

Distribuce obsahu volných aminokyselin a biogenních aminů v přírodním sýru eidamského typu

Bc. Radka Flasarová

Diplomová práce
2011



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav chemie

akademický rok: 2010/2011

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Radka FLASAROVÁ**

Osobní číslo: **T09638**

Studijní program: **N 2901 Chemie a technologie potravin**

Studijní obor: **Chemie potravin a bioaktivních látek**

Téma práce: **Distribuce obsahu volných aminokyselin a biogenních aminů v přírodním sýru eidamského typu**

Zásady pro vypracování:

I. Teoretická část

1. Charakterizujte biogenní aminy.
2. Popište význam jejich sledování.
3. Stručně popište výrobu přírodních sýrů se zaměřením na sýry eidamského typu.

II. Praktická část

1. Založte zrací pokus se sýry eidamského typu a využijte teplotu obvyklou (10°C) a teplotu akcelerující zrací proces (16°C).
2. V průběhu zrání při obou teplotách sledujte vývoj obsahu volných aminokyselin a biogenních aminů ve vybraných částech přírodního sýra.
3. Výsledky vyhodnoťte a vyvodte závěry.

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

[1] Roginski, H.; Fuquay, J. W.; Fox, P. F. Encyclopedia of dairy sciences. London: Academic Press, 2002, ISBN 0-12-227235-8.

[2] Velišek, J. Chemie potravin 3. Tábor: Osis, 1996. ISBN 80-902391- 5-3.

[3] Fox, P. F.; et. al. Fundamentals of cheese science. Gaithersburg: Aspen Publishers, 2000. ISBN 0-8342-1260-9.

[4] Halász, A.; Baráth, Á.; Simon-Sarkadi, L.; Holzapfel, W. Biogenic amines and their production by microorganism in food. Trends in food science and technology, 1994, 5: 42-49.

Vedoucí diplomové práce:

doc. Ing. František Buňka, Ph.D.

Ústav technologie a mikrobiologie potravin

Datum zadání diplomové práce:

14. února 2011

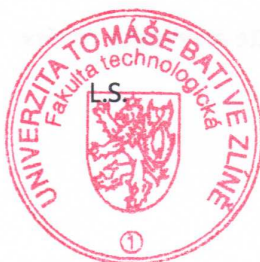
Termín odevzdání diplomové práce:

9. května 2011

Ve Zlíně dne 14. února 2011



doc. Ing. Petr Hlaváček, CSc.
děkan



prof. Ing. Antonín Klásek, DrSc.
ředitel ústavu

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

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

Ve Zlíně 29. 4. 2011

Flasarová Radka

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ABSTRAKT

Cílem této diplomové práce bylo sledování distribuce volných aminokyselin a biogenních aminů v sýrech holandského typu během jejich zrání. Sýry zrály při teplotách 10 ± 2 °C a 16 ± 2 °C. U všech vzorků byla provedena základní chemická analýza (pH, obsah sušiny a NaCl). Obsahy vybraných biogenních aminů i volných aminokyselin byly stanoveny pomocí iontově – výměnné kapalinové chromatografie s fotometrickou detekcí.

U sýrů zrajících při vyšší teplotě bylo zpozorováno, že dochází k rychlejšímu uvolňování volných aminokyselin z proteinů, v 56. dnu bylo toto množství téměř dvojnásobné než u kontrolních vzorků. Koncentrace biogenních aminů a volných aminokyselin byla sledována ve třech vrstvách třech plátů. Největší množství uvolněných aminokyselin byla zpozorována v jádře, a to u obou sýrů. Obsahy biogenních aminů byly také vyšší u sýrů zrajících při vyšší teplotě. V 56. den dosahoval obsah tyraminu u některých vrstev sýrů zrající při vyšší teplotě hodnot převyšujících $400 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$.

Klíčová slova: sýry holandského typu, volné aminokyseliny, biogenní aminy, iontově – výměnná kapalinová chromatografie

ABSTRACT

The aim of this thesis was to monitoring distribution of the free amino acids and biogenic amines in the Dutch – type cheese. This cheese had matured at 10 ± 2 °C and 16 ± 2 °C. All samples were subjected to basic chemical analysis (pH, content of dry matter and NaCl). The content of biogenic amines and free amino acids was determined by using ion – exchange liquid chromatography with spectrophotometric detection.

The cheese which was ripening by higher temperature contained greater amount of free amino acids, by 56th day was amount of free amino acid almost doubly greater than in control cheese. The amount of biogenic amines and free amino acids was detected in three layers of each of three plates. The greater amount of free amino acids was detected in centre of each plate. Also amount of biogenic amines were detected in cheese which where stored in 16 ± 2 °C. In the 56th day, the tyramine content in some layers of accelerated cheese reached the values above $400 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$.

Keywords: Dutch – type cheese, free amino acids, biogenic amines, ion – exchange liquid chromatography

Na tomto místě bych ráda poděkovala vedoucímu práce doc. Ing. Františku Buňkovi, Ph.D. za odborné vedení, rady a připomínky při zpracování mé diplomové práce.

Dále chci poděkovat Ing. Vendule Pachlové a Bc. Ludmile Zálešákové, DiS. za konzultaci a pomoc při práci na praktické části této diplomové práce.

Prohlašuji, že jsem na diplomové práci pracovala samostatně a použitou literaturu jsem citovala. V případě publikace výsledků, je-li to uvedeno na základě licenční smlouvy, budu uvedena jako spoluautorka.

Ve Zlíně 9. 5. 2011

.....

