byly označeny jako bakterie mléčného kvašení (LAB). Můžeme je rozdělit do dvou skupin (homo resp. heterofermentativní) podle konečných produktů kvašení. Jsou rozšířené v přírodě, najdeme je kdekoli, kde se vyskytuje vysoká koncentrace cukrů, bílkovin a vitamínů. Nacházejí se běžně v mléce a mléčných produktech, fermentovaných potravinách, siláži, intestinálním traktu lidí a zvířat. Mnohé kmeny a druhy LAB jsou všeobecně považovány za standardní MO v potravinách. Chuť a vůně se u některých

potravin nemůže rozvíjet bez zapojení bakterií mléčného kvašení. BMK jsou komerčně využívány v potravinářském průmyslu z důvodu tvorby chuti, vůně a prodloužení trvanlivosti fermentovaných výrobků (Španová, 2009).



Obr . 3 Bakterie rodu *Enterococcus*

3.4.2 Rod *Enterococcus*

Enterokoky se běžně vyskytují v syrovém mléce a v mléčných výrobcích (Garg a Mital, 1991; Giraffa a kol, 1994). Mléko je ideálním zdrojem pro růst těchto organismů (Gardini a kol., 2001). Enterokoky mohou být přítomny ve značném množství v sýrenině a zrajících sýrech (Freitas a kol., 1996; Centeno a kol., 1996; Cogan a kol., 1997). Mnoho experimentů zjistilo také jejich přítomnost v pasterovaném a UHT mléku (Garg a Mital, 1991). V rámci klinické studie bylo prokázáno, že kmen *Enterococcus faecium* CCDM 922 má schopnost snižovat celkový cholesterol, zejména nežádoucí frakci LDL, snižovat obsah beta-D- glukuronidázy (Šalaková, 2011).

Nejčastěji bývají detekovány druhy *Enterococcus faecalis* a *Enterococcus faecium*. Tento typ bakterií odolává pasteraci, může růst při 0 – 50 °C, přežívá teplotu 60 °C po dobu 30 minut (Shattock, 1963), v přítomnosti 6,5 % soli. Jejich hlavním zdrojem je gastrointestinální trakt člověka a zvířat, proto jejich přítomnost bývá označována jako fekální znečištění. Enterokoky jsou obecně považovány za mikroorganismy s vysokou dekarboxylázovou aktivitou, zejména ve vztahu k vzniku kadaverinu a putrescinu (Suzzi a kol., 2003). Některé enterokoky se staly rezistentními na antibiotika, jako jsou vankomycin-rezistentní *Enterococci* (VRE); existuje jen velmi málo alternativních terapií pro lidi, kteří trpí infekcí VRE (Franz a kol., 1999).

U některých enterokoků byly potvrzeny probiotické účinky (Horáčková, 2009).

4 MATERIÁL A METODY

4.1 Materiál

4.1.2 Sýry zrající pod mazem

Jako materiál byly použity sýry zrající pod mazem vyráběné z průmyslového tvarohu ve dvou různých tvarech (kolečka, tyčinky). Odběry byly prováděny ve třech ročních obdobích (zima, jaro, léto). Odběr vzorků byl prováděn vždy v různých fázích výrobního procesu, při různém umístění zracích stojanů ve zracích místnostech (jeden stojan byl umístěn co nejbližší ke dveřím a druhý co nejdále ode dveří), z těchto stojanů byly vzorky odebrány vždy ze tří míst (vrchní střední a spodní část stojanu). Dále byl odběr vzorků proveden na konci doby trvanlivosti při dvou různých skladovacích teplotách (5 °C, 20 °C) a následně po 56 dnech skladování při dvou různých teplotách (5 °C, 20 °C).

➤ Kolečka – sýr zrající pod mazem

složení: tvaroh, sůl max. 5,5 %, regulátory kyselosti E170, E500

výživová hodnota: 532 kJ/ 125 kcal, bílkoviny - 29 g, tuku – 0,6 g,

sacharidy – 1 g, sušina 33%, tuk 0,6 %

rozměry koleček: průměr 45 mm, výška 11 mm, hmotnost 20g

hmotnost balení: 100 g (5 ks)

minimální trvanlivost uvedena na obale, výrobce uvádí 35 dní

➤ Tyčinky - sýr zrající pod mazem

složení: tvaroh, sůl max. 5,5 %, regulátory kyselosti E170, E500

výživová hodnota: 532 kJ/ 125 kcal, bílkoviny - 29 g, tuku – 0,6 g,

sacharidy – 1 g, sušina 33%, tuk 0,6 %

rozměry tyčinek: průměr 20x20 mm, délka 100 mm, hmotnost 31,3 g

hmotnost balení: 125 g (4 ks)

minimální trvanlivost uvedena na obale, výrobce uvádí 35 dní

Schéma odběru vzorků

Číslo odběru	Fáze výroby		Den odběru
Odběr č. 1	příjem tvarohu	—————→	0. den
Odběr č. 2	nasolení	—————→	5. den
Odběr č. 3	formování	—————→	6. den
Odběr č. 4	sušení a odvětrání	—————→	7. – 8. den
Odběr č. 5	zrání	—————→	9. – 11. den
Odběr č. 6	konec doby trvanlivosti (5 °C)	—————→	45. den
Odběr č. 7	konec doby trvanlivosti (20 °C)	—————→	45. den
Odběr č. 8	skladování po skončení doby trvanlivosti (5 °C)	—————→	66. den
Odběr č. 9	skladování po skončení doby trvanlivosti (20 °C)	—————→	66. den

4.2 Metody

4.2.1 Mikrobiologické rozbory

4.2.1.1 Stanovení *Brevibacterium linenes* kultivačním médiem M17 (Noack, Rakousko)

Složení živné půdy M17

Trypton	2,5 g/l
Maso-peptonový agar	2,5 g/l
Sojo- peptonová moučka	5 g/l
Kvasničný extrakt	2,5 g/l
Masový extrakt	5,0 g/l
Laktóza	5,0 g/l
Glycerolfosfát sodný	19,0 g/l
Síran hořečnatý	0,25 g/l
Kyselina askorbová	0,5 g/l
Bakteriologický agar	15 g/l

Do skleněné reagenční láhve bylo naváženo laboratorní váhou (220A; Schoeller instruments, Praha, ČR) 57,2 g dehydratované půdy, která byla zalita jedním litrem destilované vody, půda byla ponechána nabobtnat. Dále byla provedena sterilace v autoklávu Sanyo MLS-3750/3780 (Schoeller instruments, Praha, ČR) při teplotě 121 °C po dobu 20 minut. Po ukončení sterilace byla vložena reagenční láhev již se sterilní půdou do vodní lázně Julabo TW 20 (Schoeller instruments, Praha, ČR) vytemperované na teplotu 45 °C.

Kultivace

U vzorků bylo po jejich homogenizaci (homogenizátor Bagmixer 400, Fabrilabo, Francie) nejprve provedeno dekadické ředění (1 ml vzorku do 9 ml fyziologického roztoku). Z příslušného ředění byl do Peteriho misek odpipetován vždy 1 ml vzorku. Inokulum bylo zalito kultivační půdou (M 17, Noack, Rakousko) ochlazenou na 45 °C.

Po zatuhnutí byly naočkované plotny inkubovány v termostatu (Sanyo, Schoeller instruments, Praha, ČR) při teplotě 30 °C po dobu 48 hodin. Potvrzení přítomnosti bakterií rodu *Brevibacterium* bylo provedeno laktoperoxidázovým testem.

4.2.1.2 Stanovení celkového počtu mikroorganismů podle normy ČSN ISO 2293

Stanovení celkového počtu mikroorganismů bylo provedeno na mediu Plate count agar (PCA), (Noack, Rakousko).

Složení živné půdy PCA

Trypton	5,0 g/l
Kvasničný extrakt	2,5 g/l
Glukóza	1,0 g/l
Bakteriologický agar	12,0 g/l

Do skleněné reagenční láhve bylo naváženo (laboratorní váha 220A, Schoeller instruments, Praha, ČR) 20,5 g dehydratované půdy, která byla zalita jedním litrem destilované vody, půda byla ponechána nabobtnat. Dále byla provedena sterilace (autokláv Sanyo MLS-3750/3780 Schoeller instruments, Praha, ČR) při teplotě 121 °C po dobu 20 minut. Po ukončení sterilace byla vložena reagenční láhev již se sterilní půdou do vodní lázně (Julabo TW 20 Schoeller instruments, Praha, ČR) vytemperované na teplotu 45 °C.

Kultivace

U vzorků bylo po jejich homogenizaci homogenizátorem (Bagmixer 400, Fabrilabo, Francie) nejprve provedeno dekadické ředění (1 ml vzorku do 9 ml fyziologického roztoku). Z příslušného ředění byl do Peteriho misek odpipetován vždy 1 ml vzorku. Inokulum bylo zalito kultivační půdou (Plate Count agar, Noack, Rakousko) ochlazenou na 45 °C. Po zatuhnutí byly naočkované plotny inkubovány v termostatu (Sanyo, Schoeller instruments, Praha, ČR) při teplotě 30 °C po dobu 72 hodin aerobně.

4.2.1.3 Stanovení celkového počtu bakterií mléčného kvašení (BMK) podle normy ČSN ISO 13721

Stanovení celkového počtu BMK bylo provedeno na mediu MRS (Noack, Rakousko)

Složení živné půdy MRS :

Pepton	10,0 g/l
Masový extrakt	10,0 g/l
Kvasničný extrakt	5,0 g/l
Glukóza	20,0 g/l
Tween 80	1,08 g/l
Difosfát sodný	2,0 g/l
Octan sodný	5,0 g/l
Citrát sodný	2,0 g/l
Sulfid hořčíku	0,2 g/l
Sulfid manganu	0,05 g/l
Bakteriologický agar	15,0 g/l

Do skleněné reagenční láhve bylo naváženo (laboratorní váha 220A, Schoeller instruments, Praha, ČR) 70,3 g dehydratované půdy, která byla zalita jedním litrem destilované vody, půda byla ponechána nabobtnat. Dále byla provedena sterilace (autokláv Sanyo MLS-3750/3780 Schoeller instruments, Praha, ČR) při teplotě 121 °C po dobu 20 minut. Po ukončení sterilace byla vložena reagenční láhev již se sterilní půdou do vodní lázně (Julabo TW 20 Schoeller instruments, Praha, ČR) vytemperované na teplotu 45 °C.

Kultivace

U vzorků bylo po jejich homogenizaci (homogenizátor Bagmixer 400, Fabrilabo, Francie) nejprve provedeno dekadické ředění (1 ml vzorku do 9 ml fyziologického roztoku). Z příslušného ředění byl do Peteriho misek odpipetován vždy 1 ml vzorku. Inokulum bylo zalito kultivační půdou (MRS, Noack, Rakousko) ochlazenou na 45 °C. Po zatuhnutí byly naočkované plotny inkubovány v termostatu (Sanyo, Schoeller instruments, Praha, ČR) při teplotě 30 °C po dobu 72 hodin anaerobně v anaerostatu.

4.2.1.4 Stanovení bakterií rodu *Enterococcus*

Stanovení počtu enterokoků bylo provedeno na mediu Slanetz and Bartley (Noack, Rakousko)

Složení živné půdy Slanetz-Bartley:

Trypton	20,0 g/l
Kvasničný extrakt	5,0 g/l
Glukóza	2,0 g/l
Difosfát sodný	4,0 g/l
Azid sodný	0,4 g/l
2,3,5- triphenyltetrazolium chlorid (TTC)	0,1 g/l
Bakteriologický agar	15,0 g/l

Do skleněné reagenční láhve bylo naváženo (laboratorní váha 220A, Schoeller instruments, Praha, ČR) 41,5 g dehydratované půdy, která byla zalita jedním litrem destilované vody, půda byla ponechána nabobtnat. Dále byla provedena sterilace (autokláv Sanyo MLS-3750/3780 Schoeller instruments, Praha, ČR) při teplotě 121 °C po dobu 20 minut. Po ukončení sterilace byla vložena reagenční láhev již se sterilní půdou do vodní lázně (Julabo TW 20 Schoeller instruments, Praha, ČR) vytemperované na teplotu 45 °C.

Kultivace

U vzorků bylo po jejich homogenizaci homogenizátorem (Bagmixer 400, Fabrilabo, Francie) nejprve provedeno dekadické ředění (1 ml vzorku do 9 ml fyziologického roztoku). Z příslušného ředění byl do Peteriho misek odpipetován vždy 1 ml vzorku. Inokulum bylo zalito kultivační půdou (Slanetz and Bartley, Noack, Rakousko) s přidavkem suplementu TTC, ochlazenou na 45 °C. Po zatuhnutí byly naočkované plotny inkubovány v termostatu (Sanyo, Schoeller instruments, Praha, ČR) při teplotě 37 °C po dobu 48 hodin aerobně. Po skončení inkubace byly vypočítány charakteristické kolonie (o průměru 2 mm, červenorůžové barvy s nádechem hnědé).

4.2.1.5 Stanovení plísní a kvasinek

Složení živné půdy Chloramphenicol Glukose Agar (CHGA)

Glukóza	20,0 g/l
Chloramfenicol	0,1 g/l
Kvasničný extrakt	5,0 g/l
Bakteriologický agar	15,0 g/l

Do skleněné reagenční láhve bylo naváženo (laboratorní váha 220A, Schoeller instruments, Praha, ČR) 20,5 g dehydratované půdy, která byla zalita jedním litrem destilované vody, půda byla ponechána nabobtnat. Dále byla provedena sterilace (autokláv Sanyo MLS-3750/3780 Schoeller instruments, Praha, ČR) při teplotě 121 °C po dobu 20 minut. Po ukončení sterilace byla vložena reagenční láhev již se sterilní půdou do vodní lázně (Julabo TW 20 Schoeller instruments, Praha, ČR) vytemperované na teplotu 45 °C.

Kultivace

U vzorků bylo po jejich homogenizaci (homogenizátor Bagmixer 400, Fabrilabo, Francie) nejprve provedeno dekadické ředění (1 ml vzorku do 9 ml fyziologického roztoku). Z příslušného ředění byl do Peteriho misek odpipetován vždy 1 ml vzorku. Inokulum bylo zalito kultivační půdou (Chloramphenicol Glukose Agar, Noack, Rakousko) ochlazenou na 45 °C. Po zatuhnutí byly naočkované plotny inkubovány v termostatu (Sanyo, Schoeller instruments, Praha, ČR) při teplotě 25 °C po dobu 5 dní aerobně.

4.2.1.6 Stanovení *E. coli*

Složení živné půdy Chromocult TBX

Trypton	20,0 g/l
Žlučové soli	1,5 g/l
BCIG	0,075 g/l
Bakteriologický agar	15,0 g/l

Do skleněné reagenční láhve bylo naváženo (laboratorní váha 220A, Schoeller instruments, Praha, ČR) 9,18 g dehydratované půdy, která byla zalita jedním litrem destilované vody, půda byla ponechána nabobtnat. Dále byla provedena sterilace (autokláv Sanyo MLS-3750/3780 Schoeller instruments, Praha, ČR) při teplotě 121 °C po dobu 20 minut. Po ukončení sterilace byla vložena reagenční láhev již se sterilní půdou do vodní lázně (Julabo TW 20 Schoeller instruments, Praha, ČR) vytemperované na teplotu 45 °C.

Kultivace

U vzorků bylo po jejich homogenizaci (homogenizátor Bagmixer 400, Fabrilabo, Francie) nejprve provedeno dekadické ředění (1 ml vzorku do 9 ml fyziologického roztoku). Z příslušného ředění byl do Petriho misek odpipetován vždy 1 ml vzorku. Inokulum bylo zalito kultivační půdou (TBX agar, Noack, Rakousko) ochlazenou na 45 °C. Po zatuhnutí byly naočkované plotny inkubovány v termostatu (Sanyo, Schoeller instruments, Praha, ČR) při teplotě 44 °C po dobu 18 až 24 hodin aerobně.

4.2.2 Testování tyrosindekarboxylázové a histidindekarboxylázové aktivity u izolovaných BMK, enterokoků a *Brevibacterium linenes* v dekarboxylačním médiu (DCM)

Pro testování tyrosindekarboxylázové a histidindekarboxylázové aktivity u BMK, enterokoků a *Brevibacterium linens* byly zvoleny vzorky odebrané v letním období. Ze vzorků sýrů zrajících pod mazem byly izolované kolonie, které byly na Petriho miskách 3x přečištěny a následně inokulovány do tekutého dekarboxylačního média (DCM; podle autorů Bover- Cid a Holzapfel, 1999; viz. níže), které obsahovalo 1 % disodné soli tyrosinu a volnou bázi histidinu. Všechny izoláty byly inokulovány duplicitně v DCM s negativní kontrolou (inkubace DCM bez přidání izolovaných kolonií) a inkubovány 4 dny při 37 °C. Izoláty byly vyhodnoceny jako DCM pozitivní v případě barevné změny média ze žluté na fialovou, která byla zapříčiněna změnou pH během inkubace. Při dekarboxylaci aminokyselin se odštěpí příslušná dekarboxyláza z karboxylové skupiny aminokyseliny CO₂ za vzniku alkalického aminu a pozitivní

výsledek se projeví změnou zbarvení indikátoru, což je způsobenou změnou pH (Brooks a Sodeman, 1974).

Dekarboxylační medium

Trypton	5,0 g/
Kvasničný extrakt	5,0 g/l
Masový extrakt	5,0 g/l
NaCl	2,5 g/l
Glukóza	2,0 g/l
Twenn 80	1,0 g/l
MgSO ₄	0,2 g/l
MnSO ₄	0,05 g/l
FeSO ₄	0,04 g/l
Citrát amoný	2,00 g/l
Thiamin	0,01 g/l
K ₂ PO ₄	2,00 g/l
CaCO ₃	0,10 g/l
Pyridoxal-5-fosfát	0,05 g/l
Bromcresol pyrole	0,06 g/l
Agar	20,0 g/l
<u>Použité aminokyseliny:</u>	
Disodná sůl L – tyrozinu 1% (SIGMA)	10 g/l
Volná báze L-Histidinu (CALBIOCHEM)	10 g/l

Do skleněné reagenční láhve na 1000 ml byly naváženy komponenty uvedené výše (kromě aminokyselin). Získaná směs byla rozpuštěna v litru destilované vody. Poté byla směs vložena do autoklávu Sanyo MLS-3750/3780 (Schoeller instruments, Praha, ČR), kde následně proběhla sterilace při teplotě 121 °C po dobu 20 minut. Po ukončení sterilace byla reagenční láhev vložena do vodní lázně (Julabo TW 20 Schoeller instruments, Praha, ČR), vytemperované na teplotu 45 °C. Po ochlazení bylo pH směsi upraveno sterilními roztoky (0,1 M HCl a 0,1 M NaOH) na 7,4. Poté byly do reagenční láhve přidány aminokyseliny předem rozpuštěné v 0,1 mol/l sterilní HCl přefiltrovány

přes filtr (Filter FFPT 2502-100-25mm) a opět bylo upraveno pH na 7,4 sterilními roztoky 0,1M NaOH nebo 0,1 M HCl.