OBSAH

| | |
|---|-----------|
| ÚVOD | 10 |
| I TEORETICKÁ ČÁST | 11 |
| 1 BIOGENNÍ AMINY | 12 |
| 1.1 DĚLENÍ BIOGENNÍCH AMINŮ | 12 |
| 1.2 VZNIK BIOGENNÍCH AMINŮ..... | 13 |
| 1.2.1 Podmínky pro vznik biogenních aminů | 16 |
| 1.3 REAKCE BIOGENNÍCH AMINŮ | 17 |
| 1.4 ÚČINKY BIOGENNÍCH AMINŮ NA LIDSKÝ ORGANIZMUS | 19 |
| 1.4.1 Histamin | 21 |
| 1.4.2 Tyramin | 21 |
| 1.4.3 Putrecin a kadaverin | 22 |
| 1.4.4 Spermidin a spermin | 22 |
| 1.5 VÝSKYT BIOGENNÍCH AMINŮ..... | 23 |
| 1.5.1 Nefermentované potraviny | 23 |
| 1.5.2 Fermentované potraviny..... | 23 |
| 1.6 METODY STANOVENÍ BIOGENNÍCH AMINŮ | 24 |
| 1.6.1 Derivatizace pro HPLC a CE | 25 |
| 1.6.2 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) | 26 |
| 1.6.3 Kapilární elektroforéza (CE)..... | 26 |
| 1.6.4 Tenkovrstvá chromatografie (TLC) | 27 |
| 1.6.5 Plynová chromatografie (GC) | 27 |
| 2 AMINOKYSELINY | 28 |
| 3 SÝRY HOLANDSKÉHO TYPU | 29 |
| 3.1 TECHNOLOGIE VÝROBY SÝRŮ HOLANDSKÉHO TYPU | 30 |
| 3.2 PROCESY PROBÍHAJÍCÍ PŘI ZRÁNÍ SÝRŮ HOLANDSKÉHO TYPU | 33 |
| II PRAKTICKÁ ČÁST | 35 |
| 4 CÍL PRÁCE | 36 |
| 5 MATERIÁL A METODIKA | 37 |
| 5.1 CHARAKTERISTIKA VZORKŮ | 37 |
| 5.2 ZÁKLADNÍ CHEMICKÁ ANALÝZA..... | 38 |
| 5.3 EXTRAKCE A STANOVENÍ BIOGENNÍCH AMINŮ | 38 |
| 5.4 EXTRAKCE A STANOVENÍ VOLNÝCH AMINOKYSELIN..... | 39 |
| 6 VÝSLEDKY A DISKUZE | 42 |

| | | |
|---|---|-----------|
| 6.1 | ZÁKLADNÍ CHEMICKÁ ANALÝZA..... | 42 |
| 6.2 | ANALÝZA OBSAHU BIOGENNÍCH AMINŮ | 46 |
| 6.3 | ANALÝZA OBSAHU VOLNÝCH AMINOKYSELIN | 50 |
| 6.4 | SOUHRNNÁ DISKUZE..... | 52 |
| ZÁVĚR | | 55 |
| SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY..... | | 56 |
| SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK | | 64 |
| SEZNAM OBRÁZKŮ | | 66 |
| SEZNAM TABULEK..... | | 67 |
| SEZNAM GRAFŮ | | 68 |
| SEZNAM PŘÍLOH..... | | 69 |
| EVIDENČNÍ LIST DIPLOMOVÉ PRÁCE..... | | 84 |

ÚVOD

Sýry holandského typu se řadí na první místa ve spotřebě přírodních sýrů. V letech 2001 – 2009 vzrostla spotřeba tvrdých sýrů ze 4,5 kg na 6,8 kg na 1 osobu za rok [1]. Kromě jejich charakteristické chuti a vůni jsou zdrojem i téměř plnohodnotných bílkovin a vitaminů. Mezi nejznámější sýry holandského typu se řadí Gouda a Edam. Jejich názvy jsou dány místem, ze kterého konkrétní druh sýra pochází. V České republice do této skupiny již historicky patří především sýry Eidamského typu (tzv. Eidam). Holandsko vyrábí sýry již od 4. století našeho letopočtu. V současné době se řadí mezi největší světové producenty a vývozce sýrů, z toho přibližně 50 % celkové produkce tvoří sýr Gouda, přibližně 27 % produkce je Edam. Českým zástupcem je například Eidamská cihla nebo Eidamský blok [2, 3].

Sýry holandského typu by měly zrán po dobu 6 – 8 týdnů ve zrácích sklepech při teplotě 10 ± 2 °C. Mezi nejčastější akcelerace zrání sýrů patří zvýšení teploty, při které sýry zrají. Během zrání sýrů dochází k rozkladu bílkovin za vzniku volných aminokyselin. Úroveň proteolýzy v průběhu zrání je významným faktorem pro jakost konečného výrobku. Volné aminokyseliny dále mohou reagovat za vzniku biogenních aminů, které v nižších koncentracích mohou mít pozitivní vliv na lidský organizmus, ale ve vyšších koncentracích mohou mít negativní účinky [3]. Proto tato práce byla zaměřena na akceleraci zrání sýrů použitím vyšší teploty a její vliv na obsah volných aminokyselin a biogenních aminů. Teoretická část je zaměřena na charakteristiku biogenních aminů a jejich vlivy na lidský organizmus. V praktické části je porovnáno, jaký vliv má vyšší teplota zrání na obsah volných aminokyselin a biogenních aminů.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 BIOGENNÍ AMINY

Biogenní aminy jsou nízkomolekulární látky, které jsou odvozeny od aminokyselin. V nízkých koncentracích se u živočichů, rostlin a mikroorganismů vyskytují přirozeně, kde plní řadu důležitých fyziologických funkcí. Biogenní aminy jsou podstatným zdrojem dusíku, který dále může vstupovat do řady biochemických reakcí. Některé biogenní aminy mohou v organismu působit jako hormony. Biogenním aminem s takovou fyziologickou funkcí v organismu je například adrenalin, histamin, aj.. Mohou být také stavebními látkami, které se účastní syntézy dalších hormonů. Mezi takovéto stavební látky patří zejména fenylethylamin. Hornin a gramin se řadí mezi biogenní aminy působící v organismu jako protoalkaloidy. Přítomnost vyššího množství biogenních aminů v potravinách může být náznakem kažení potravin, proto se často označují jako indikátory čerstvosti potravin [3 - 9].

1.1 Dělení biogenních aminů

Biogenní aminy se na základě chemické struktury mohou dělit na alifatické, aromatické a heterocyklické [3 - 8].

Dále mohou být biogenní aminy děleny podle počtu alkylových či arylových skupin navázaných na atomu dusíku. Jedná se tedy o primární aminy, sekundární aminy a terciární aminy [3 - 6].

Dle počtu reaktivních aminoskupin jsou biogenní aminy děleny na monoaminy či polyaminy. Biogenní aminy obsahující pouze jednu reaktivní aminoskupinu jsou monoaminy. Polyaminy jsou sloučeniny obsahující dvě a více aminoskupin ve své molekule [3 - 8]. Podle Santose [8] jsou polyaminy nepostradatelnou součástí živých buněk a jsou významné při regulaci funkcí nukleových kyselin, syntéze proteinů a pravděpodobně se mohou podílet i na stabilizaci membrán.

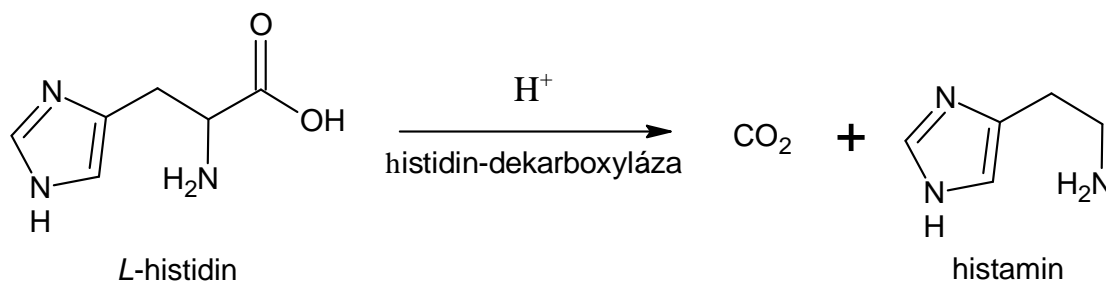
V Tabulce 1 je uveden přehled vybraných zástupců biogenních aminů, jejich systematický a triviální název (podle IUPAC). Dále je u jednotlivých biogenních aminů uvedeno zařazení do skupin dle předchozího dělení, a to podle chemické struktury, počtu navázaných arylových a alkylových skupin na atom dusíku, a podle počtu reaktivních aminoskupin [3- 6, 8].

Tabulka 1 – Vybraní zástupci biogenních aminů, jejich triviální a systematický název a zařazení do skupin [3].

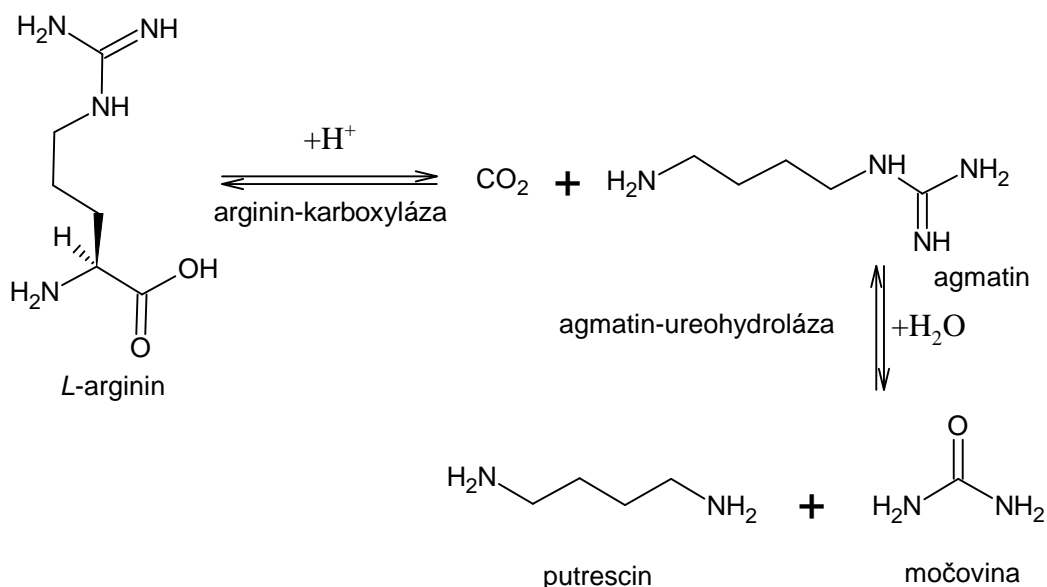
| Název triviální | Název systematický | Zařazení biogenních aminů | | |
|-----------------|---|---------------------------|------------|-----------|
| | | | | |
| histamin | 2-(1H-imidazol-5-yl)ethylamin | heterocyklické | primární | monoaminy |
| tyramin | 4-(2-aminoethyl)fenol | aromatické | primární | monoaminy |
| fenylethylamin | 2-fenylethylamin | aromatické | primární | monoaminy |
| tryptamin | 2-(1H-indol-3-yl)ethylamin | heterocyklické | primární | monoaminy |
| serotonin | 5-hydroxytryptamin | heterocyklické | primární | monoaminy |
| agmatin | <i>N</i> -(4-aminobutyl)guanidin | alifatické | sekundární | polyaminy |
| putrescin | butan-1,4-diamin | alifatické | primární | polyaminy |
| kadaverin | pentan-1,5-diamin | alifatické | primární | polyaminy |
| spermidin | <i>N</i> -(3-aminopropyl)butan-1,4-diamin | alifatické | sekundární | polyaminy |
| spermin | <i>N,N'</i> -bis(3-aminopropyl)butan-1,4-diamin | alifatické | sekundární | polyaminy |