4.2.3 Konfirmace schopnosti izolátů BMK, enterokoků a startovacích kultur produkovat tyramin a histamin v DCM metodou HPLC

Po inkubaci v DCM byly vzorky centrifugovány při 10.000 ot./min, 3 minuty při 4 °C (Hettich Universal 32R, Hettich, Německo); 1 ml supernatantu byl smíchán s 1 ml 0,1 M HCl a 20 µl vnitřního standardu (1,7-diaminoheptan; Sigma-Aldrich), roztok byl odstředěn na mini míchadle MS2 Minishaker (IKA Werke, Německo) a znovu centrifugován. Supernatant byl filtrován přes nylonovou membránu (13 mm, 0,45 µm, Chromatography Research Supplies, Addison, USA) a tyramin a histamin byly stanoveny metodou HPLC (viz. Kapitola 4.2.5.).

4.2.4 Rodová a druhová identifikace enterokoků pozitivních v dekarboxylačním mediu

U izolátů bakterií rodu *Enterococcus*, které byly pozitivní v dekarboxylačním mediu byla provedena rodová identifikace pomocí (PYRA-testu Pliva-Lachema, Brno, Česká republika) a druhová identifikace pomocí EN-COCCUStestu (Pliva-Lachema, Brno, Česká republika).

4.2.4.1 EN-COCCUStest

U identifikací rodu *Enterococcus* byl nejprve proveden test na detekci aktivity pyrrolidonylarylamidázy (PYRA-test), pro potvrzení příslušnosti k danému rodu. Izoláty příslušné k rodu *Enterococcus* byly dále identifikovány na soupravě EN-COCCUStest.

Souprava EN-COCCUStest je určena pro rutinní druhovou identifikaci klinicky významných zástupců rodu *Enterococcus*. Souprava obsahuje tři mikrotitrační destičky (každá pro identifikaci dvanácti kmenů) se sušidlem. Dále tři PE sáčky pro inkubaci, 36 formulářů pro záznam výsledků a rámeček destičky s víčkem pro inkubaci. Příprava

vzorku: izolované kolonie byly přeočkovány na živnou půdu PCA (Noack, Rakousko) a kultivovány při 37 °C 24 hodin.

Příprava destičky:

Byl nachystán prázdný rámeček s víčkem poté byl otevřen aluminiový sáček a vyňata destička. Pomocí skalpelu byl oddělen příslušný počet řad odpovídající počtu testovaných kmenů. U vybraných řad panelu byla oddělena ochranná folie a řady umístěny do připraveného rámečku. Bakteriální suspenze získaná z našich izolátů byla před použitím důkladně promíchána a byla inokulována (0,1 ml suspenze do všech jamek příslušného řádku destičky). Do jamek, kde bylo potřeba zajistit anaerobní prostředí byly přidány dvě kapky parafinového oleje, aby zabránili přístupu vzduchu. Rámeček s naočkovanými řadami byl uzavřen do inkubačního sáčku a EN-COCCUStest byl vložen do termostatu nastaveného na teplotu 37 °C po dobu 24 hodin.

4.2.5 Stanovení biogenních aminů/polyaminů

Bylo naváženo 10 g sýrů zrajícím pod mazem (± 1 mg) do 85 ml zkumavek, přidáno 0,5 ml vnitřního standardu (1,7-diaminoheptan, koncentrace 1 mg/ml) a vzorky byly extrahovány 2 minuty s 30 ml 0,1 M HCl. Suspenze byla centrifugována (10 minut, 4 °C, Hettich Universal 32R, Hettich, Německo). Supernatant byl filtrován přes papírový filtr a pevný podíl byl opět extrahován. Spojené supernatanty byly doplněny na 50 ml deionizovanou vodou a zfiltrány přes jednorázový nylonový membránový filtr (13 mm, 0,45 μ l, Chromatography Research Supplies, Addison, USA). Extrakt byl derivatizován dansylchloridem (5-dimethylaminonaphtalen-1-sulfonylchlorid, DCI). Derivatizační činidlo bylo připraveno rozpuštěním 5 mg dansylchloridu v 1 ml acetonu (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). Derivatizační postup: k 1 ml extraktu ve vialkách (nebo standardu) bylo přidáno 0,5 ml nasyceného Na₂CO₃ + 1 ml derivatizačního činidla a směs byla promíchána 1 minutu (MS2 Minishaker IKA, IKA Werke GmbH, Staufen, Německo). Derivatizace probíhala 1 hodinu bez přístupu světla při 40 °C, poté bylo do vialek 0,2 ml NH₃ směs byla ponechána 30 minut reagovat (amoniak zreagoval se zbytkem dansylchloridu). Deriváty aminů byly extrahovány diethyletherem (3 x 1 ml). Organická fáze byla odpařena dosucha pod dusíkem a odparek byl rozpuštěn v 0,5 ml acetonitrilu (ACN). Roztok byl zfiltrován přes nylonový membránový filtr 0,45 μ m a

nastříknut na chromatografickou kolonu. Biogenní aminy byly separovány na koloně Zorbax Eclipse XDB C18 (150 mm x 4,6 mm, velikost částic 5 µm) s předkolonou Meta Gard ODS-2 (30 mm x 4,6 mm, velikost částic 5 µm) při průtoku 0,8 ml min⁻¹ pomocí chromatografu HP 1100 (Agilent Technologies, Wilmington, USA) složeného z kvartérní pumpy (G1311A), vakuového degazeru (G1322A), autosampleru (G1313A) a UV/VIS detektoru s proměnnou vlnovou délkou (G1314A). Separace po derivatizaci DCI byla provedena pomocí gradientové eluce s H₂O/ACN (čas 0 – 23 minut: H₂O 35 – 0 %, ACN 65 – 100 %) s následnou detekcí pomocí fotometrického UV/VIS detektoru při 254 nm. Byly stanoveny následující biogenní aminy: tyramin, histamin, phenylethylamin, kadaverin a polyaminy: putrescin, spermidin a spermin. Separované biogenní aminy byly porovnáním retenčních časů se standardem BA po derivatizaci DCI (všechny standardy BA byly dodány jako hydrochloridy, Sigma-Aldrich) a jejich koncentrace po DCI derivatizaci byly vyjádřeny v mg.kg⁻¹ původního (čerstvého) vzorku (nikoli na kg sušiny) pro lepší vyjádření podmínek konzumace (Latorre-Moratalla a kol., 2008). Koncentrace BA ve vzorku byla korigována metodou vnitřního standardu (Komprda a kol., 2004).

4.2.6 Detekce genu kódujícího bakteriální tyrozimdekarboxylázu

Nejdříve byla provedena izolace DNA pomocí purifikační soupravy kolonek podle návodu výrobce (QIAGEN, Machery Nagel). Purifikovaná DNA byla dále uchovávána při -20 °C. Polymerázovou řetězovou reakcí (PCR) byla provedena amplifikace fragmentu DNA o délce 1130 bp pomocí specifických primerů TD2 (5'-ACATAGTCAACCATRTTGAA-3') a TD5 (5'-CAAATGGAAGAAGAAGTAGG-3', Coton a kol. 2003) s následujícím amplifikačním programem v termocycleru MJ Mini Personal Thermal Cycler (BIO- RAD Laboratories, Inc., USA): počáteční denaturace při 95 °C 15 min, 32 cyklů denaturace při 95 °C 45 s, annealing primerů při 52 °C 45 s, elongace při 72 °C 75 s + závěrečná elongace při 72 °C 5 min. Pro detekci PCR produktů byl připraven 1,5 % agarový gel obarvený ethidium bromidem (0,5 µg/ml). Elektroforetické dělení získaných fragmentů probíhalo v roztoku 0,5 x TBE pufru (1 M Tris, kyselina boritá, 0,5 M EDTA) při napětí 80 V po dobu 90 min. Následně byly PCR produkty na gelu detekovány pomocí transiluminátoru (EB-20E Ultralum, USA) pod UV světlem a zaznamenány pomocí fotodokumentačního systému (Gel imager TM

Ultra-Lum, Inc., USA). Jako velikostní standard byl použit 100 bp ladder (New England Biolabs, Anglie).

4.2.7 Pomocné analýzy

Ke stanovení sušiny byla použita referenční metoda, jejíž princip je založen na vysoušení vzorku při teplotě 102 ± 2 °C do konstantní hmotnosti. Vzorek byl nastrouhán byly odváženy 3g do hliníkové misky a poté byl vysušen sušili do konstantní hmotnosti v sušárně (Binder, Merck, Německo).

Titrační kyselost byla kvatifikována počtem ml odměrného roztoku NaOH ($c = 0,25 \text{ mol.l}^{-1}$) potřebných k neutralizaci 100 g tvarohu nebo sýru na fenolftalein.

Stanovení aktivní kyselosti bylo provedeno ve vodném výluhu pomocí pH-metru WTW pH 95 Microprocessor apparatus (Fisher Scientific, Německo). Vzorek byl nastrouhán a bylo z něj odváženo 10 g do 50 ml kádinky, do které bylo přidáno 50 ml destilované vody. Takto připravený vzorek se nechal odležet 30 minut a poté byla hodnota změřena pomocí pH metru.

Obsah chloridu sodného byl stanoven přímou titrací vodného výluhu sýru dusičnanem stříbrným o známé koncentraci na chroman draselný jako indikátor.

5 VÝSLEDKY A DISKUSE

5.1 Vliv testovaných faktorů na počty mikroorganismů

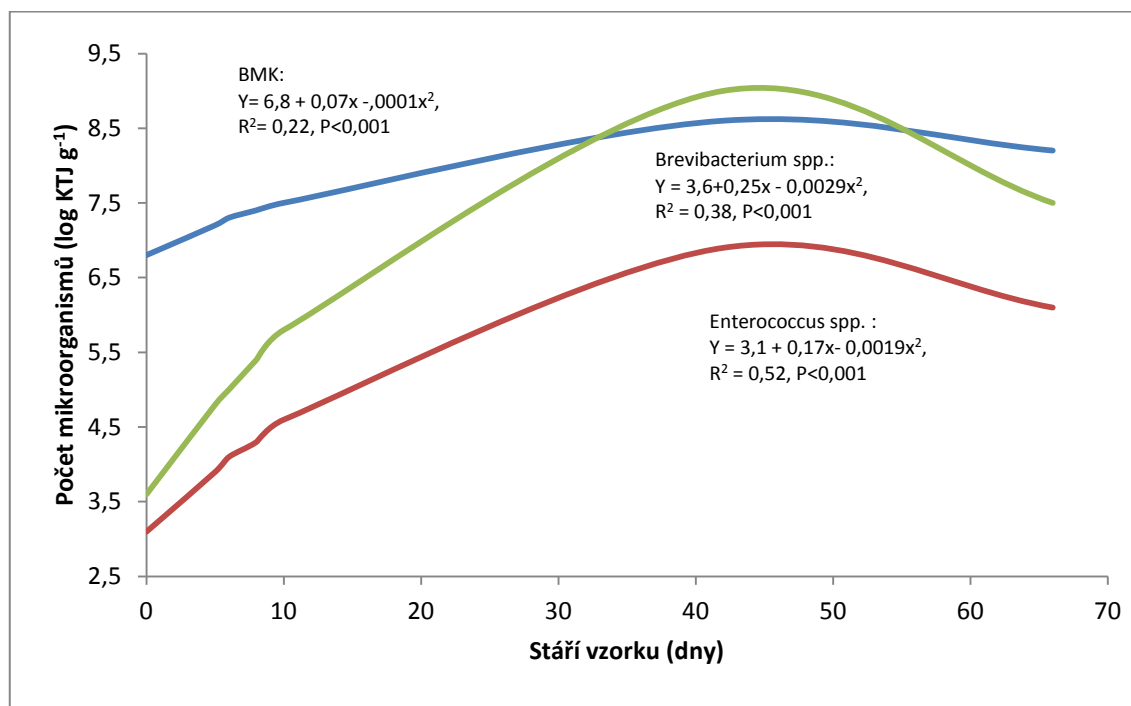
V rámci pokusu byly analyzovány sýry zrající pod mazem (olomoucké tvarůžky), u nichž byly stanoveny celkové počty mikroorganismů (CPM), bakterie mléčného kvašení (BMK), enterokoky, bakterie *E.coli*, kvasinky a plísně a *Brevibacterium linens*.

V rámci pokusu byl sledován vliv několika faktorů: doba skladování, tvar výrobku, výroba a skladování v různém ročním období, vliv teploty a vliv různých výrobních fází, u nichž bylo sledováno působení na růst MO se schopností tvořit biogenní aminy.

5.1.1 Stáří vzorku (včetně doby skladování)

Vliv stáří (skladování) vzorku na množství mikroorganismů byl již mnohokrát prokázán. U námi použitých vzorků sýrů zrajících pod mazem byl prokázán nárůst do 40. až 50. dne skladování, poté docházelo k postupnému poklesu sledovaných MO (obrázek 4). Pokles počtu BMK po 60 dnech zrání zaznamenal již Milesi a kol. (2009). Během výroby se do sýrů zrajících pod mazem přidává mazová kultura, jejichž součástí je bakterie *Brevibacterium linens*, která se významně podílí na charakteru výrobku, proto jsou během výroby upravovány podmínky pro její růst. Vytvoření vhodných podmínek vysvětluje rychlý nárůst *Brevibacterium linens*, které po 10 dnech od zahájení výroby dosahovaly v našem experimentu hodnoty 8,09 log KTJ g⁻¹. BMK na konci doby trvanlivosti (42. den ode dne výroby) dosahovaly průměrné hodnoty 8,6 log KTJ g⁻¹. Stejně hodnoty zjistila i Cwiková (2009) u eidamského typu sýra po 26 dnech skladování tedy 8,06 log KTJ g⁻¹. Martucelli a kol. (2005) po 30 dnech skladování naměřil hodnotu 10,21 log KTJ g⁻¹. V experimentu autorů Pintado a kol. (2008) dosahovaly hodnoty BMK 9,0 log KTJ g⁻¹.

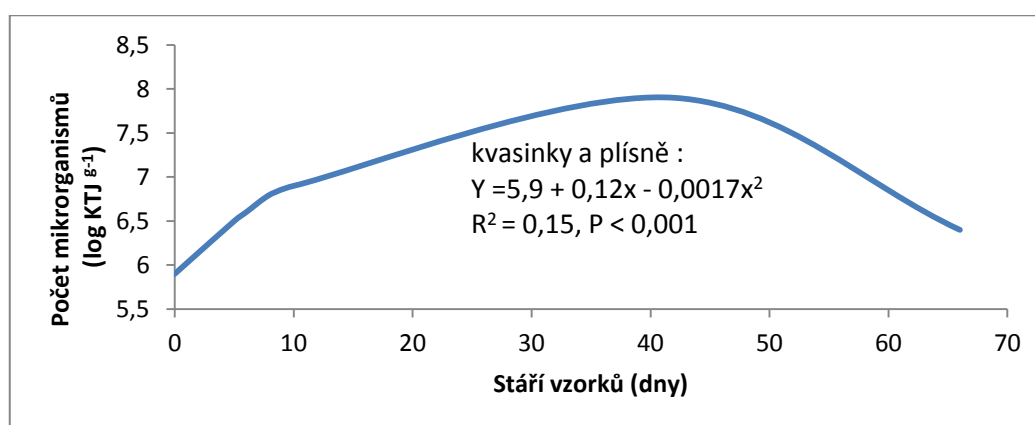
Obr. 4 Vyhodnocení závislosti počtu bakterií mléčného kvašení (BMK), bakterií rodu *Enterococcus* a *Brevibacterium linens* na stáří vzorku, $n = 695$



Práce Gardini a kol. (2001) potvrzuje, že hlavní biologická funkce ovlivňující tvorbu biogenních aminů je rozsah a růst mikroorganismů, jako je *E. faecalis*, vyznačujících se aktivitou dekarboxyláz. Je nutné zdůraznit, že mikrobiální buňky uvolní enzym a ten je zodpovědný za akumulaci BA, tvorba BA může pokračovat i v nepřítomnosti životaschopných buněk (Bover-Cid a kol, 2001). Což se potvrdilo i v našem experimentu, kde byly zjištěny až záporné koeficienty korelace mezi BMK a BA ($P < 0,001$). Je obtížné najít přímou korelaci mezi MO a obsahem BA v sýrech, protože schopnost produkce aminů u různých kmenů různých bakterií se velice liší (Halász a kol., 1994).

Jedním z další sledovaných mikroorganismů v našem projektu byly kvasinky a plísně (obrázek 5). Během výroby a skladování docházelo k postupnému růstu jejich počtů, a to až do 40.- 42. dne, kdy docházelo k postupnému odumírání sledovaných MO. Kvasinky byly přidány do výrobku záměrně během výroby pro zajištění vhodného pH, jsou součástí tzv. mazové kultury. Vysoké počty NSLAB (ne-startérové bakterie mléčného kvašení), disponujících dekarboxylačními enzymy, pozitivně korelují s vysokým obsahem BA v sýrech (Buňková a kol., 2010; Fernandez a kol., 2007; Martuscelli a kol., 2005).