1.2 Vznik biogenních aminů

Biogenní aminy vznikají v potravinách převážně jako produkty metabolismu přítomných mikroorganismů. Jejich vznik je významně ovlivněn i technologií výroby potraviny, ve které vznikají. Ve fermentovaných potravinách se vyskytují především díky činnosti bakterií mléčného kvašení (BMK), z nichž řada vykazuje dekarboxylázovou aktivitu. V potravinách však mohou biogenní aminy vznikat rovněž následkem činnosti kontaminujících, případně nezákysových mikroorganismů. Biogenní aminy vznikají působením dekarboxyláz z příslušných aminokyselin [3 - 16]. Na Obrázku 1 je reakční schéma vzniku histaminu. Tento biogenní aminy vzniká dekarboxylací aminokyseliny *L*-histidin za pomoci histidin-dekarboxylázy. Dekarboxylázy, účastníci se této reakce, jsou tvořeny různými druhy mikroorganismů, přičemž se jedná o vlastnost konkrétních kmenů než celého druhu. Produkce histidin-dekarboxylázy byla nalezena například u zástupců rodu *Lactobacillus* a některých kmenů *Enterobacter aerogenes* [10].

Obrázek 1 – Schéma vzniku histaminu z *L*-histidinu [10].

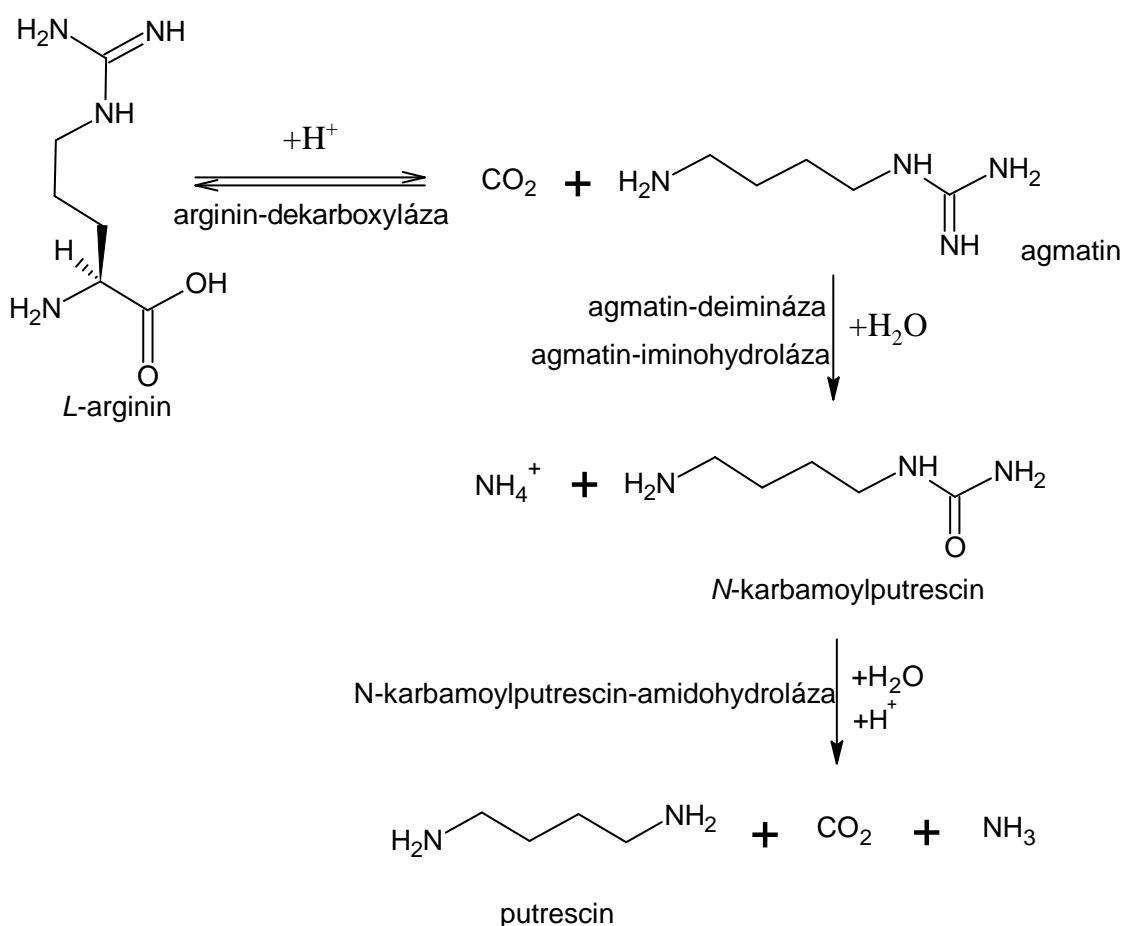
Z některých biogenních aminů mohou vznikat další biogenní aminy. Putrescin může vzniknout třemi drahami, a to přeměnou biogenního aminu či dekarboxylací volné aminokyseliny. Tyto dráhy jsou znázorněny níže (Obrázek 2 - 4). Obrázek 2 popisuje vznik putrescinu z biogenního aminu agmatinu za účasti agmatinázy a vzniku vedlejšího produktu močoviny. Bakteriemi, které jsou schopny syntetizovat agmatin za vzniku putrescinu jsou například někteří zástupci rodu *Escherichia* či *Bacillus*. Samotný meziprodukt agmatin vzniká v přítomnosti arginin-dekarboxylázy z volné aminokyseliny *L*-arginin [6, 10].

Obrázek 2 – Dráha I., kde putrescin vzniká z *L*-argininu přes agmatin [10].

Na Obrázku 3 je možné vidět druhou dráhu vzniku biogenního aminu putrescinu. Tato dráha je až po vznik agmatinu stejná jako dráha první (Obrázek 2). Agmatin poté díky agmatin-deimináze (produkovaný některými zástupci kmenu *Pseudomonas aeruginosa*), nebo agmatin-iminohydroláze (přítomný díky činnosti některých kmenů, např. bakterií *Arabidopsis thaliana*, *Pseudomonas aeruginosa*,...) se mění na *N*-karbamoylputrescin.

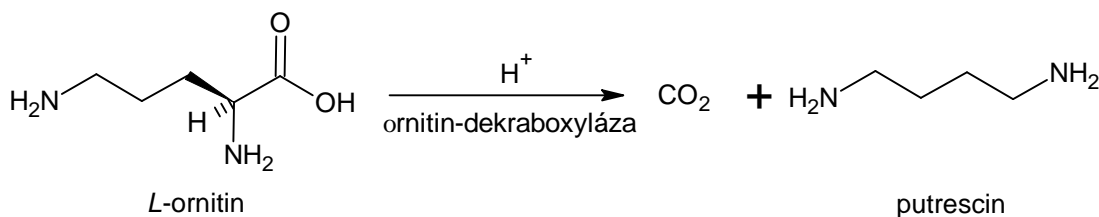
Tento meziproduct reaguje s molekulou vody a kationem vodíku v přítomnosti *N*-karbamoylputrescin-amidohydrolázy za vzniku putrescinu a dalších sloučenin. Amidohydroláza, která se účastní této reakce, může být produkovaná některými bakteriemi kmene *Arabidopsis thaliana*. Vznik putrescinu touto drahou může probíhat jen v případě, že jsou přítomny gramnegativní bakterie s dekarboxylázovou aktivitou, kam patří i výše zmíněné bakterie rodu *Pseudomonas sp.* V přítomnosti grampozitivních bakterií mající dekarboxylázovou aktivitu bude putrescin syntetizován první drahou nebo i třetí drahou (Obrázek 2, 4) [10, 13].

Obrázek 3 – Dráha II., kde putrescin vzniká z *L*-arginin přes agmatin a *N*-karbamoylputrescin [10],[13].



Putrescin ovšem může vzniknout také dekarboxylací aminokyseliny *L*-ornitin za účasti ornitin-dekarboxylázy, enzymy kmenů *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*. Tato třetí dráha je znázorněna na Obrázku 4.

Obrázek 4 – Schéma vzniku putrescinu dekarboxylací L-ornitinu [10].



Z putrescinu dále může vznikat methylací *S*-adenosyl-*L*-methioninaminem další biogenní amin spermidin, ze kterého následnou reakcí může vznikat spermin [3 - 11].

1.2.1 Podmínky pro vznik biogenních aminů

Okolnosti, které mají vliv na vznik biogenních aminů, můžeme rozdělit na přímé a nepřímé. Tyto podmínky mohou kromě samotného vzniku výrazně ovlivňovat i konečné koncentrace jednotlivých biogenních aminů v dané potravíně.

a) Přímé podmínky pro vznik biogenních aminů:

- přítomnost a dostatečné množství volných aminokyselin, ze kterých biogenní aminy vznikají [3 - 7],
- pro vznik biogenních aminů jsou nutné mikroorganismy, které mají dekarboxylázovou aktivitu – jednotlivé mikroorganismy mohou mít odlišnou dekarboxylázovou aktivitu pro vznik konkrétních biogenních aminů. Mezi bakterie disponující dekarboxylázovou aktivitou pro vznik histaminu i tyraminu jsou například *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas ripitilivora*, *Bacillus cereus*, *Enterococcus durans*, *Lactobacillus brevis*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Streptococcus mitis*. Tyto bakterie však mají rozdílný vliv na vznik biogenních aminů. K bakteriím, u kterých byla zaznamenána dekarboxylázová aktivita pro histamin, nikoli však pro tyramin, mohou patřit různé kmeny *Acinetobacter lwoffii*, *Aeromonas hydrophila*, *Escherichia freundii*, *Pseudomonas fluorescens* a další. *Escherichia coli* může mít dekarboxylázovou aktivitu i pro vznik dalších biogenních aminů, například agmatinu, kadaverinu, aj.. Kadaverin vzniká působením enzymu, vyskytující se například u kmenu *Clostridium cadaveris*, a další [3 - 7].