Obr. 5 Vyhodnocení závislosti počtu kvasinek a plísní na stáří vzorku, $n = 695$

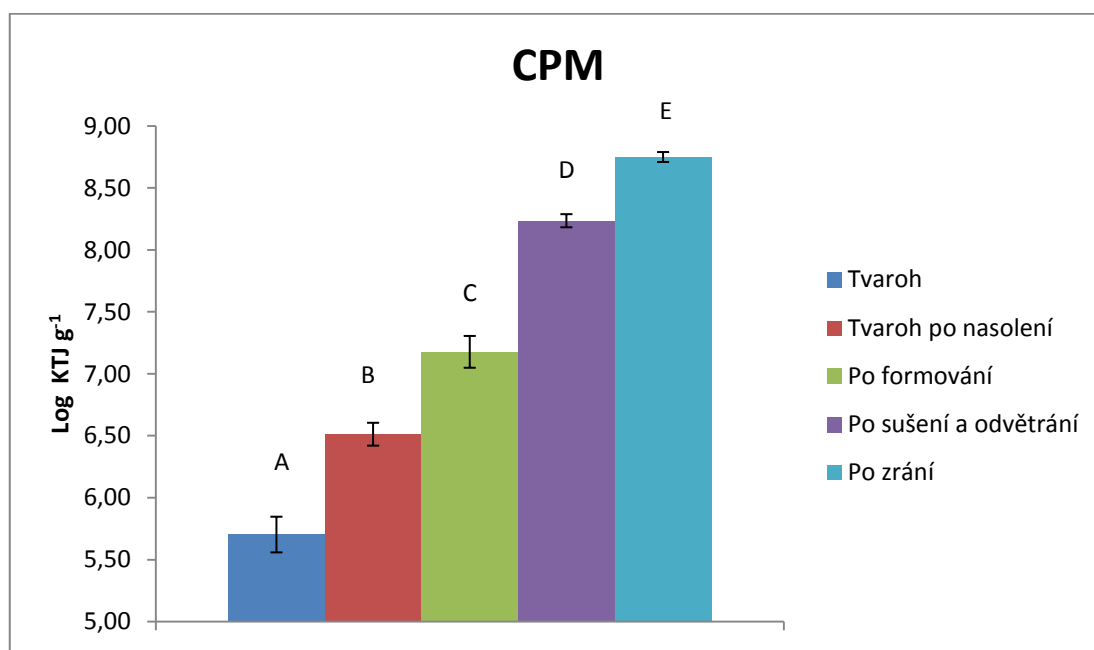


5.1.2 Výrobní fáze sledovaného produktu

Hodnota celkového počtu mikroorganismů (CPM) charakterizuje celkovou hygienu získávaných vzorků. Do sýrů zrajících pod mazem se přidávají mikrobiologické kultury, které jsou pro jejich výrobní proces nepostradatelné, jejich růst a vývoj je nezbytný pro charakteristickou chuť a vůni výrobku. Hodnota CPM zahrnuje i záměrně přidané mikroorganismy, proto nelze podle tohoto ukazatele poukazovat na zhoršenou hygienickou kvalitu či podmínky výroby.

Při porovnání jednotlivých výrobních fází v případě CPM (obr. 6) se jednotlivé výrobní fáze od sebe průkazně lišily ($P < 0,05$) docházelo k postupnému nárůstu mikroorganismů. Hodnoty CPM na konci doby zrání ve výrobě byly $8,74 \log \text{KTJ g}^{-1}$.

Obr. 6 Množství celkového počtu mikroorganismů při jednotlivých výrobních fázích

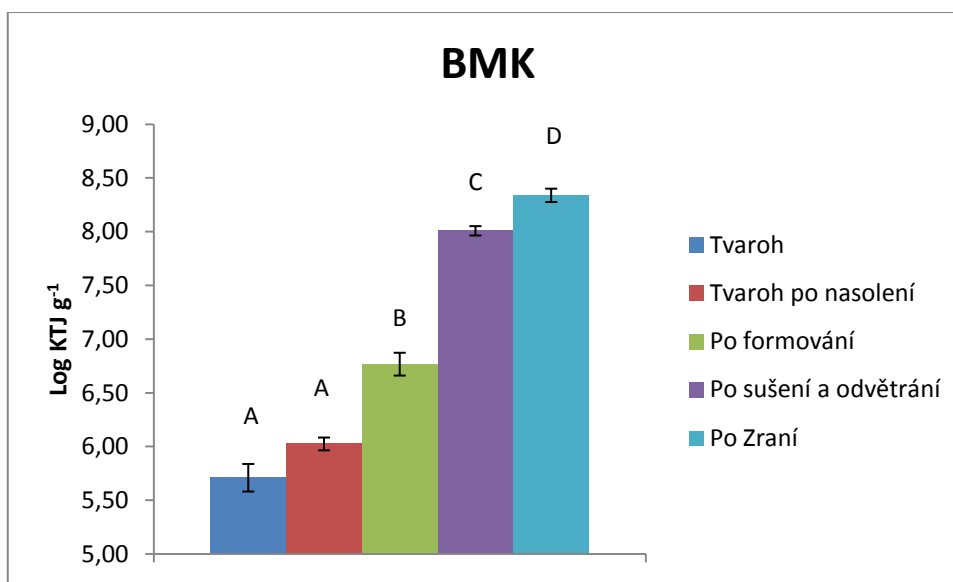


A,B,C,D,E – průměry označené různými písmeny se liší při $P < 0,05$ (jednoduché třídění analýzy rozptylu, post hoc Tukeyův test, tvaroh $n = 48$, tvaroh po nasolení $n = 47$, po formování $n = 22$, po sušení a odvětrání $n = 103$, po zrání $n = 105$)

U sýrů vyrobených ze syrového kravského mléka se hodnoty pohybovaly okolo $8,8 \log \text{KTJ g}^{-1}$ mléka (Kongo a kol., 2009), podobných hodnot dosáhl ve svém experimentu i Pintado a kol. (2008).

Bakterie mléčného kvašení a bakterie rodu *Enterococcus* patří mezi bakterie, které se vyznačují schopností tvořit biogenní aminy. Sýry jsou dobrým substrátem pro tvorbu BA, ale minimální výskyt otrav ukazuje, že při zachování správných technologických postupů se možnosti jejich tvorby minimalizují (Görner a Valík, 2004). Z obr. 7 je patrné, že počty BMK v prvních dvou výrobních fázích se statisticky průkazně nelišily ($P > 0,05$). V následných výrobních fázích se hodnoty průkazně liší ($P < 0,05$) a mají vzestupnou tendenci. To může být zapříčiněno i přidavkem Fargo 37 (přípravek, který přidává výrobce pro vytvoření vhodného prostředí pro mikrobiální kultury, který kromě jiného obsahuje i druh *Pediococcus acidilactici*). Po třetí výrobní fázi (formování) se upravuje prostředí tak, aby bylo vhodné pro přidané bakterie (*Candida valida*, *Brevibacterium linens*), které se podílejí na typickém charakteru výrobku. Ve třetí výrobní fázi po formování dosahovaly hodnoty BMK $6,77 \log \text{KTJ g}^{-1}$. Mezi počty BMK a obsahem BA nebyly žádné významné korelační vztahy. K podobným závěrům došel ve svém experimentu i Yildiz a kol., (2010) u tureckého tvarohového sýru. Na konci doby zrání dosahovaly průměrné hodnoty BMK $8,3 \log \text{KTJ g}^{-1}$. V experimentu autorů Martusceli a kol., (2005) byla hodnota BMK po 14 dnech zrání $10,5 \log \text{KTJ g}^{-1}$ při použití startérových kultur ve formě bakterií mléčného kvašení.

Obr. 7 Množství bakterií mléčného kvašení při jednotlivých výrobních fázích

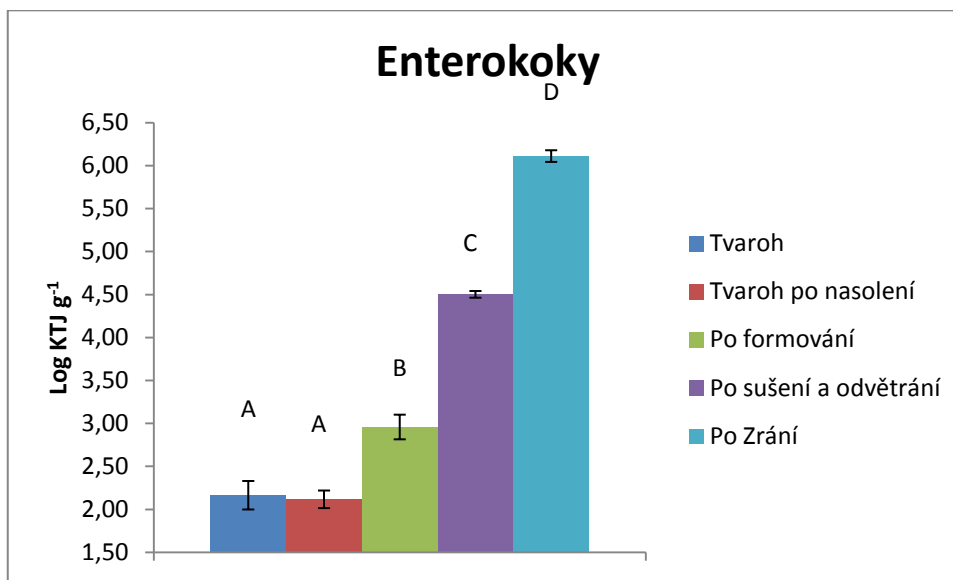


A,B,C,D – průměry označené různými písmeny se liší při $P < 0,05$ (jednoduché třídění analýzy rozptylu, post hoc Tukeyův test), tvaroh $n = 48$, tvaroh po nasolení $n = 47$, po formování $n = 22$, po sušení a odvětrání $n = 103$, po zrání $n = 105$

Biogenní aminy mohou vznikat ze startéru a non-startéru BMK, které jsou použity při výrobě těchto produktů, nebo se mohou dostat do výrobků během jejich zpracování. Mnoho zástupců BMK produkuje BA (Buňková a kol., 2009; Ladero a kol., 2012; Linares a kol., 2011).

Počty enterokoků se v předkládané práci během prvních dvou výrobních fází statisticky průkazně nelišily ($P > 0,05$), hodnoty tvarohu po nasolení mírně poklesly na $2,11 \log \text{KTJ g}^{-1}$, ale snížení nebylo statisticky průkazné. Bakterie rodu *Enterococcus* se považují za odolné vůči vyššímu obsahu soli, snášejí koncentrace až do 6,5 % NaCl (Šilhánková, 1995). Obsah přidané soli mohl mít v předkládané práci vliv na tvorbu enterokoků. Proto nedocházelo u druhé výrobní fáze k nárůstu sledovaných MO jako u následných výrobních fází (formování, sušení a odvětrání, zrání). Zvýšení počtu enterokoků, nastalo ve třetí fázi výroby, což pravděpodobně ovlivnila i úprava vhodných podmínek pro růst mazových bakterií. Výrobní fáze formování, sušení a odvětrání a zrání se od sebe statisticky průkazně lišily ($P < 0,05$) pokud jde o počty enterokoků, obrázek 8. Hodnota korelačního koeficientu v případě enterokoků a tyraminu byla $r = 0,3015$, ($P < 0,001$). Ladero a kol. (2010) v experimentu se sýry s modrou plísní upozorňují na vyšší výskyt enterokoků pozitivních na tyrosindekarboxylázu. Počty enterokoků po 14 dnech od zahájení výroby byly $6,11 \log \text{KTJ g}^{-1}$ ve vstupní surovině (průmyslovém tvarohu) resp. $2,17 \log \text{KTJ g}^{-1}$.

Obr. 8 Počty enterokoků ve vzorcích odebraných z jednotlivých výrobních fází

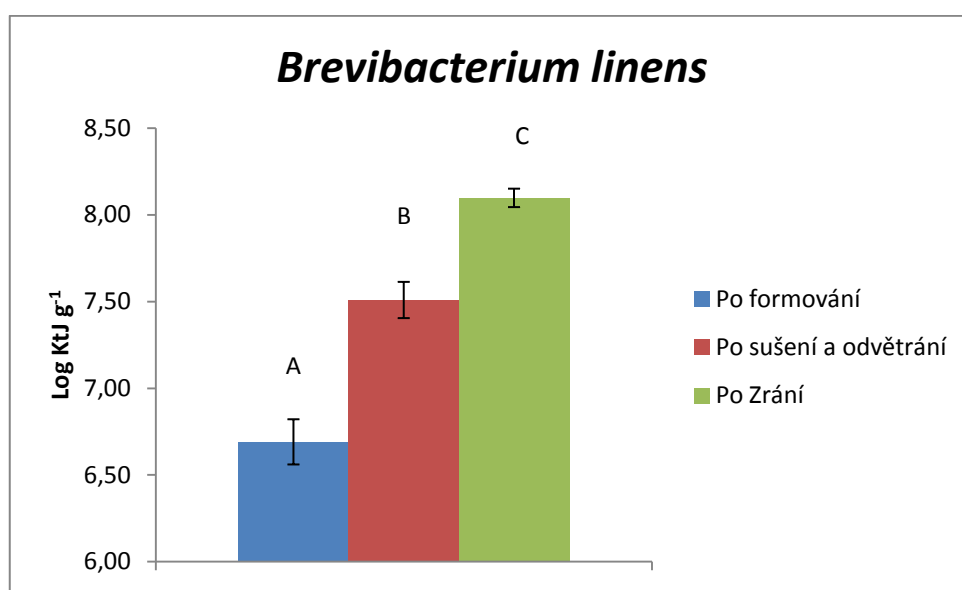


A,B,C,D – průměry označené různými písmeny se liší při $P < 0,05$ (jednoduché třídění analýzy rozptylu, post hoc Tukeyův test), tvaroh $n = 48$, tvaroh po nasolení $n = 47$, po formování $n = 22$, po sušení a odvětrání $n = 103$, po zrání $n = 105$

Enterokoky jsou ubikvitární bakterie, které se vyskytují ve značném množství mlékárenských výrobků, ale i v jiných fermentovaných potravinách (Greifová, 2003). Je důležité, aby byla zachována přítomnost biogenních aminů v důsledku činnosti těchto mikroorganismů, a to v bezpečné úrovni, aniž by to ovlivnilo pozitivní vliv enterokoků na konečné organoleptické vlastnosti sýrů (Gardini a kol., 2001). Linares a kol. (2009) ve svém experimentu zjistili pozitivní korelace mezi počtem enterokoků a obsahem tyraminu. V experimentu autorů Rae a kol., bylo zkoumáno 6 druhů bakterií rodu *Enterococcus* na produkci tyraminu v sýru čedaru a nebyl prokázán vztah s produkcí tyraminu jak v samotném sýru, tak na kultivační půdě.

Na typické chuti a vzhledu olomouckých tvarůžků se podílí bakterie *Brevibacterium linens*, které se přidávají do výrobku až ve třetí výrobní fázi při tzv. formování, kde je jejich růst požadován pro dosažení kvalitního výrobku. Hodnoty počtů bakterií *Brevibacterium linens* se v předkládané práci v jednotlivých výrobních fázích statisticky průkazně lišily ($P < 0,05$) a jak plyne z obrázku 9 mají vzestupnou tendenci. Na konci výroby dosahovaly sýry zrající pod mazem průměrných hodnot $8,09 \log \text{KTJ g}^{-1}$.

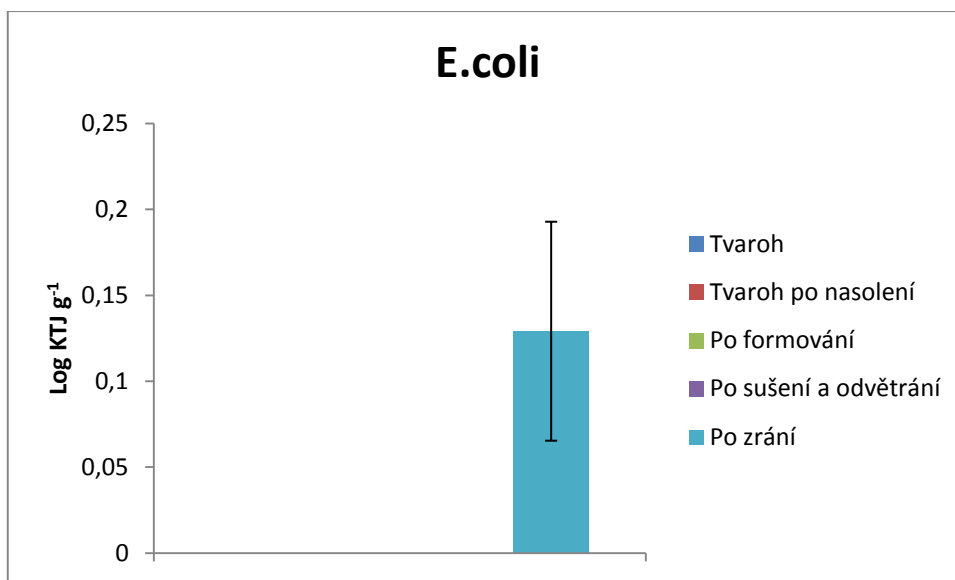
Obr. 9 Počty *Brevibacterium linens* ve vzorcích odebraných z jednotlivých výrobních fází



A, B, C, – průměry označené různými písmeny se liší při $P < 0,05$ (jednoduché třídění analýzy rozptylu, post hoc Tukeyův test), po formování $n = 22$, po sušení a odvětrání $n = 103$, po zrání $n = 105$

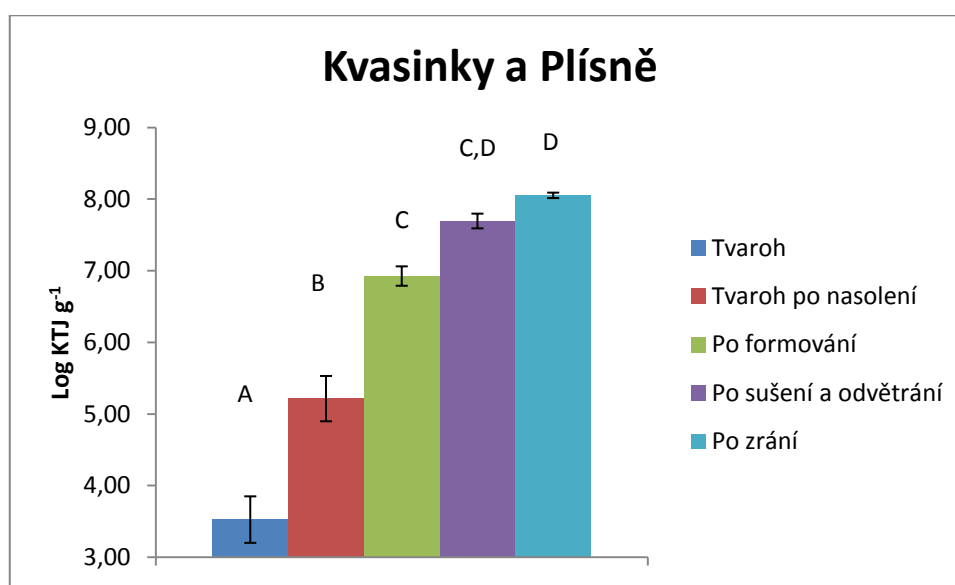
Jedním z největších mikrobiologických problémů z potravinářského pohledu je *E. coli* a to především pro závažné projevy některých patogenních kmenů (*E. coli* 0157:H7), jako je nízká infekční dávka a vznik náhlého akutního onemocnění (Komprda, 2004). *E. coli* byla detekována v předkládané práci pouze u 4 vzorků (celkový počet odebraných vzorků 105), a to v rámci jednoho odběru (obr. 10). Průměrná hodnota pozitivních vzorků byla 3,42 log KTJ g⁻¹.