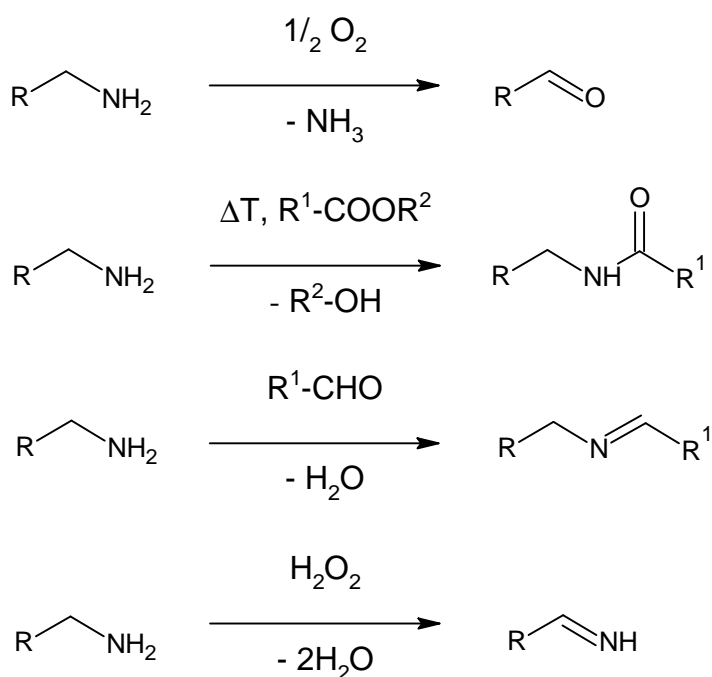
- b) Nepřímé podmínky vzniku biogenních aminů - tento faktor je úzce spjat s přítomností mikroorganismů mající dekarboxylázovou aktivitu, protože se jedná především o podmínky, které umožňují optimální růst a reprodukci těchto mikroorganismů.
- přítomnost volných aminokyselin a využitelných sacharidů – dle Komprdy [4] by daný substrát měl mít koncentraci glukózy pro daný druh bakterií v rozmezí 0,5 – 2,0 % [4, 9, 11],
 - teplota – převážná většina bakterií s dekarboxylázovou aktivitou patří mezi mezofilní bakterie, jejichž teplota růstu a reprodukce je v rozmezí 10 – 45 °C. Avšak optimální teplota jejich největšího růstu a reprodukce je okolo 37 °C. V případě, že bakterie s dekarboxylázovou aktivitou se řadí mezi termofilní bakterie, optimální teplota růstu je v rozmezí 40 – 50 °C. Záleží tedy na konkrétním druhu bakterie a jeho optimální teplotě růstu a reprodukce [4, 8, 11],
 - pH – pro bakterie mléčného kvašení je za optimální pH považováno slabě kyselé prostředí, pro hnilobné bakterie je optimální neutrální až slabě zásadité prostředí [4, 8, 11]. Roginsky a kol. [3] uvádí, že optimální pH pro tvorbu histaminu, tyraminu a tryptaminu je přibližně 5,0. Uvádí také srovnání obsahů histaminu ve dvou typech Goudy. První typ s vyšším pH (5,39) a druhý typ (pH = 5,19). Již po dvou týdnech zrání bylo zpozorováno, že Gouda s vyšším pH obsahuje větší koncentrace histaminu než druhý typ Goudy. Tvorba aminů je všeobecně rychlejší v kyslejších prostředí, zatím co odbourávání aminů je rychlejší v zásaditém prostředí [3],
 - obsah kyslíku v substrátu – ani tento faktor není zcela přesně jednoznačný. Musí být brán ohled na to, zda-li bakterie mající dekarboxylační aktivitu patří mezi aerobní, anaerobní či fakultativně anaerobní. Převážná většina těchto bakterií se řadí mezi fakultativně anaerobní mikroorganismy, a tudíž mohou žít jak za přítomnosti, tak i za nepřítomnosti kyslíku, ale nepřítomnost kyslíku může podporovat vznik konkrétních biogenních aminů [3 - 6, 8, 11].

1.3 Reakce biogenních aminů

Biogenní aminy patří mezi reaktivní látky. Při enzymových reakcích dochází k tvorbě derivátů biogenních aminů a dalších sloučenin. Jednou z reakcí biogenních aminů

je například oxidativní deaminace. Výslednými produkty této reakce jsou aldehydy. Při dlouhodobém skladování nebo při vyšší teplotě dochází například k reakci s triacylglyceroly za vzniku amidů mastných kyselin. Velmi často se také účastní neenzymového hnědnutí, kde vznikají jako primární reakční produkty příslušné iminy. Iminy se mohou z biogenních aminů tvořit také díky oxidaci, především pomocí peroxidu vodíku či hydroperoxidů lipidů. Tyto reakce je možné vidět na Obrázku 5 [3 - 6].

Obrázek 5 – Obecné reakční schémata biogenních aminů [6].



Některé biogenní aminy, především sekundární aminy, mohou reagovat s dusitany, především s bázemi nukleových kyselin, za vzniku karcinogenních nitrosaminů [3 - 6]. V roce 1978 stanovila Mezinárodní agentura pro výzkum rakoviny (IARC) skupiny nitrosaminů dle jejich negativního vlivu na lidský organismus. *N*-nitrosodiethylamin (NDEA) a *N*-nitrosodimethylamin (NDMA) patří do skupiny pravděpodobných karcinogenů. *N*-nitrosodibutylamin (NDBA), *N*-nitrosopiperidin (NPIP) a *N*-nitrosopyrrolidin (NPYR) se řadí do skupiny možných karcinogenů. V některých zdrojích se uvádí, že putrescin, spermidin a spermin mohou být prekurzory *N*-nitrosopyrrolidinu. Toto tvrzení je vysvětleno tak, že putrescin vzniká dekarboxylací ornitinu. Z ornitinu po deaminaci a následné cyklizaci může vzniknout pyrrolidin.

Pyrrolidin může následnou reakcí v přítomnosti nitrosačního činitele reagovat na *N*-nitrosopyrrolidin [17, 18].

1.4 Účinky biogenních aminů na lidský organizmus

Biogenní aminy mají pozitivní, ale i negativní účinky na lidský organizmus. V nižších koncentracích jsou pro organizmus nepostradatelné, avšak při vyšších množstvích se pro lidský organizmus stávají toxické. Proto se biogenní aminy řadí i mezi přirozené toxické látky [17, 18].

- a) Pozitivní účinky na lidský organizmus - biogenní aminy v organizmu plní řadu důležitých biologických funkcí. V Tabulce 2 jsou uvedeny jednotlivé biogenní aminy a jejich biologické funkce, které v organizmu plní [6].
- b) Negativní účinky na lidský organizmus – v organizmu se mohou projevovat jako:
 - psychoaktivní látky – tyto biogenní aminy působí v organizmu na nervové přenašeče. U většiny případů může docházet k dočasným změnám vnímání, chování, aj. Mezi tyto látky patří např. histamin [3 - 7, 19 - 21],
 - vasoaktivní látky – biogenní aminy patřící mezi vasoaktivní látky mají přímý či nepřímý vliv na vaskulární systém. Tyto látky se mohou dále dělit na vasokontraktibilní. Takovým biogenním aminem je například tyramin. Druhou skupinou vasoaktivních látek jsou vasodilatační látky, z biogenních aminů je to např. tryptamin a fenylethylamin. Tyto biogenní aminy mají za následek především kontrakce hladkého svalstva, rozšíření cév. Důsledkem těchto jevů je snížení krevního tlaku [3, 4, 6, 7, 20, 21].

Tabulka 2 – Biogenní aminy, jejich prekurzory a biologický význam [6].

| Biogenní amin | Biologický význam |
|----------------------|--|
| histamin | lokální tkáňový hormon, vliv na krevní tlak, sekreci žaludeční šťávy, účast při anafylaktickém šoku a alergických reakcích, stabilizace makromolekul (nukleové kyseliny), rostlinný hormon |
| kadaverin | stabilizace makromolekul (nukleové kyseliny), rostlinný hormon |
| putrescin | stabilizace makromolekul (nukleové kyseliny), rostlinný hormon |
| fenylethylamin | prekurzor tyraminu |
| tyramin | prekurzor dopaminu, lokální tkáňový hormon, vliv na krevní tlak a kontrakce hladkého svalstva |
| dopamin | mediátory sympatických nervů |
| tryptamin | lokální tkáňové hormony (katecholaminy), vliv na krevní tlak, peristaltiku střev, psychické funkce |
| spermin | antioxidant a akceptor volných radikálů, stabilizace makromolekul (nukleové kyseliny) |
| spermidin | stabilizace makromolekul (nukleové kyseliny) |

Horní hranice, kdy se biogenní aminy stávají toxickými pro lidský organizmus, není zcela přesně stanovena, protože záleží na mnoha faktorech, které mohou k otravě biogenními aminy vést. Především záleží na konkrétním jedinci, zejména na jeho zdravotním stavu. Proti intoxikaci biogenními aminy je zdravý člověk přirozeně chráněn pomocí detoxifikačního mechanismu, díky němuž je možnost otravy minimalizována. K detoxikaci biogenních aminů v lidském organizmu dochází pomocí střevních enzymů aminooxidáz [3, 4 - 7, 9, 14 - 16, 19, 22]. Množství těchto detoxifikačních aminooxidáz nejen s rostoucím věkem klesá, ale snižuje se i působením alkoholu či léčiv, především psychofarmak. Tyto léčiva ve většině případů obsahují inhibitory aminooxidáz. Dalším faktorem, který může vést k otravě biogenními aminy je množství konzumované potravy, respektive koncentrace biogenních aminů přítomných v konzumované potravine. Konkrétní negativní účinky na lidský organizmus jsou uvedeny u jednotlivých biogenních aminů níže [13 - 16, 19].

Z hlediska toxikologie mezi nejzávažnější biogenní aminy patří histamin a tyramin, a řadí se k nejvíce zkoumaným biogenním aminům v dnešní době. Ve vysokých koncentracích

mohou mít negativní vliv na zdraví. Jejich vysoký příjem způsobuje zdravotní potíže, které mohou vést až ke smrti konzumenta [3 - 6, 14, 19].

1.4.1 Histamin

Dle dělení biogenních aminů se řadí mezi heterocyklické monoaminy. Sledování jeho koncentrace v potravinách je důležité, protože přítomnost vyššího obsahu negativně ovlivňuje lidský organizmus. Výskyt histaminu je zejména v rybím mase, sýrech, víně a masných produktech [8]. Kalač a Křížek [5] uvádí, že hodnota 8 – 40 mg.kg⁻¹ je množství, které může vyvolat projevy lehké otravy. 40 – 100 mg.kg⁻¹ je uvedeno jako hodnoty pro středně těžkou otravu a koncentrace nad 100 mg.kg⁻¹ histaminu jako velmi silná otrava. Ovšem tyto koncentrace jsou uváděny pro pevné potraviny [3 - 12]. Moreno-Arribas a Polo [23] uvádí koncentraci histaminu 8 – 20 mg.l⁻¹ v alkoholických nápojích jako množství, které může u konkrétních jedinců způsobovat negativní fyziologické účinky na lidský organizmus. Příznaky otravy jsou pozorovatelné v rozmezí několika minut až hodin. Mezi nejzávažnější účinky histaminu patří anafylaktický šok, snížení tlaku, bolesti hlavy. Bolesti hlavy mohou přecházet až v silné migrény. Dalšími toxickými příznaky jsou kontrakce hladké svaloviny střev jako břišní křeče, zvracení, průjemy. S otravou histaminem může souviset i zarudnutí očí, kůže, potíže s dechem a třes [4, 7]. Ve vyhlášce Ministerstva zdravotnictví č. 305/2004 Sb. (v platném znění) [24] je stanoveno přípustné množství histaminu v rybách a rybích výrobcích na hranici 100 mg.kg⁻¹. Toto množství může být překročeno ve dvou z devíti odebraných vzorků z jedné šarže o 100 %, což znamená, že ve dvou vzorcích může být koncentrace histaminu až 200 mg.kg⁻¹.