Obr. 10 Počty bakterií *E. coli* ve vzorcích odebraných z jednotlivých výrobních fází, Po zrání $n = 105$



Jedním z dalších sledovaných ukazatelů byly kvasinky a plísňe (obr.11), jejich počty se v jednotlivých výrobních fázích průkazně lišily ($P < 0,05$). V rámci výrobního procesu byla ve výrobní fázi formování přidána *Candida valida*, která je součástí mazové kultury (8,3 ml /100 kg) za účelem vytvoření vhodného prostředí (pH) pro růst *Brevibacterium linens*. Ve třetí výrobní fázi díky tomu nastal výrazný nárůst kvasinek na hodnotu 6,93 log KTJ g⁻¹, v následné výrobní fázi již nebylo prokázáno statisticky průkazné zvýšení počtu kvasinek a plísni. Na konci zrání se však hodnoty při porovnání s fází formování opět průkazně lišily ($P < 0,05$).

Obr. 11 Počty kvasinek a plísni ve vzorcích odebraných z jednotlivých výrobních fází

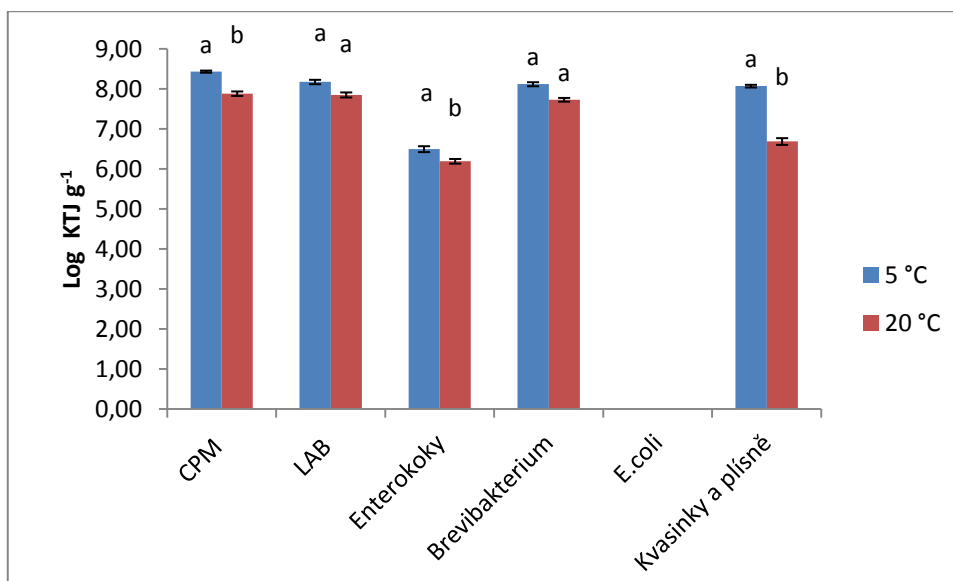


A,B,C,D – průměry označené různými písmeny se liší při $P < 0,05$ (jednoduché třídění analýzy rozptylu, post hoc Tukeyův test), tvaroh $n = 48$, tvaroh po nasolení $n = 47$, po formování $n = 22$, po sušení a odvětrání $n = 103$, po zrání $n = 105$

5.1.3 Teploty při skladování sledovaného produktu

Vzorky sýrů zrajících pod mazem byly po výrobě skladovány při dvou různých teplotách (5 °C, 20 °C) po dobu 42 (obr. 12) a 66 dnů (obr. 13). Počty bakterií mléčného kvašení a *Brevibacterium linens* se v případě skladování 42 dnů při různých skladovacích teplotách průkazně nelišily ($P > 0,05$), na rozdíl od ostatních sledovaných MO. Po dalším měření po 66 dnech sledování (obr. 13) byl však i u těchto bakterií zjištěn statisticky průkazný rozdíl ($P < 0,05$). Vzorky skladované 42 dnů od začátku výroby při 5 °C dosahovaly vyšších hodnot než v případě skladování při 20 °C. V experimentu autorů Santos a kol. (2003) se potvrzuje, že zvyšování množství BA se zpomaluje při ochlazení. Dochází ke snížení schopnosti některých BMK tvořit BA. V předkládané práci BMK po 42 dnech ode dne výroby dosáhly při 5 °C hodnoty 8,17 log KTJ g⁻¹ a při 20 °C hodnoty 7,84 log KTJ g⁻¹. Martuscecelli a kol. (2005) zjistili počty BMK po 30 dnech zrání 10,1 log KTJ g⁻¹, autoři však nebral v potaz ve svém pokusu teplotu skladování. Počty enterokoků v našem experimentu po 42 dnech ode dne výroby byly při 5 °C 6,49 log KTJ g⁻¹ a při 20 °C 6,19 log KTJ g⁻¹. Kongo a kol. (2009) ve svém experimentu u sýrů vyrobených ze syrového mléka zjistili počty enterokoků při skladování po dobu 30 dní 7,51 log KTJ g⁻¹.

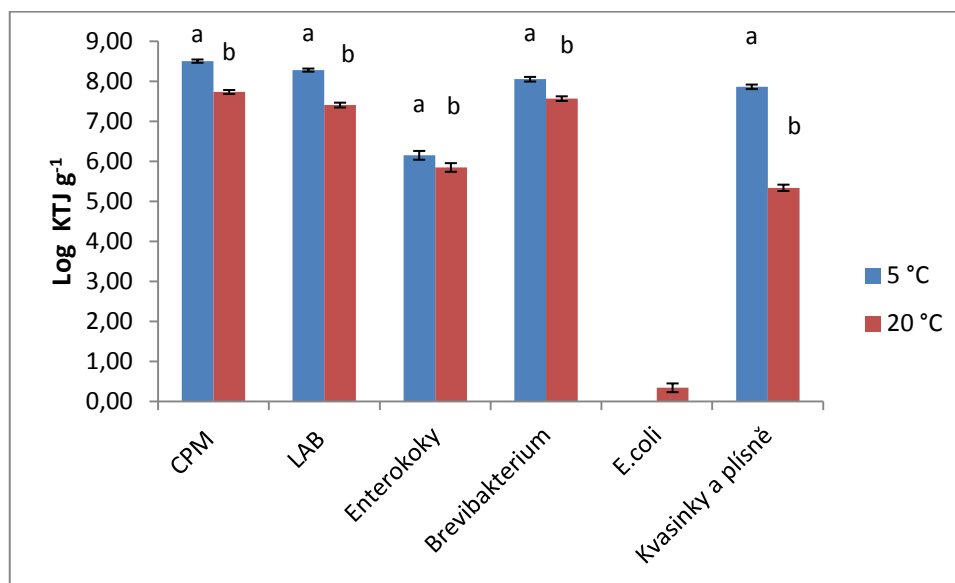
Obr. 12 Počet MO v sýru zrajícím pod mazem při 5 °C a 20° po 42 dnech



A, B – průměry označené různými písmeny se liší při $P < 0,05$ (jednoduché třídění analýzy rozptylu, post hoc Tukeyův test), $n = 192$

V předkládané práci bylo po 66 dnech skladování při různých teplotách prokázáno, že sledované MO jsou ovlivněny teplotou skladování (obr. 13). Počty enterokoku po 66 dnech při 20 °C byly 5,84 log KTJ g⁻¹, při 5 °C skladování byly 6,15 log KTJ g⁻¹.

Obr. 13 Počty MO v sýru zrajícím pod mazem při 5 °C a 20° po 66 dnech



a, b – průměry označené různými písmeny se liší při $P < 0,05$ (jednoduché třídění analýzy rozptylu, post hoc Tukeyův test), $n = 192$

Při porovnání počtů mikroorganismů v sýrech skladovaných při 20 °C 42 dnů a skladovaných při 20 °C 66 dnů jsme zjistili, že u všech sledovaných MO byly naměřeny hodnoty nižší ($P < 0,05$) po 66 dnech (tab. 5). Došli jsme k závěru, že v průběhu skladování došlo k vyčerpání živin pro sledované MO, k čemu nás vedou i sledované fyzikální ukazatele pH, sušina, NaCl (obrázek 26, 27, 28).

Tab. 5 Počty sledovaných MO při skladování vzorků sýrů při 20 °C po 42 a 66 dnech

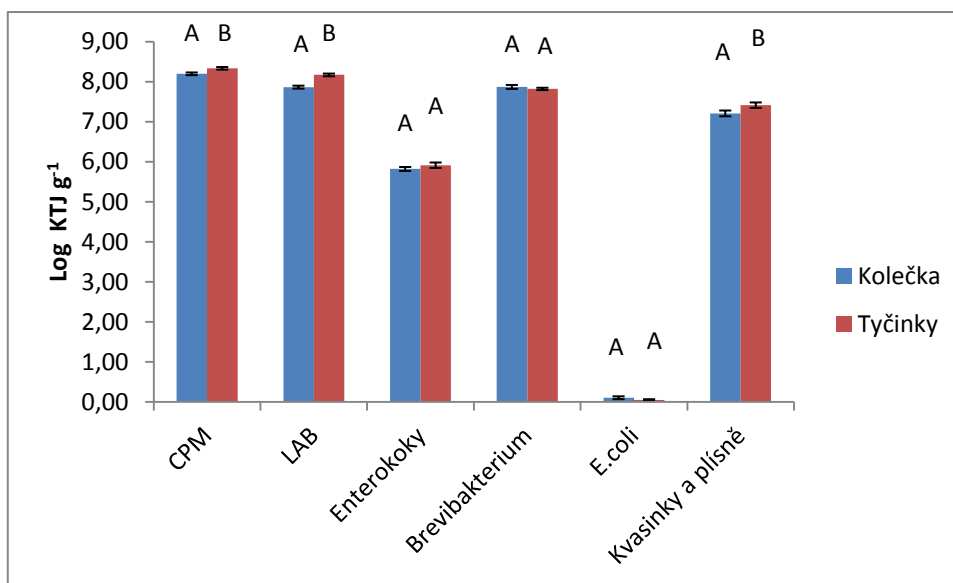
Teplota a doba skladování	Sledované mikroorganismy (log /KTJ g ⁻¹)					
	CPM	BMK	Enterokoky	Brevibakterium	E.coli	Kvasinky a plísňe
20 °C 66 dnů	7,73	7,41	5,85	7,57	0	5,34
20 °C 42 dnů	7,89	7,85	6,2	7,73	0	6,69

hodnoty MO uvedené v tabulce jsou průměry $n = 192$

5.1.4 Tvar výrobku

V rámci pokusu byly odebírány vzorky po formování ve dvou různých tvarech (kolečka, tyčinky). Zatímco u enterokoků, *Brevibacterium linens* a *E. coli* nebyl rozdíl prokázán ($P > 0,05$), u zbývajících MO se hodnoty u jednotlivých tvarů průkazně lišily. Počty MO ve výrobcích tvaru tyčinek dosahovaly vyšších hodnot (obr. 14).

Obr. 14 Počet MO v sýru zrajícím pod mazem při různém tvaru výrobku

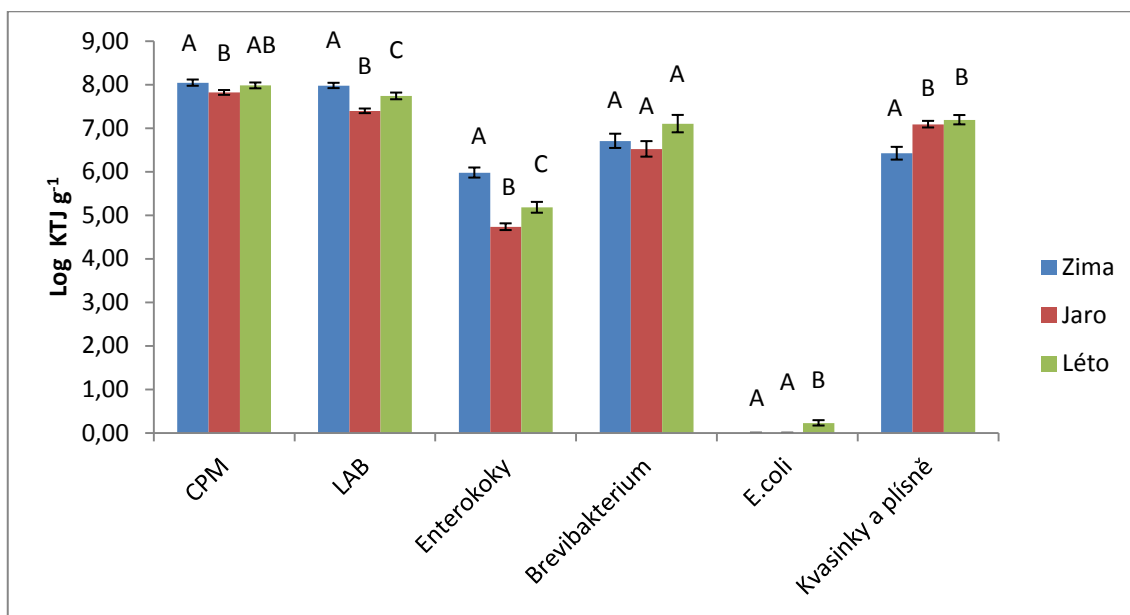


A, B – průměry označené různými písmeny se liší při $P < 0,05$ (jednoduché třídění analýzy rozptylu, post hoc Tukeyův test), $n = 579$

5.1.5 Roční období

Vzorky sýrů zrajících pod mazem byly odebrány ve třech ročních obdobích (jaro, léto, zima). V každém ročním období bylo provedeno všech 9 odběrů ve tvaru tyčinek a koleček. Počty MO v sýrech testovaných v různých ročních obdobích se u většiny MO průkazně lišily ($P < 0,05$; obr. 15). Výjimku tvořilo *Brevibacterium linens*, které roční období průkazně neovlivnilo ($P > 0,05$). Domníváme se, že v případě *Brevibacterium linens* to bylo způsobeno úpravou prostředí pro vhodný růst a rozvoj jak při zraní tak při skladování již při výrobě. Nejnižších hodnot dosahovaly počty MO převážně v jarním období.

Obr. 15 Počty testovaných MO v sýru zrajícím pod mazem v různých ročních obdobích

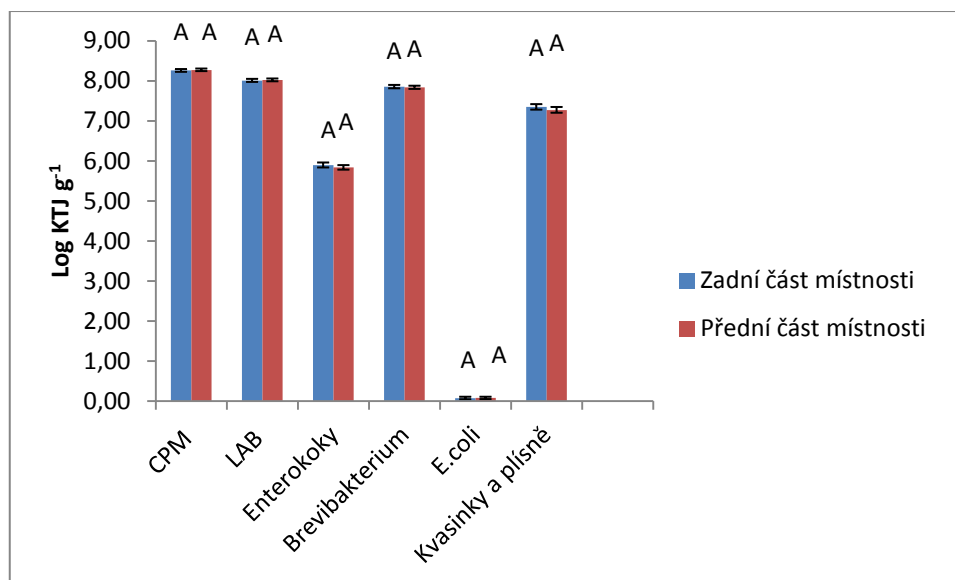


A, B, C – průměry označené různými písmeny se liší při $P < 0,05$ (jednoduché třídění analýzy rozptylu, post hoc Tukeyův test), $n = 695$

5.1.6 Umístění stojanu v sušárně

Jedním z dalších sledovaných faktorů bylo umístění vzorků v sušárně. Jeden z vozíků byl umístěn u vstupních dveří a druhý co nejdále od vstupního prostoru. Ani u jednoho ze sledovaných MO nebyl prokázán vliv umístění zracích vozíků v sušárně ($P > 0,05$; obr. 16). Tyto výsledky ukazují na kvalitní provedení sušárny s dobrou cirkulací vzduchu, která neumožňuje nerovnoměrné zrání ani při častějším vstupu do zracích místností.

Obr. 16 Počty MO v sýru zrajícím pod mazem při různém umístění vozíku v sušárně



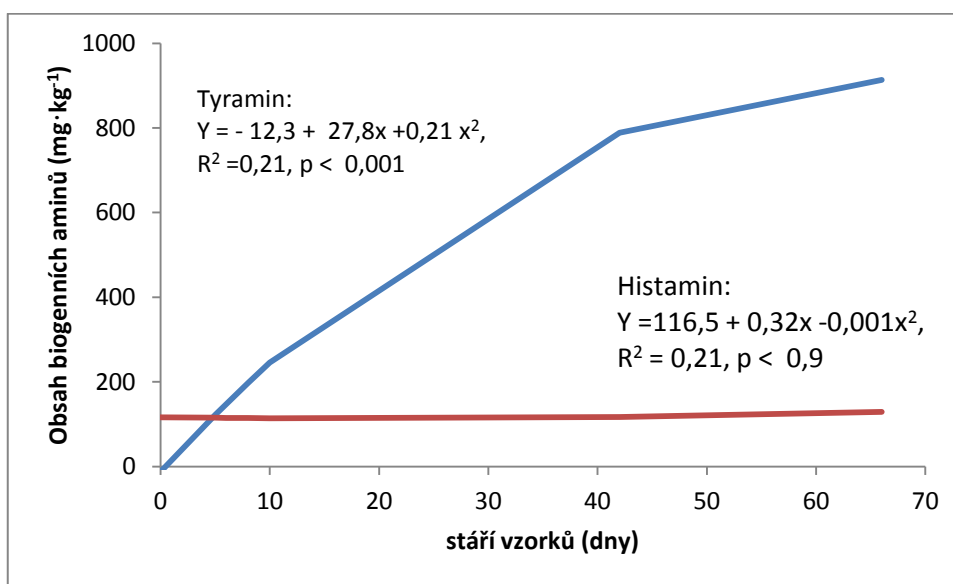
A, A – průměry označené stejnými písmeny se neliší při ($P > 0,05$; jednoduché třídění analýzy rozptylu, post hoc Tukeyův test), $n = 209$

5.2 Vliv sledovaných faktorů na množství biogenních aminů (BA)

5.2.1 Stáří vzorku

Obsah tyraminu během výroby a skladování rostl. Průměrná hodnota obsahu tyraminu na konci výroby (11. den) byla $380 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ na konci expirace (po 42 dnech od zahájení výroby) však dosahovala již $900 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$. Obsah histaminu se na rozdíl od tyraminu během celého experimentu výrazně neměnil (obr. 17).

Obr. 17 Vliv stáří vzorku na obsah tyraminu a histaminu, $n = 695$



Sýry mohou být velmi dobrým substrátem pro produkci a kumulaci biogenních aminů, hlavně tyraminu (Greifová a kol., 2003; Roig-Sagués a kol., 2002). Tyramin byl ze sledovaných BA jako jediný detekován v různých koncentracích u sýrů ve studii Guarcello a kol. (2014). Z kvantitativního pohledu byl u sýrů produkován nejvíce 2-fenylethylamin, ale ve značném množství se objevil tyramin, který byl detekován ve všech vzorcích (Gardini a kol., 2001)

Komprda a kol. (2007, 2008) popisuje histamin jako biogenní amin s vysokým výskytem v sýrech. U experimentu Buňková a kol. (2010) nebyl histamin v sýrech detekován ani v případě izolovaných a poté inkubovaných bakterií. Naopak Ladero, a kol. (2008) uvádějí podstatně vyšší množství histaminu (až do $1040 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) v sýrech vyrobených ze syrového, resp. pasterovaného kravského, kozího či ovčího mléka než byly v našem experimentu. Andiç a kol. (2010) zjistili ve svém experimentu

680 mg·kg⁻¹ histaminu v sýrech, které obsahovaly byliny. V zrajících sýrech vyrobených z ovčího mléka byla odhalena podstatně vyšší koncentrace tyraminu, až 1200 mg·kg⁻¹ (Andić a kol., 2010; Schirone a kol., 2011), oproti našemu experimentu.

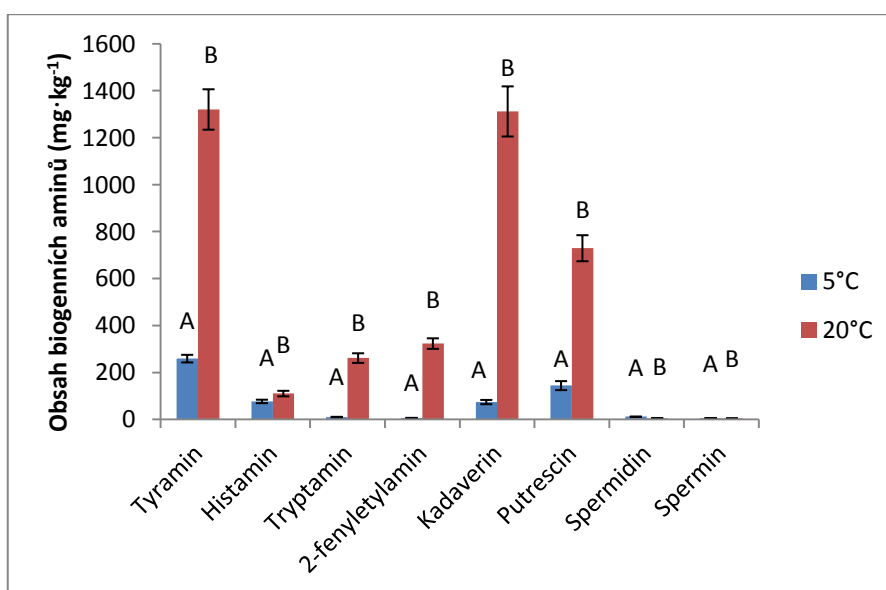
Obsahy BA mohou výjimečně dosáhnout až gramových hodnot v 1 kg sýra, což závisí na ošetření výchozí suroviny a technologických faktorech, jako jsou teplota sýřeniny, resp. použití startovacích a plísňových kultur (Kalač a Křížek, 1998). Za bezpečný obsah sumy histaminu, tyraminu, putrescinu a kadaverinu lze považovat hodnotu 900 mg·kg⁻¹ (Valsamaki a kol., 2000). V experimentu autorů Buňková a kol. (2010) byla v rámci 98 denního zrání a skladování eidamského typu sýra přítomnost tyraminu, putrescinu a kadaverin pozorována, histamin však zjištěn nebyl.

Doba zrání ve vztahu k tvorbě BA je klíčový parametr, je však nutné si uvědomit, že tvorba BA je výsledkem kombinace různých faktorů (Guarcello., 2014).

5.2.2 Teplota při skladování

Vliv teploty při skladování byl v předkládaném experimentu prokázán ($P < 0,05$) u všech testovaných BA (obr. 18).

Obr. 18 Množství jednotlivých BA v sýru zrajícím pod mazem po skladování 42 dnů 5 °C a 20 °C



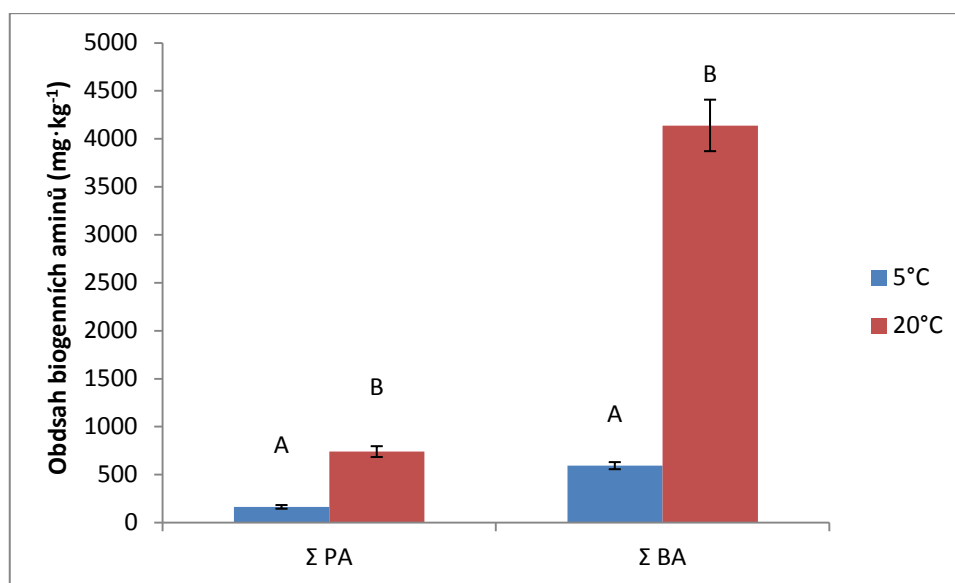
A, B – průměry označené různými písmeny se liší při $P < 0,05$ (jednoduché třídění analýzy rozptylu, post hoc Tukeyův test), $n = 192$

Teplota je jedním z faktorů, které mají největší vliv na obsah BA (Stratton a kol., 1991; Linares a kol., 2011). Ke stejnému zjištění došla i Standarová a kol. (2010), která ve své práci mluví až o dvojnásobném zvýšení histaminu, a to až na hodnotu 411 mg·kg⁻¹ oproti původní obsažené hodnotě. Jedná se o vysokou hodnotu, protože Halász a kol., (1994) a Silla-Santos, (1996) považují za toxickou dávku již 100 mg·kg⁻¹. Námi zjištěná hodnota na konci trvanlivosti produktu (42 dnů od zahájení výroby) byla 110 mg·kg⁻¹, což je mírně nad uvedenou hladinu, která je považována za toxickou. Po další době skladování (66 dní od dne výroby) dosáhl histamin hodnoty 142 mg·kg⁻¹ (obr. 20). Nejvyšších hodnot ze sledovaných BA dosáhl tyramin (1320 mg·kg⁻¹), kadaverin (1312 mg·kg⁻¹) a putrescin (730 mg·kg⁻¹). Nejnižších hodnot dosahovaly spermidin a spermin, a to stejně jako v experimentu Guarccella (2014), kde spermidin a spermin dosahovaly také nejnižších hodnot u různých typů italských sýrů nebo nebyly detekovány vůbec.

U experimentu autorů Buňková a kol. (2013) obsah sperminu a spermidinu v sýrech byl nízký a nepřekročil hodnoty 35 mg·kg⁻¹.

Celková hodnota BA dosažená v předkládaném experimentu na konci doby trvanlivosti při teplotě skladování 20 °C byla 4139 mg·kg⁻¹ a při teplotě 5 °C byla 593 mg·kg⁻¹ (obr. 19).

Obr. 19 Množství BA a PA v sýru zrajícím pod mazem při 5 °C a 20 °C po 42 dnech skladování

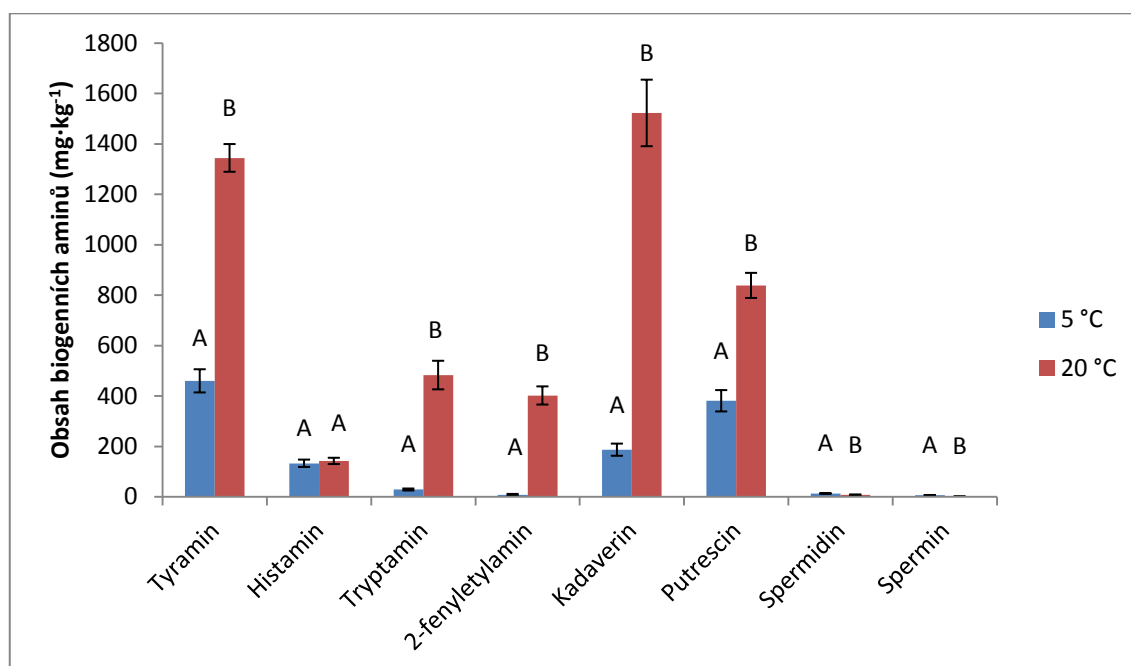


A, B – průměry označené různými písmeny v rámci dané skupiny aminů se liší při $P < 0,05$ (jednoduché třídění analýzy rozptylu, post hoc Tukeyův test), $n = 192$,

Σ PA= putrescin, spermin, spermidin, Σ BA= tyramin, histamin, phenylethylamin, kadaverin,

Vliv teploty skladování byl prokázán ($P < 0,05$) u všech sledovaných BA kromě histaminu ($P > 0,05$; obr. 20). Výsledky experimentu Standarové (2010) ukázaly, že obsah BA v sýrech je ovlivněn skladovací teplotou, nižší teploty (5 °C) snižovaly rychlost tvorby BA. V předkládané práci nejvyšších hodnot po 66 dnech skladování ode dne výroby dosahoval tyramin, kadaverin a putrescin, stejně jako v případě vzorků skladovaných 42 dnů (obr. 18). Chladírenské skladování sýrů nemůže zamezit tomu, aby se obsah tyraminu, putrescinu a kadaverin nezvyšoval (Buňková a kol., 2010).

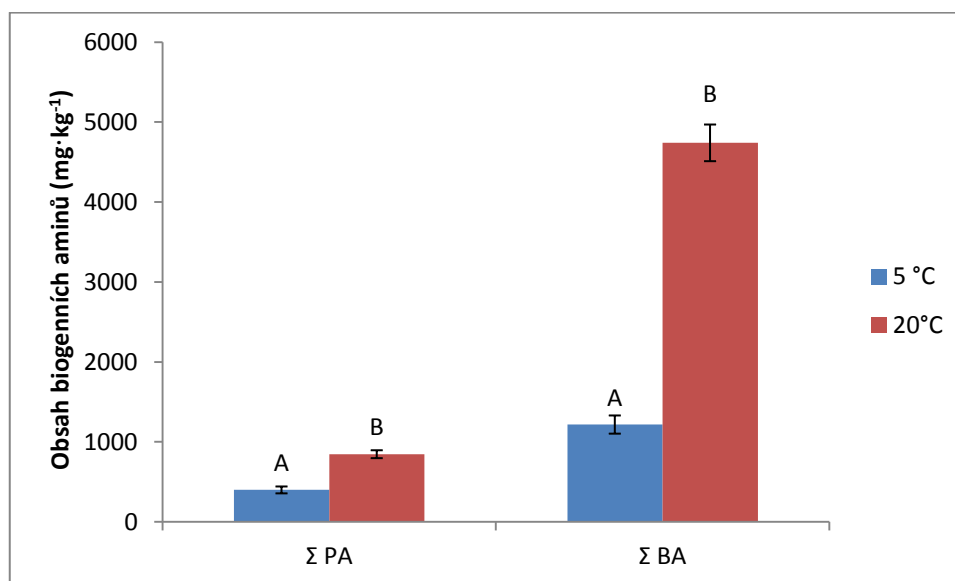
Obr. 20 Množství jednotlivých BA v sýru zrajícím pod mazem při 5 °C a 20 °C po 66 dnech skladování



A, B – průměry označené různými písmeny se v rámci jednotlivých aminů liší při $P < 0,05$ (jednoduché třídění analýzy rozptylu, post hoc Tukeyův test), $n = 178$

Obsah sumy BA dosažený na konci doby skladování po 66 dnech ode dne výroby při teplotě skladování 20 °C byl 4741 mg·kg⁻¹ a při teplotě 5 °C 1218 mg·kg⁻¹ (obr. 21).

Obr. 21 Množství BA a PA v sýru zrajícím pod mazem při 5 °C a 20° po 66 dnech



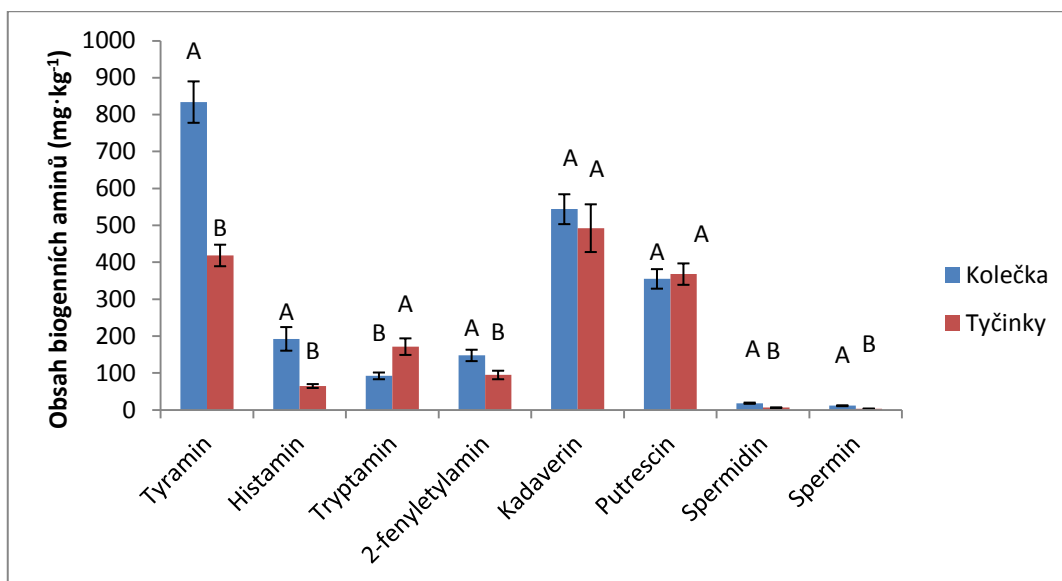
A, B – průměry označené různými písmeny se v rámci dané skupiny liší při $P < 0,05$ (jednoduché třídění analýzy rozptylu, post hoc Tukeyův test), $n = 178$

Σ PA = putrescin, spermin, spermidin, Σ BA = tyramin, histamin, phenylethylamin, kadaverin,

5.2.3 Tvar výrobku

Obsah kadaverinu resp. putrescinu byl výrobcích odlišného tvaru podobný ($P > 0,05$), u ostatních sledovaných biogenních aminů se hodnoty průkazně lišily při $P < 0,05$ (Obr. 22).

Obr. 22 Množství jednotlivých BA v sýru zrajícím pod mazem při různém tvaru výrobku

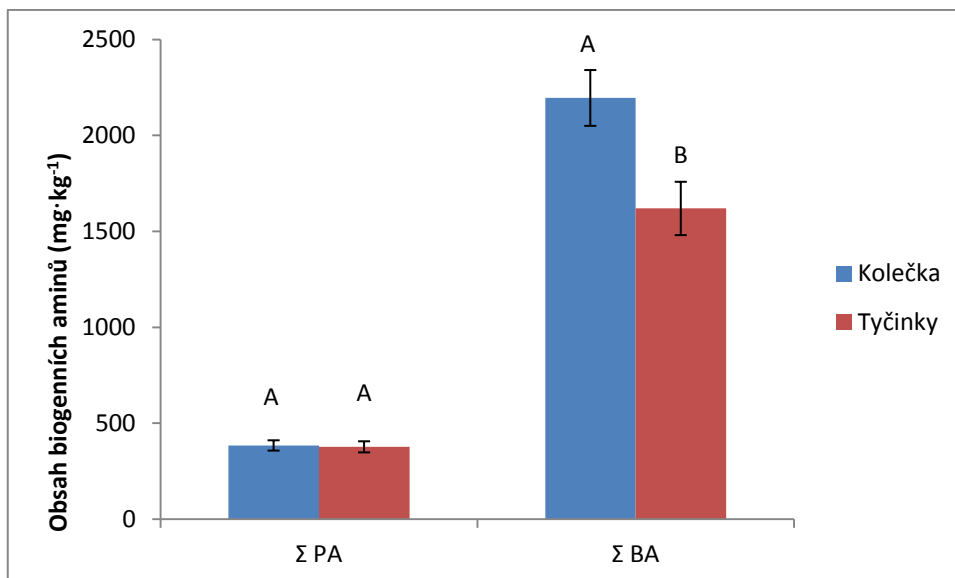


A, B – průměry označené různými písmeny se v rámci jednotlivých aminů liší při $P < 0,05$ (jednoduché třídění analýzy rozptylu, post hoc Tukeyův test), $n = 579$

V případě polyaminů nebyl vliv tvaru sýra na obsah BA prokázán ($P > 0,05$), ale v případě celkové sumy aminů se obsahy průkazně lišily ($P < 0,05$) a vyšších hodnot dosahovala kolečka (obr. 23). Při porovnání vlivu tvaru na počty mikroorganismů bylo zjištěno, že vyšší počty byly převážně zjištěny v sýrech tvaru tyčinek, tedy přesný opak vlivu tvaru na BA, kde vyšších hodnot BA nabývala kolečka. V případě korelačního koeficientů mezi obsah BA a počty mikroorganismů jsme dosáhly podobného zjištění, tedy, zatím co počet MO klesal obsah BA rostl jednalo se o minimální, někdy až záporné korelace.

Vliv tvaru výrobku na množství BA sledoval Petridis a Steinhart (1996) u eidamského typu sýru, porovnávali obsah BA v sýrech tvaru bochníku a bloku. Vyšší obsah BA byl u bochníků.

Obr. 23 Obsah BA a PA v sýru zrajícím pod mazem při různém tvaru výrobku



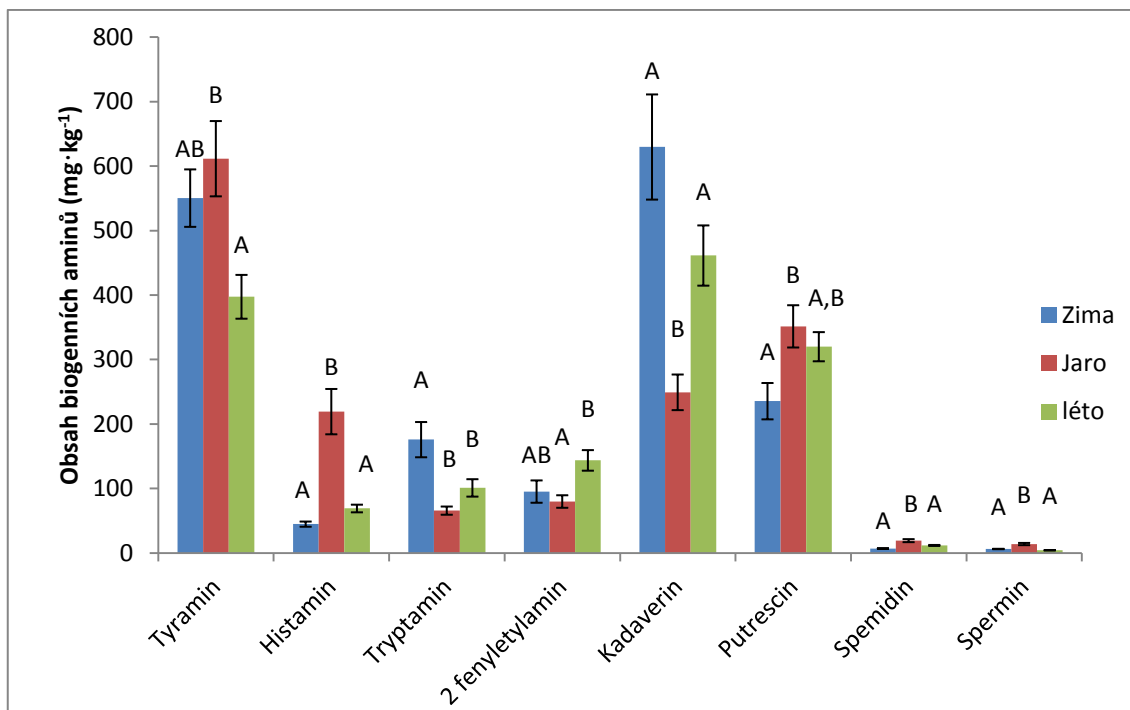
A, B – průměry označené různými písmeny se v rámci jednotlivých aminů liší při $P < 0,05$ (jednoduché třídění analýzy rozptylu, post hoc Tukeyův test), $n = 579$

Σ PA= putrescin, spermin, spermidin, Σ BA= tyramin, histamin, phenylethylamin, kadaverin,

5.2.4 Roční období

Tyramin dosahoval nejvyšších hodnot v jarním období ($611 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) v letním období byla jeho obsah průkazně nižší ($P < 0,05$; $397 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$). Vzorke sýrů zrajících pod mazem měli nejvyšší obsah polyaminů v jarním období. V jarním období výrazně vzrostl obsah histaminu $220 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ (obr. 24). Gaya a kol., (2005) sledovali obsah BA v různých ročních obdobích u sýrů vyrobených z ovčího mléka, kdy bylo zjištěno, že nejvyšší hodnota histaminu, tryptaminu a tyraminu byla na jaře a v zimě, tedy stejně jako v případě našeho experimentu.

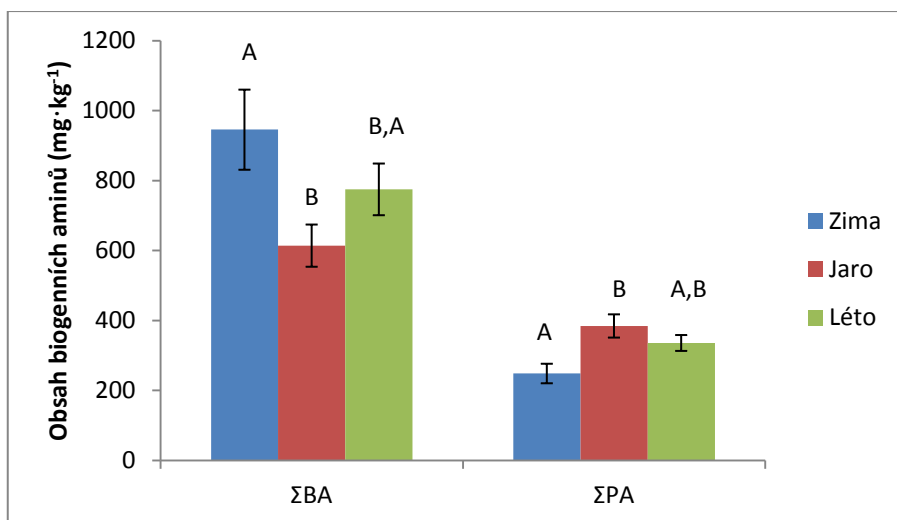
Obr. 24 Množství jednotlivých BA v sýru zrajícím pod mazem při různém ročním období



A, B – průměry označené různými písmeny se v rámci jednotlivých aminů liší při $P < 0,05$ (jednoduché třídění analýzy rozptylu, *post hoc* Tukeyův test), $n = 695$

Vliv ročního období na obsah BA byl statisticky průkazný ve sledovaných ročních obdobích ($P < 0,05$; zima, jaro, léto). Nejvyššího obsahu BA bylo dosaženo v zimním období ($945 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), zatímco nejnižších hodnot dosáhl obsah BA na jaře ($614 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) viz. obr. 25.

Obr. 25 Množství BA a PA v sýru zrajícím pod mazem při různém ročním období



A, B – průměry označené různými písmeny se v rámci jednotlivých aminů liší při $P < 0,05$ (jednoduché třídění analýzy rozptylu, post hoc Tukeyův test), $n = 695$

$\Sigma PA =$ putrescin, spermin, spermidin, $\Sigma BA =$ tyramin, histamin, phenylethylamin, kadaverin,

5.2.5 Souhrnné porovnání vlivu jednotlivých sledovaných faktorů na obsah BA

Roční období vysvětlilo 40% změn v obsahu histaminu. V případě vlivu teploty se jednalo pouze o 1%. U tyraminu bylo vysvětleno pouze 5% ročním obdobím, naopak teplota při skladování byly vysvětleny skoro 2/3změn v jeho obsahu.

V případě polyaminů resp. spermidinu a sperminu byl jejich obsah vysvětlen z 61 % a 55 % tvarem výrobku, což je zcela rozdílné od putrescinu, jehož obsah nebyl tvarem vysvětlen. Z vysvětlené variability v případě putrescinu byla nejvíce zastoupena teplota (65 %).

Teplota skladování a stáří vzorku tvořily nejvíce zastoupenou část z vysvětlené variability u sýru zrajícího pod mazem z námi sledovaných faktorů uvedených v tabulce 6.

Tabulka. 6 Rozsah účinků variability sledovaných faktorů na obsah biogenních aminů a polyaminů u sýrů zrajících pod mazem

Biogenní amin	Faktory variability (procenta vysvětlené variability ¹)			
	Roční období ²	Tvar ³	Teplota ⁴	Stáří vzorku ⁵
Tyramin	5	17	61	16
Hystamin	40	49	1	5
Tryptamin	4	9	70	17
2-phenyletylamin	1	2	80	17
Kadaverin	2	0	78	18
Putrescin	6	0	65	28
Spermidin	22	61	7	8
Spermin	25	55	5	14

¹podí sumy čtverců při použití obecného lineárního modelu vícestupňového třídění analýzy rozptylu, n = 695 roční období, teplotu, resp. stáří vzorků, n = 579 pro tvar,

² zima, jaro, léto

³ kolečka, tyčinky

⁴ zrající sýr skladovaný při 20°C nebo 5°C

⁵ nultý až 66. den

5.3 Screening dekarboxylázové aktivity, detekce genů pro tyrosindekarboxylázu

Díky finanční podpoře interní grantové agentury (IGA) byla u části vzorků provedena detekce genu kódujícího bakteriální tyrosindekarboxylázu. Pro detekci genů byla využita polymerázová řetězová reakce (PCR) se specifickými sekvencemi publikovaná v práci Coton a kol. (2003). Vzhledem k tomu, že česká sbírka mikroorganismů neneviduje informace o přítomnosti dekarboxylázové aktivity u sbírkových mikroorganismů, byly pro zavedení molekulárních metod použity vlastní izoláty získané ze vzorků sýrů. Vzorky bakteriálních kultur (bakterie mléčného kvašení, enterokoky, *Brevibacterium*) izolovaných ze vzorků sýrů, u kterých byla zjištěna přítomnost BA jak při kultivaci v DKM, tak při HPLC analýze, byly použity pro zavedení a optimalizaci PCR metody. Po optimalizaci reakce byl získaný PCR produkt podroben sekvenční analýze a porovnán s databází genové banky (GeneBank). Byla potvrzena sekvence genu kódující enzym tyrosindekarboxylázu (tyrDC). V případě histidindekarboxylázy nebyla ani u jednoho vzorku vybraných kultur aktivita tohoto enzymu detekována, proto nebylo možné optimalizaci PCR provést.

Pro finanční náročnost při optimalizaci metody bylo prověřeno pouze 76 izolátů. Na přítomnost genu TyrDC bylo prověřeno 37 izolátů bakterie rodu *Enterococcus spp.*

(tab. 7), 30 izolátů bakterií mléčného kvašení (tab. 8) a 9 izolátů bakterie rodu *Brevibacterium spp.*

U identifikace rodu *Enterococcus* byl proveden test na detekci aktivity pyrrolidonylarylamidasy pro potvrzení příslušnosti k danému rodu, následně byly vzorky prověřeny soupravou EN-COCCUStest, kde kromě tří vzorků, které nebylo možno identifikovat, se jednalo vždy o *Enterococcus faecalis*.

Z 37 získaných izolátů byly všechny pozitivní na TyrDC. Produkce biogenních aminů je vlastnost specifická spíše pro určité kmeny bakterií než vlastnost typická pro daný druh, takže různé kmeny téhož druhu se mohou lišit v produkci BA (Arena, Manca de Nadra ,2001; Kalač a Kříž, 2002). Pozitivní hodnoty korelace ($p < 0,001$) mezi počtem enterokoků a obsahem některých biogenních aminů potvrzují schopnost některých enterokoků produkovat BA, což bylo potvrzeno i v experimentu autorů Linares a kol. (2009).

Tab. 7 Screening bakterií rodu *Enterococcus* na přítomnost genů pro tyrosin-dekarboxylázu, ověření tvorby aminů po provedeném dekarboxylázovém zkumavkovém testu, metodou HPLC, identifikace izolátů EN-COCCUStestem

Vzorek	DKM	HPLC		PCR	PYRA-test	EN-COCCUStest
		tyr	his	tyr		
1	p	p	n	p	p	E. faecalis
2	p	p	n	p	p	E. faecalis
3	p	p	n	p	p	E. faecalis
4	p	p	n	p	p	E. faecalis
5	p	p	n	p	p	E. faecalis
6	p	p	n	p	p	E. faecium
7	p	p	n	p	p	E. faecalis
8	p	p	n	p	p	E. faecalis
9	p	p	n	p	p	E. faecalis
10	p	p	n	p	p	E. faecalis
11	p	p	n	p	p	E. faecalis
12	p	p	n	p	p	E. faecalis
13	p	p	n	p	p	E. faecalis
14	p	p	n	p	p	E. faecalis
15	p	p	n	p	p	E. faecalis
16	p	p	n	p	p	E. faecalis
17	p	p	n	p	p	E. faecalis
18	p	p	n	p	p	E. faecalis
19	p	p	n	p	p	E. faecalis
20	p	p	n	p	p	E. faecalis
21	p	p	n	p	p	E. faecalis
22	p	p	n	p	p	E. faecalis
23	p	p	n	p	p	E. faecalis
24	p	p	n	p	p	E. faecalis
25	p	p	n	p	p	E. faecalis
26	p	p	n	p	p	E. faecalis
27	p	p	n	p	p	E. faecalis
28	p	p	n	p	p	E. faecalis
29	p	p	n	p	p	-
30	p	p	n	p	p	-
31	p	p	n	p	p	-
32	p	p	n	p	p	E. faecalis
33	p	p	n	p	p	E. faecalis
34	p	p	n	p	p	E. faecalis
35	p	p	n	p	p	E. faecalis
36	p	p	n	p	p	E. faecalis
37	p	p	n	p	p	E. faecalis

p – pozitivní, n – negativní,

DKM- dekarboxylační medium, HPLC- vysokoúčinná kapalinová chromatografie, separační metoda,

PCR- polymerázová řetězová reakce

U bakterií mléčného kvašení v tab. 8 bylo 6 vzorků pozitivních při použití metody HPLC, tak i metodu PCR. Při použití dekarboxylačního media (DKM) však bylo pozitivních pouze 5 vzorků. Je vždy vhodné metody kombinovat pro zajištění správnosti výsledků. Nezanedbatelná je i přítomnost falešně pozitivních a falešně negativních výsledků. Z těchto důvodů musí být produkce BA potvrzena analytickými kvantitativními metodami (Kalhotka a kol., 2011). Riziko falešně pozitivních výsledků při stanovení produkce biogenních aminů potvrzují např. Actis a kol. (1999) a Buňková a kol. (2009). Kultivované bakterie mohou produkovat látky s alkalickou reakcí (jiné než biogenní aminy), které mohou ovlivnit výsledky zkoušky založené na změně pH (barvy indikátoru). U bakterií mléčného kvašení v tab. 8 bylo 6 vzorků pozitivních při použití metody HPLC, tak i metodu PCR. Při použití dekarboxylačního media (DKM) však bylo pozitivních pouze 5 vzorků. Je vždy vhodné metody kombinovat pro zajištění správnosti výsledků. Nezanedbatelná je i přítomnost falešně pozitivních a falešně negativních výsledků. Z těchto důvodů musí být produkce BA potvrzena analytickými kvantitativními metodami (Kalhotka a kol., 2011). Riziko falešně pozitivních výsledků při stanovení produkce biogenních aminů potvrzují např. Actis a kol. (1999) a Buňková a kol. (2009). Kultivované bakterie mohou produkovat látky s alkalickou reakcí (jiné než biogenní aminy), které mohou ovlivnit výsledky zkoušky založené na změně pH (barvy indikátoru).

Tab. 8 Screening bakterií mléčného kvašení na přítomnost genů pro tyrosindekarboxylázu u vybraných vzorků, ověření tvorby aminů po provedeném dekarboxylázovém zkumavkovém testu metodou HPLC,

Vzorek	DKM	HPLC		PCR
		tyr	his	tyr
1	n	n	n	n
2	n	n	n	n
3	n	n	n	n
4	p	p	n	p
5	p	p	n	p
6	n	n	n	n
7	n	n	n	n
8	n	n	n	n
9	n	n	n	n
10	n	n	n	n
11	n	n	n	n
12	p	p	n	p
13	n	n	n	n
14	n	n	n	n
15	n	n	n	n
16	n	n	n	n
17	n	n	n	n
18	n	n	n	n
19	p	p	n	p
20	n	n	n	n
21	n	n	n	n
22	n	n	n	n
23	n	n	n	n
24	p	p	n	p
25	n	n	n	n
26	n	n	n	n
27	n	n	n	n
28	n	p	n	p
29	n	n	n	n
30	n	n	n	n

p – pozitivní, n – negativní,

DKM- dekarboxylační médium

HPLC- vysokoučinná kapalinová chromatografie, separační metoda

PCR- polymerázová řetězová reakce

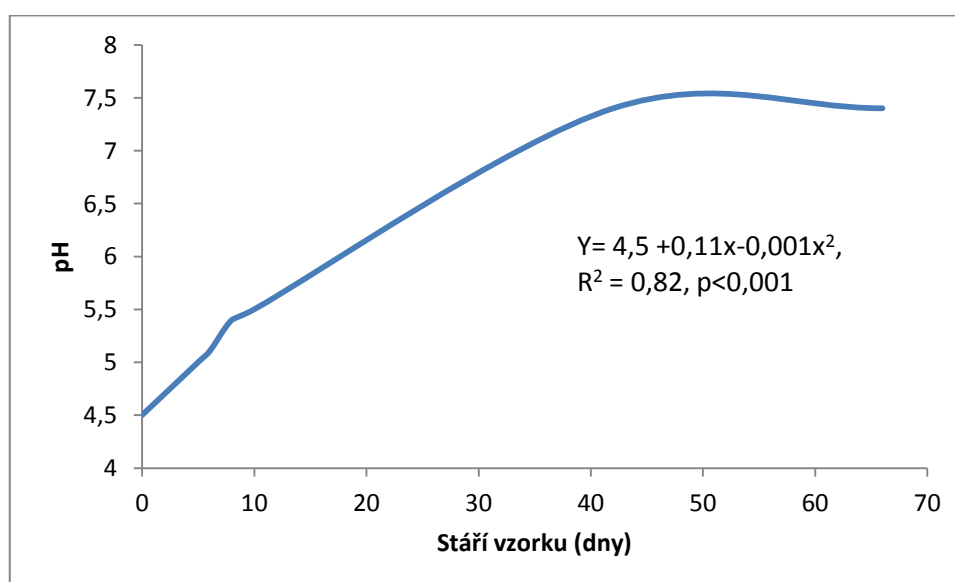
V rámci předkládaného experimentu bylo prověřeno také *Brevibacterium linens* na detekci dekarboxylázové aktivity (pomocí dekarboxylačního media, HPLC a PCR), ani v jednom z 9 vzorků však nebyl zaznamenán pozitivní výsledek. Proto bychom z pohledu BA označili tuto bakteriální kulturu využívanou pro výrobu tohoto typu sýru jako bezpečnou s hlediska tvorby BA.

5.4 Stanovení pomocných ukazatelů (pH, sušina, NaCl)

Mezi faktory, které ovlivňují tvorbu BA u bakterií, patří teplota, pH prostředí, anaerobióza, dostupnost uhlíku (např. glukózy) aj. (Graif a kol., 2006; Gardini a kol., 2005; Bover-Cid a kol., 2008).

Vliv pH na obsah biogenních aminů je jedním z faktorů podílejících se na produkci BA (Linares a kol. 2011). Toto pravidlo se potvrdilo i v našem experimentu hodnota pH postupně narůstala (obr. 26), stejně jako obsah tyraminu (obr. 17), který dosáhl až hodnot $913 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$. Koeficienty korelace mezi obsahem tyraminu, kadaverinu resp. putrescinu a pH výrobku dosahovaly hodnot 0,443, 0,407 resp. 0,487 ($P < 0,001$).

Obr. 26 Vliv stáří vzorku na hodnotu pH, $n = 695$

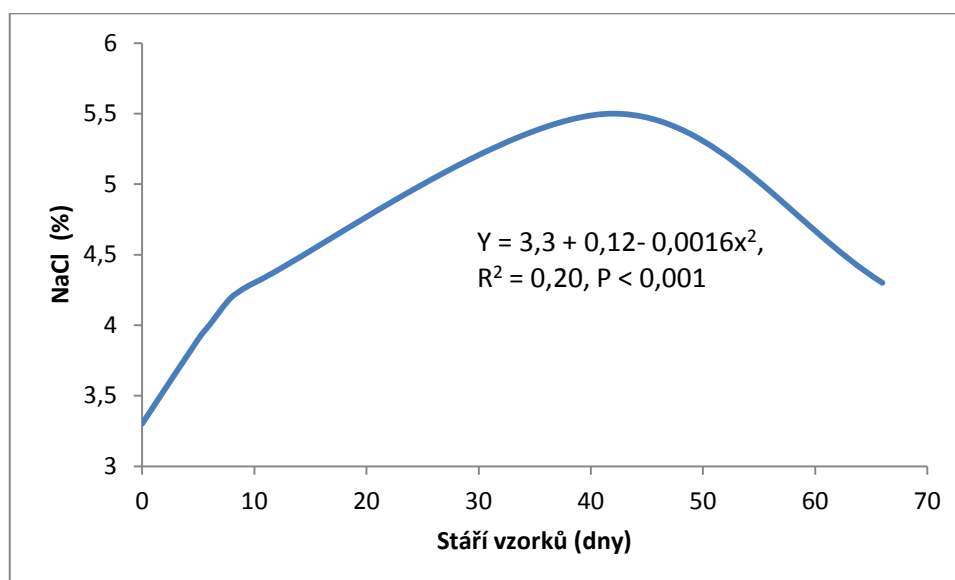


Korelační koeficienty mezi pH výrobku na jedné straně a obsahem tyraminu, putrescinu resp. kadaverinu se pohybovaly v rozmezí 0,61 a 0,73 ($P < 0,001$). Je tedy

zřejmé, že hodnoty pH mohly významně ovlivnit aktivitu enzymů BMK (Smit a kol., 2005). Stejně tak Gardini a kol. (2001) a Santos a kol. (2003) potvrzují ve svých studiích, že hodnoty pH a NaCl mají významný vliv na produkci BA. V experimentu Buňková a kol. (2010) ve 43. dnu skladování se hodnoty pH pohybovaly v rozsahu 5,53 a 5,64 u všech vzorků a vrstev eidamského typu sýrů. pH sýra 5.0-6.5 je optimální pro činnost většiny dekarboxyláz a bylo zjištěno, že produkce BA se urychluje vysokou teplotou během výroby a prodlouženým procesem zrání (Gardini a kol., 2001; Santos a kol., 2003; Buňková a kol., 2010; Martuscelli a kol., 2005; Marino a kol., 2008).

Změny koncentrace NaCl ve výrobcích v průběhu výroby, zrání a skladování ukazuje (obr. 27).

Obr. 27 Vliv stáří vzorku na % NaCl, $n = 695$



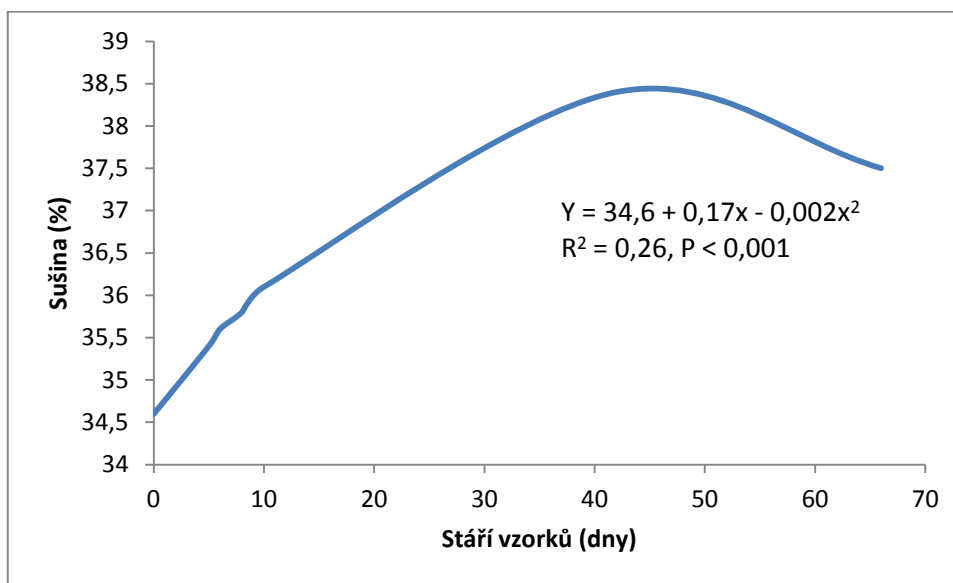
Koncentrace NaCl do 2,2% zvyšuje rychlost nárůstu obsahu tyraminu produkovaného druhem *E. faecium* avšak v případě *E. faecalis* rychlost nárůstu tyraminu lineárně klesala s rostoucí koncentrací NaCl (Greifová, 2003). Koncentrace NaCl 1 resp. 1,3% měla příznivý vliv na růst *E. faecalis* i *E. faecium*, se zvyšující koncentrací NaCl růstová rychlost pomalu klesala u Greifové, (2003).

Korelační koeficienty mezi obsahem sušiny a obsahem kvantitativně nejvýznamnějších BA (tyramin, kadaverin, putrescin) dosahovaly nízkých hodnot (0,265, 0,148, 0,215) byly však vysoce průkazné ($P < 0,001$). Podobné korelační

koeficienty zjistil Buňková (2010) v experimentu se sýrem eidamského typu (korelační koeficienty 0,1136, 0,2357).

Hodnota sušiny se pohybovala na začátku předkládaného experimentu okolo 34,6 %. Nejvyšších hodnot dosahovala mezi 40. až 50. dnem ode dne výroby 38,4 % (obr. 28).

Obr. 28 Vliv stáří vzorku na obsah sušiny, $n = 695$



6 ZÁVĚR

V rámci experimentu byl sledován vliv vybraných faktorů na počty MO a obsah BA. U vzorků sýrů zrajících pod mazem, které byly skladovány 66 dnů ode dne výroby, byl prokázán nárůst MO do 40. až 50. dne, poté docházelo k postupnému poklesu sledovaných MO. Bakterie mléčného kvašení na konci doby trvanlivosti (42. den ode dne výroby) dosahovaly průměrné hodnoty 8,6 log KTJ g⁻¹. Počty bakterie rodu *Enterococcus* dosahovaly na konci trvanlivosti sýru zrajících pod mazem průměrných hodnot 6,9 log KTJ g⁻¹. Obsah tyraminu v průběhu skladování statisticky průkazně rostl (P<0,001), jeho průměrná hodnota ve 42. dnu ode dne výroby byla 900 mg·kg⁻¹. Obsah histaminu se na rozdíl od tyraminu během celého experimentu výrazně neměnil.

Vliv teploty skladování na obsah BA a na počty MO byl statisticky prokázán P<0,05. V předchozích studiích patřila teplota skladování k významným faktorům ovlivňujících obsah BA. Celková hodnota obsahu BA dosažená na konci doby trvanlivosti při teplotě skladování 20 °C byla 4139 mg·kg⁻¹, při teplotě skladování 5 °C byla hodnota výrazně nižší 593 mg·kg⁻¹. Na konci doby skladování (po 66 dnech ode dne výroby) při teplotě skladování 20 °C byl obsah BA 4741 mg·kg⁻¹ a při teplotě 5 °C 1218 mg·kg⁻¹.

Vliv teploty skladování na bakterie mléčného kvašení a *Brevibacterium linens* nebyl statisticky průkazný (P>0,05) na rozdíl od ostatních sledovaných MO v případě skladování při 42 dnech. Po dalším měření v 66 dnech však i u těchto bakterií nastal statisticky průkazný rozdíl (P<0,05).

Vzorky sýrů skladované po 42 dnech od začátku výroby, které byly skladovány při 5 °C, dosahoval, vyšších hodnot než v případě skladování při 20 °C, a to jak v případě 42, tak i po 66 dnech. Počty enterokoků po 42 dnech ode dne výroby byly při 5 °C 6,49 log KTJ g⁻¹ a při 20 °C 6,19 log KTJ g⁻¹. Došli jsme k závěru, že ve vzorcích skladovaných při teplotě 20 °C došlo v průběhu skladování k vyčerpání živin pro sledované MO a docházelo tzv. odumírání a poklesu MO.

V rámci našeho experimentu byly odebírány vzorky po formování ve dvou různých tvarech (kolečka, tyčinky). Zatímco u enterokoků, *Brevibacterium linens* a *E. coli* nebyl vliv tvaru prokázán (P>0,05), u zbývajících MO se hodnoty u jednotlivých tvarů průkazně lišily. Počty MO ve výrobcích tvaru tyčinek dosahovaly vyšších hodnot, tedy přesný opak vlivu tvaru na obsah BA, kde vyšších hodnot dosahovaly výrobky

tvaru koleček. V případě korelačního koeficientů mezi obsah BA a počty mikroorganismů jsme dosáhly podobného zjištění, zatím co počet MO klesal, obsah BA se zvyšoval, jednalo se o minimální, někdy až záporné korelace.

Vliv ročního období na obsah BA a počty MO byl statisticky průkazný ve sledovaných ročních obdobích ($P < 0,05$; zima, jaro, léto). Výjimku tvořilo *Brevibacterium linens*, které roční období statisticky průkazně neovlivnilo vůbec. Nejnižších hodnot dosahovaly MO převážně v jarním období. Nejvyššího obsahu BA bylo dosaženo v zimním období, hodnota byly $945 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, zatímco nejnižší obsah byl na jaře ($614 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), stejně jako v případě počtu MO.

Při souhrnném porovnání vlivu jednotlivých faktorů na obsah BA lze říci, že teplota skladování a stáří vzorku tvořila nejvíce zastoupenou část z vysvětlené variability u sýrů zrajících pod mazem. V případě polyaminů resp. spermidinu a sperminu byl jejich obsah oproti ostatním BA z 61%, 55 % vysvětlen tvarem výrobku, což je zcela odlišné od putrescinu, jehož obsah nebyl tvarem vysvětlen.

V našem experimentu bylo několik bakterií získaných ze vzorků sýrů zrajících pod mazem prověřeno na tyrozindekaroxylázu (tyrDC). Z 30 izolovaných vzorků bakterií mléčného kvašení bylo 6 označených jako pozitivních na tyrDC, a to jak metodou HPLC, tak metodou PCR. Z 37 použitých izolátů bakterií rodu *Enterococcus* byly všechny pozitivní na TyrDC.

V rámci experimentu bylo prověřeno také *Brevibacterium linens*, ani v jednom z 9 izolátů nebyl zaznamenán pozitivní výsledek na tyrDC, proto bychom z pohledu BA označili tuto bakteriální kulturu jako bezpečnou s hlediska tvorby BA.

SEZNAM LITERATURY

- ACTIS L. A., SMOOT J. C., BARANCIN C. E., FINDLAY R. H., 1999: Comparison of differential plating media and two chromatography techniques for the detection of histamine production in bacteria. *J. Microbiologie Methods* 39, 79- 90
- ANCIN-AZPILICUETA C., GONZALES-MARCO A., JIMENEZ-MORENO N., 2008: Current knowledge about the presence of amines in wine, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 48, 257–275
- ANDIC S., GENCCLEP H., KOSE S., 2010: Determination of biogenic amines in herby cheese, *International Journal of Food Properties* 13, 1300–1314
- ARENA M. E., MANCA DE NADRA M. C., 2001: Biogenic amine production by *Lactobacillus*. In *Journal of Applied Microbiology* 90, 158-162
- BARDÓCZ S., GRANT G., BROWN D. S., RALPH A., PUSZTAI A., 1993: Polyamines in food implications for growth and health. *Nutr Biochem*, 66-71
- BERÁNKOVÁ J., 2010: Označování olomoucké tvarůžky- zapsány do rejstříku CHZO, *Mlékařské listy* 123, 19 s.
- BOCKELMANN W., 2002: Development of defined surface startercultures for the ripening of smear cheeses, *International Dairy Journal* 12, 123–131
- BOCKELMANN W., 2002: Smear-ripened cheeses. In H. Roginski, J.W. Fuquay, & P. F. Fox (Eds.), *Encyclopedia of dairy science*, London: Academic Press, 391–401
- BOCKELMANN W., WILLEMS K. P., NEVA H., HELLER K. H., 2005: Cultures for the ripening of smear cheeses, *International Dairy Journal* 15, 719 -732
- BOCKELMANN W., WILLEMS P., JAEGER B., HOPPER-SEYLER T. S., ENGEL G., HELLER K. J. (2002). Reifung von Harzer Kase, *Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte* 54, 317–335.
- BOCKELMANN W., WILLEMS P., RADEMAKER J., NOORFMAN W., HELLER K. J., 2003: Kulturen für die Oberflächenreifung eschmierter Weichkäse, *Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte* 55, 277–299
- BOVER-CID S., HOLZAPFEL W. H., 1999: Improved screening procedure for biogenic amine production by lactic acid bacteria, *International Journal of Food Microbiology* 53, 33-41

BOVER-CID S., IZQUIRDO-PULIDO M., VIDAL-CAROU M.C., 2001m Effect of the interaction between a low tyramine-producing *Lactobacillus* and proteolytic staphylococci on biogenic amine production during ripening and storage of dry sausages, *Food Microbiol.* 65, 113 -123

BOVER-CID S., MIGUÉLEZ-ARRIZADO M. J., BECKER B., HOLZAPFEL W. H., VIDAL-CAROU M. C., 2008: Amino acid decarboxylation by *Lactobacillus curvatus* CTC273 affected by the pH and glucose availability, *Food Mikrobology* 25, 269- 277

BRENNAM N. M., WARD A. C., BERESFORD T. P., FOX P. F., GOODFELLOW M., COGAN T. M. 2002: Biodiversity of the bacterial flora on the surface of a smear cheese. *Applied and Environmental Microbiology* 68, 820–830

BUŇKA F., BUDINSKÝ P., ČECHOVA M., DRIENOVSKÝ V., PACHLOVA V., MATOULKOVA D., KUBAŇ V., BUŇKOVÁ L., 2012: Content of biogenic amines and polyamines in beers from the Czech Republic, *Journal of the Institute of Brewing* 118, 213–216

BUŇKOVÁ L., ADAMCOVÁ G., HUDCOVÁ K., VELICHOVÁ H., PACHLOVÁ V., LORENCOVÁ E., BUŇKA F., 2013: Monitoring of biogenic amines in cheeses manufactured at small-scale farms and in fermented dairy products in the Czech Republic, *Food Chemistry* 141, 548 – 551

BUŇKOVÁ L., BUŇKA F., MANTLOVÁ G., CABLOVÁ A., SEDLÁČEK I., ŠVEC P., 2010: The effect of ripening and storage conditions on the distribution of tyramine, putrescine and cadaverine in Edam-cheese, *Food Microbiology* 27, 880-888

BUŇKOVÁ L., BUŇKA F., HLOBILOVÁ M., VAŇATKOVÁ Z., NOVÁKOVÁ D., DRÁB V., 2009: Tyramine production of technological important strains *Lactobacillus*, *Lactococcus* and *Sterptococcus*, In *European Food research and Technology* 229, 533-538

CEMPÍRKOVÁ R., LUKÁŠOVÁ J., HEJLOVÁ Š., 1997: *Mikrobiologie potravin*, Jihočeská univerzita, zemědělská fakulta, České Budějovice, 165 s., ISBN 80-7040-254-7

COTON M., DELBES-PAUS C, IRLINGER F., DESMASURES N., LE FLECHE A, STAHL V., MONTEL M. C., COTON E., 2012: Diversity and assessment of potential risk factors of gram-negative isolates associated with Fench cheeses, *Food Microbiol* 29, 88-98

- CWIKOVÁ O., 2009: Bakterie podílející se na produkci biogenních aminů ve vybraných fermentovaných potravinách, Disertační práce (In MS, dep. Knihovna MEDELU v Brně), Mendelova Univerzita v Brně, Brno 114 s.
- ČERNÝ V., KVASNIČKOVÁ E., HAVLÍKOVÁ Š., KALHOTKA L., 2009: Výskyt mikroorganismů s dekarboxylázovou aktivitou v sýrech, Mlékařské listy 16, 16 -18 s.
- ELISKASES-LECHNER F., GINZINGER W., 1995: The bacterial flora of surface-ripened cheeses with special regard to coryneforms. LeLait 75, 571–583
- FAVARO, G., PASTORE, P., SACCANI, G., CAVALLI, S., 2007. Determination of biogenic amines in fresh and processed meat by ion chromatography and integrated pulsed amperometric detection on Au electrode. Food Chemistry 105, 1652–1658
- FERNÁNDEZ M., LINARES D. M., RODRÍGUEZ A., ALVAREZ M. A., 2007: Factors effecting tyramine production in *Enterococcus durans* IPLA 655. In Applied Microbiology and Biotechnology 73, 1400-1406
- FERNARDEZ M., LINARES D., DEL RIO B., LADERO V., ALVAREZ M., 2007: HPLC quantification of biogenic amines in cheeses: correlation with PCR-detection of tyramine-producing microorganisms. Journal of Dairy Research 74, 276-282
- GARDINI F., MARTUSCELLI M., CARUSO M. C., GALGANO F., CRUDELE M. A., FAVATI F., GUERZONI M. E., SUZZI G., 2001: Effects of pH, temperature and NaCl concentration on the growth kinetics, proteolytic activity and biogenic amine production of *Enterococcus faecalis*, International Journal of Food mikrobiology 64, s. 105-117
- GARDINI F., ZACCARELLI A., BELLETI N., FAUSTINI F., CAVAZZA A., MARTUSCELLI M., MASTROCOLA D., SUZZ, G., 2005: Factors influencing biogenic amine production by a strain of *Oenococcus oeni* in a model systém. In Food Control 16, 609-616
- GARG S. K., MITAL B. K., 1991: Enterococci in milk and milk of cheese ripening, a review. Journal Dairy Sci. 68, 801–807 s.
- GAYA P., SÁNCHEZ C., NUNEZ M., FERNANDEZ- GARCIA E., 2005: Proteolysis during ripening of manchego cheese made from raw or pasteurized ewes milk. Seasonal variation journal Dairy res 72, 287 -295 s.
- GIRAFFA G., CARMINATI D., NEVIANI E., 1997: Enterococci isolated amines active in food, a review, Journal Milk Food Technol 39, 353- 358

- GORNER, F., VALÍK, L., 2004: Aplikovaná mikrobiológia požívateľín. Malé centrum Bratislava, ISBN: 80-967064-9-7
- GREIF G., GREIFOVÁ M., 2006: Štúdium analýzy biogenných amínov vo vybraných mliečnych výrobkoch, Mliekarstvo 8, 38-42 s.
- GREIF G., GREIFOVÁ M., KAROVIČOVÁ J., 2006: Effects of NaCl concentration and initial pH value on biogenic amine formation dynamics by *Enterobacter sp.* bacteria in model conditions, In journal of food and Nutrition research 45, 21-29
- GREIFOVÁ M., GREIF G., LEŠKOVÁ E., MÉRIOVÁ K., 2003: Enterokoky - ich hodnotenie v mliekarenskej technológii, Mliekarstvo, 42 -45 s.
- GREIFOVÁ M., GREIF G., NOVOROLNÍKOVÁ B., KUBOVÁ A., 2003: Biogénne aminy v mliečnych výrobkoch a ich tvorba enterokokami, Mliekarstvo 4/34, 31-33 s.
- GRIEGR C., HOLEC, 1990: Hygiena mlieka a mliečnych výrobkov. Příklad, Bratislava. 39 - 49 s.
- GUARCELLO R., DIVICCARO A., BARBERA M., GIANCIPPOLI E., SETTANNI L., MINERVINI F., MOSCHETTI G., GOBBETTI M., 2015: A survey of the main technology, biochemical and microbiological features influencing the concentration of biogenic amines of twenty Apulian and Sicilian (Southern Italy)cheeses, International Dairy Journal 43, s 61-69
- HALÁSZ A., BARATH A., SIMON-SAKARDI L., HOLZAPFEL W., 1994: Biogenic amines and their production by microorganisms, Trends Food Sci Technol, 42-49 s.
- HAVLOVÁ J., JIČÍNSKÁ E., HRABOVÁ H., 1993: Mikrobiologické metody v kontrole jakosti mléka a mlékárenských výrobků, Praha, 243 s.
- HOŘÁČKOVÁ Š., ŠVIRAKOVÁ E., 2009. Probiotické mikroorganismy v mlékárenském průmyslu, Mlékárenské listy 113/114, Věda a Výzkum 12 -14 s.
- CHIACCHIERINI, E., RESTUCCIA, D., VINCI, G., 2006: Evaluation of two different extraction methods for chromatographic determination of bioactive amines in tomato products. Talanta 69, 548–555
- INNOCENTE N., BIASUTTI M., PADOVESE M., MORET S., 2007: Determination of biogenic amines in cheese using HPLC technique and direct derivatization of acid extract, Food Chemistry 101, 1285–1289 s.
- KALÁČ P., KRÍŽEK M., 2002: Biogenní aminy a polyaminy v potravinách, Výživa a potraviny, 12-13 s.

- KALACĚ, P., KRĚIŐEK, M., 2005: Biogenní aminy a polyaminy v potravinách a jejich vliv na lidské zdraví., Potravinářská revue, 40-42 s.
- KALHOTKA L., NĚMCOVÁ M., VYLETĚLOVÁ M., HAVLÍKOVÁ Š., 2011: Dekarboxylasová aktivita *Bacillus licheniformis* a její ovlivnění teplotou a dobou kultivace, Mlékárenské listy 124, 8-11s.
- KAROVIČOVÁ J., KOHAJDOV Z., 2005: Biogenic Amines in Food, Chem Papers 70-79 s
- KOMPRDA T., 2004: Obecná hygiena potravin, MZLU v Brně, 145 s.
- KOMPRDA T., SMĚLÁ D., NOVICKÁ K., KALHOTKA L., ŠUSTOVÁ K., PECHOVÁ P., 2007: Content and distribution of biogenic amines in dutch-type hard cheese, Food Chemistry 102/1, 129-137 s.
- KOMPRDA, T., 2005: Biogenní aminy a polyaminy ve fermentovaných potravinách živočišného původu, Veterinářství, 646 -650 s.
- KOMPRDA T., REJCHRTOVÁ E., SLÁDKOVÁ P., ZEMÁNEK L., VYMLÁTILOVÁ L.: Effect of some external factors on the content of biogenic amines and polyamines in a smear-ripened cheese, *Dairy Science & Technology*. 2012. sv. 92, č. 4, s. 367-382. ISSN 1958-5586.
- KONGO J. K., GOMES A. M., MALCATE F. X., MCSWEENEY P. L H., 2009: Microbiological, biochemical and compositional changes during ripening of São Jorge- a raw milk cheese from the Azores (Portugal), Food Chemistry 112, 131- 138
- KRĚIŐEK M., KALACĚ P., 1998: Biogenní aminy v potravinách a jejich role ve výživě, Czech J Food Sci., 151-159 s.
- LADERO V., CANEDO E., PEREZ M., MARTIN M. C., FERNANDEZ M., ALVAREZ M. A., 2012. Multiplex qPCR for the detection and quantification of putrescine producing lactic acid bacteria in dairy products, Food Control 27, 307–313s.
- LADERO V., FERNÁNDEZ M., CUESTA I., ÁLVAREZ M. A., 2010: Quantitative detection and identification of tyramine- producing enterococci and lactobacilli in cheese by multiplex qPCR, Food Microbiol 27. 933 -939
- LADERO V., FERNANDEZ M., ALVAREZ M. A., 2009: Effect of post-ripening processing on the histamine and histamine-producing bacteria contents of different Cheeses, International Dairy Journal 19, 759-762

LADERO V., LINARES D. M., FERNANDEZ M., ALVAREZ M. A., 2008: Real time quantitative PCR detection of histamine-producing lactic acid bacteria in cheese: Relation with histamine content, *Food Research International* 41, 1015–1019

LINARES D. M., FERNÁNDEZ M., CRUZ MARTIN M., ÁLVAREZ M. A., 2009: Tyramine biosynthesis in *Enterococcus durans* is transcriptionally regulated by the extracellular pH and tyrosine concentration, *Microbial Biotech* 2, 625-633 s.

LINARES, D. M., CRUZMARTÍN, M., LADERO, V., ÁLVAREZ M. V., 2011: Biogenic amines in dairy products. *Crit Rev Food Sci Nutr* , 691-703

LOIZOO M. R., MENICHINI F., PICCI N. PUOCI F., SPIZZIRRI U. G., RESTUCCIA D., 2013: Technological aspects and analytical determination of biogenic amines in cheese, *trend in Food Science and technology* 30 (2013) 38- 45

LUKÁŠOVÁ a kol., 2001: Hygiena a technologie mléčných výrobků, *Veterinární a Farmaceutická univerzita Brno*, 180 s.

MARINO M., MAIFRENI M., BARTOLOMEOLI I., RONDININI G., 2008: Evaluation of amino acid-decarboxylative microbiota throughout the ripening of an Italian PDO cheese produced using different manufacturing practices. *Journal of Applied Microbiology* 105, 540–549

MARTUSCELLI M., GARDINI F., TORRIANI S., MASTROCOLA D., SERIO A., CHAVES-LOPEZ C., SCHIRONE M., SUZZI, G., 2005: Production of biogenic amines during the ripening of Pecorino Abruzzese cheese, *International Dairy Journal* 15, 571–578

NAŘÍZENÍ KOMISE (ES) č.2073/2005 o mikrobiologických kriteriích pro potraviny

PEREIRA, V., PONTES, M., CAMARA, J.S., MARQUES, J.C., 2008. Simultaneous analysis of free amino acids and biogenic amines in honey and wine samples using in look orthophthalaldehyde derivatization procedure. *Journal of Chromatography A* 1189, 435–443

PETRIDIS K. D., STEINHART H., 1996: biogenic amine in der Hartkäseproduktion .I. Einfluß verschiedener Parameter auf den Amingehalt im Endprodukt am Beispiel von Emmentaler Käse. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau* 92, 114 -120

PINTADO A. I. E., PINHO O., FERREIRA I.M.P.L.V.O., PINTADO M. M.E. GOMES A. M. P., MALCATA F. X., 2008: Microbiological and biogenic amine profiles of Terrincho cheese manufactured in several dairy farms, *Int. Dairy journal* 18, 631 – 640

POLLO M. C., RAMOS M., SANCHEZ R., 1985: Free amino acids by high performance liquid chromatography and peptides by gel electrophoresis in Mahon cheese during ripening, *Food Chem*, 85-96

RESTUCCIA, D., SPIZZIRRI, U.G., PUOCI, F., CIRILLO, G., CURCIO, M., PARISI, O.I., IEMMA, F., PICCI, N., 2011. A new method for the determination of biogenic amines in cheese by LC with evaporative light scattering detector. *Talanta* 85, 363–369

ROIG-SAGUÉS A. X., MOLINA A. P., HERNÁNDEZ-HERRERO M., 2002: Histamin and tyramine forming microorganisms in Spanish traditional cheese, *Eur Food Res Technol*, 95-100

SANTOS W.C., SOUZA M.R., CERQUEIRA M.M.O.P., GLÓRIA M.B.A., 2003: Bioactive amines formation in milk by *Lactococcus* in the presence of not of rennet and NaCl at 20 and 32°C. *Food Chem*. 81, 595- 606

SHALABY A. R., 1996: Significance of biogenic amines to food safety and human Health, *Food Research International* 29, 675–690 s

SCHIRONE M., TOFALO R., MAZZONE G., CORSETTI A., SUZZI G., 2011: Biogenic amine content and microbiological profile of Pecorino di Farindola cheese. *Food Microbiology*, 28, 128–136

SILLA- SANTOS M. H., 1996: Biogenic amines: their importance in food. *Int J Food Microbiol*, 213- 231

SLÁDKOVÁ P., KOMPRDA T., BURDYCHOVÁ R., 2007: Skrining startovacích a probiotických kultur určených pro výrobu fermentovaných masných výrobků na schopnost tvorby biogenních aminů, *MENDELNET 07 AGRO*, MZLU v Brně, ISBN 978-80-7375-119-7

SMIT G., SMIT B.A., ENGELS W.J.M., 2005: Flavour formation by lactic acid bacteria and biochemical flavour profiling of cheese products. *FEMSMicrobiol*. 29, 591- 610

SPINLER H. E., BERGER C., LAPADATESCU C., BONNARME P. 2001: Production of sulfur compounds by several yeasts of technological interest for cheese ripening, *International Dairy Journal* 11, 245–252

SPIZZIRRI G., RESTUCCIA D., CURCIO M., PARISI O. I., IEMMA F., PICCI N., 2013: Determination of biogenic amines in different cheese samples by LC with evaporative light scattering detector. *Journal of Food Composition and Analysis* 29, 43-51

- STRATTON S. S., HUTKINS R. W., TAYLOR S. L., 1991: Biogenic amines in cheese and other fermented foods: a review. *Journal of Food Protection*, 54, 460–470 s.
- ŠALAKOVÁ A., NEHYBA A., DRBOHLAV J., BUDÍNSKÝ P., 2011: Fermentovaný mléčný výrobek s obsahem probatického kmene *Enterococcus faecium*, *Výživa a potravin* 5, 114-116 s.
- ŠILHÁNKOVÁ, L. (1995): *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology*, Victoria Publishing a.s., ISBN: 80-85605-71-6
- ŠPANOVÁ A., RITTICH B., KŠICOVÁ K., DRÁB V., 2009: Identifikace bakterií mléčného kvašení (významných v mlékárenském průmyslu) pomocí polymerázové řetězové reakce, *Mlékařské listy* 116, *Věda a Výzkum* 12-16
- ŠVIRÁKOVÁ E., TICHOVSKÝ P., PLOCKOVÁ M., PAZLAROVÁ J., 2008: Výskyt *Listeria monocytogenes* v mlékárenských výrobcích a možnosti jejich potlačení, *Mlékařské listy* 111, 38 -43
- VALSAMAKI K., MICHAELIDOU A., POLYCHRONIADOU A., 2000: Biogenic amine production in Feta cheese, *Food Chemistry* 71, s. 259 – 266
- VELÍŠEK J., 2002: *Chemie potravin 3*. Tábor. 368 s.
- WALSTRA P., WOUTERS J. T. M., GEURTS T. J., 2006: *Dairy Science and technology*. Taylor a Francis Group, USA, 763
- YILDIZ F., YETISEMIYEN A., SENEL E., DURLU-OZKAYA F., OZTEKIN S., SANLI E., 2010: some properties of Civil chesse: a type of traditional Turkish chesse, *International Journal Dairy technologii* 63, 575-580 s.

SEZNAM TABULEK

Tab. 1 Přibližné složení mléka (WALSTRA, 2006)

Tab. 2 Charakteristika tvarůžku během doby data minimální trvanlivosti (<http://www.tvaruzky.cz/O-tvaruzkach.aspx>)

Tab. 3 Významné mikroorganismy produkující biogenní aminy (Velíšek, 2002)

Tab. 4 Obsah hlavních biogenních aminů u sýrů (Velíšek, 2002)

Tab. 5 Počty sledovaných MO při skladování vzorků sýrů při 20 °C po 42 a 66 dnech

Tabulka. 6 Rozsah účinků variability sledovaných faktorů na obsah biogenních aminů a polyaminů u sýrů zrajících pod mazem

Tab. 7 Screening bakterií rodu Enterococcus na přítomnost genů pro tyrosindekarboxylázu, ověření tvorby aminů po provedeném dekarboxylázovém zkumavkovém testu, metodou HPLC, identifikace izolátů EN-COCCUStestem

Tab. 8 Screening bakterií mléčného kvašení na přítomnost genů pro tyrosindekarboxylázu u vybraných vzorků, ověření tvorby aminů po provedeném dekarboxylázovém zkumavkovém testu metodou HPLC,

SEZNAM OBRÁZKŮ:

Obr. 1 *Brevibacterium linens* (<https://www.google.cz/search?q=obr%C3%A1zek+brevibakterium&biw=1920&bih=936&tbm=isch&tbo=u&source=univ&sa=X&ved=0CCEQsARqFQoTCMXn5OrExMcCFURYFAodhmQF-A&dpr=1#imgsrc=OBR6Lg16SckHiM%3A>)

Obr. 2 Chemická struktura biogenních aminů (Loizzo, 2013)

Obr. 3 Bakterie rodu *Enterococcus*

Obr. 4 Vyhodnocení závislosti počtu bakterií mléčného kvašení (BMK), bakterií rodu *Enterococcus* a *Brevibacterium linens* na stáří vzorku, $n = 695$

Obr. 5 Vyhodnocení závislosti počtu kvasinek a plísní na stáří vzorku, $n = 695$

Obr. 6 Množství celkového počtu mikroorganismů při jednotlivých výrobních fázích

Obr. 7 Množství bakterií mléčného kvašení při jednotlivých výrobních fázích

Obr. 8 Počty enterokoků ve vzorcích odebraných z jednotlivých výrobních fází

Obr. 9 Počty *Brevibacterium linens* ve vzorcích odebraných z jednotlivých výrobních fází

Obr. 10 Počty bakterií *E. coli* ve vzorcích odebraných z jednotlivých výrobních fází, Po zrání $n = 105$

Obr. 11 Počty kvasinek a plísní ve vzorcích odebraných z jednotlivých výrobních fází

Obr. 12 Počet MO v sýru zrajícím pod mazem při 5 °C a 20° po 42 dnech

Obr. 13 Počty MO v sýru zrajícím pod mazem při 5 °C a 20° po 66 dnech

Obr. 14 Počet MO v sýru zrajícím pod mazem při různém tvaru výrobku

Obr. 15 Počty testovaných MO v sýru zrajícím pod mazem v různých ročních obdobích

Obr. 16 Počet MO v sýru zrajícím pod mazem při různém umístění vozíku v sušárně

Obr. 17 Vliv stáří vzorku na obsah tyraminu a histaminu, n = 695

Obr. 18 Množství jednotlivých BA v sýru zrajícím pod mazem po skladování 42 dnů 5 °C a 20 °C

Obr. 19 Množství BA a PA v sýru zrajícím pod mazem při 5 °C a 20 °C po 42 dnech skladování

Obr. 20 Množství jednotlivých BA v sýru zrajícím pod mazem při 5 °C a 20 °C po 66 dnech skladování

Obr. 21 Množství BA a PA v sýru zrajícím pod mazem při 5 °C a 20° po 66 dnech

Obr. 22 Množství jednotlivých BA v sýru zrajícím pod mazem při různém tvaru výrobku

Obr. 23 Obsah BA a PA v sýru zrajícím pod mazem při různém tvaru výrobku

Obr. 24 Množství jednotlivých BA v sýru zrajícím pod mazem při různém ročním období

Obr. 25 Množství BA a PA v sýru zrajícím pod mazem při různém ročním období

Obr. 26 Vliv stáří vzorku na hodnotu pH, n = 695

Obr. 27 Vliv stáří vzorku na % NaCl, n = 695

Obr. 28 Vliv stáří vzorku na obsah sušiny, n = 695