1.4.2 Tyramin

Dle předchozího dělení chemické struktury se tyramin řadí mezi aromatické monoaminy. Z toxikologického hlediska je tyramin spolu s histaminem jedním z nejzávažnějších biogenních aminů. Vyskytuje se zejména v mase vepřovém, hovězím a rybím. V masných výrobcích může být množství tyraminu v rozmezí 100 – 800 mg.kg⁻¹. Srovnatelné koncentrace tyraminu bývají nalezeny i v sýrech. V rostlinných produktech se tyramin vyskytuje zejména v banánech, kde jeho množství může dosahovat až 200 – 400 mg.kg⁻¹. Ve fermentovaných výrobcích rostlinného původu je obsah tyraminu nejzávažnější

v kysaném zelí [3 - 6, 14, 25, 26]. Moreno-Arribas a Polo [23] uvádí pro alkoholické nápoje množství 25 – 40 mg.l⁻¹ tyraminu, které může vyvolávat negativní účinky. Bylo zjištěno, že konzumace potravin s koncentrací tyraminu v rozmezí 10 – 80 mg.kg⁻¹ může mít za následek tvorbu otoků. K dalším příznakům vyvolané otravou tyraminem patří silné bolesti hlavy spolu se zvracením, zvýšení teploty a prudké zvýšení krevního tlaku [26, 27]. Současná vyhláška Ministerstva zdravotnictví č. 305/2004 Sb. (v platném znění) [24] bohužel neudává povolené množství tyraminu v potravinách. Legislativně dána horní hranice množství tyraminu v potravinách ošetřovala starší vyhláška Ministerstva zdravotnictví č. 298/1997 Sb., která stanovila povolené množství tyraminu ve víně 50 mg.kg⁻¹ a v sýrech tvrdých, měkkých a zrajících 200 mg.kg⁻¹. Tato vyhláška je dnes již neplatná [24 - 28]. Avšak podle Önala [26] se za toxické množství tyraminu, které může vyvolávat výše zmíněné příznaky otravy tyraminem, považuje hodnota 1080 mg.kg⁻¹.

1.4.3 Putrescin a kadaverin

Biogenní aminy jako putrescin a kadaverin nemají samy o sobě příliš velký vliv na organismus. Avšak jejich přítomnost a množství v potravinách je důležité, protože zvyšují účinky histaminu a tyraminu. Tento jev je způsoben díky tomu, že putrescin a kadaverin může ovlivňovat detoxifikační mechanismus, který je přirozenou obranou organismu vůči negativním vlivům biogenních aminů. Putrescin je důležitý pro regulaci funkcí nukleových kyselin, syntézu bílkovin. Pravděpodobně má vliv i na stabilizaci membrán. Hranice toxicity pro putrescin byla stanovena na 180 mg na jeden kilogram tělesné hmotnosti konzumenta. Pro kadaverin tyto hodnoty v dostupné literatuře nebyly nalezeny. Legislativně bohužel nejsou dány žádné hranice toxicity těchto biogenních aminů [3 - 6, 13, 23, 25, 26].

1.4.4 Spermidin a spermin

Tyto dva biogenní aminy patří mezi alifatické polyaminy. Jejich účinky v organismu jsou stejné jako u putrescinu. Spermin v organismu může vystupovat jako antioxidant a akceptor volných radikálů. Také může vystupovat jako ochrana neuronů v centrální nervové soustavě [3 - 6, 14, 25, 26, 29, 30].

1.5 Výskyt biogenních aminů

Dle potravin obsahující biogenní aminy můžeme výskyt rozdělit na přítomnost biogenních aminů ve fermentovaných a nefermentovaných potravinách, protože koncentrace biogenních aminů se může výrazně lišit dle technologie výroby dané potraviny. I doba skladování potraviny může ovlivnit koncentraci biogenních aminů. Bylo dokázáno, že při dlouhodobém skladování se obsah biogenních aminů výrazně zvyšuje, a to zejména v zelenině, ovoci, houbách a fermentovaných výrobcích [4 - 8].

1.5.1 Nefermentované potraviny

K nefermentovaným potravinám, které mohou obsahovat vyšší koncentrace biogenních aminů, patří např. ryby. Z hlediska možného výskytu vyššího obsahu biogenních aminů je především čeleď *Scombridae*, čili makrelovití. V čerstvém rybím mase je obsah biogenních aminů téměř zanedbatelný. Ovšem s prodlužující se délkou skladování masa, nebo při jeho kažení, obsah biogenních aminů, především histaminu, výrazně roste a může dosahovat hranici toxicity. Proto se otrava biogenními aminy z tohoto druhu rybích mas nazývá skombrotoxikóza, často označována také jako histaminóza. Vyšší koncentrace biogenního aminu histaminu v mase je způsobena především díky tomu, že v bílkovinné složce krevního barviva se nachází velké množství histidinu. Histidin je esenciální aminokyselina, ze které se pomocí histidin-dekarboxylázy tvoří biogenní amin histamin (Obrázek 1). V ostatních nefermentovaných potravinách, jako např. ovoce, zelenina, houby, je množství biogenních aminů téměř zanedbatelné [4, 6].

1.5.2 Fermentované potraviny

Fermentované potraviny jsou z hlediska přítomnosti vyšších množství biogenních aminů důležitější. Jedná se především o sýry a masné výrobky, u kterých byla při výrobním procesu použita fermentace. U fermentovaných potravin se vyskytují především biogenní aminy tyramin, putrescin, kadaverin a histamin. Pokud pomineme vznik biogenních aminů v těchto potravinách pomocí kontaminující mikroflóry, tak u fermentovaných potravin biogenní aminy vznikají činností startovacích kultur s dekarboxylační aktivitou, které se do potravin přidávají při výrobním procesu za účelem následné fermentace. Proto je nutné k minimalizování možné tvorby vyššího obsahu biogenních aminů ve fermentovaných potravinách použít takových startovacích kultur, které mají co nejnižší

dekarboxylační aktivitu. Ovšem při výrobě potravin se prozatím nesoustřeďuje velká pozornost na výběr mikroorganismů s nižší dekarboxylázovou aktivitou [4 - 6, 8].

Mimo jiné se k fermentovaným potravinám řadí i fermentované nápoje. Jedná se zejména o pivo a víno. V těchto nápojích nemusí být množství biogenních aminů příliš vysoké, ale přesto může docházet k otravám biogenními aminy těmito nápoji. To může být způsobeno poměrně rychlou konzumací většího množství fermentovaných nápojů. Druhým faktorem u fermentovaných nápojů je vliv alkoholu, který může účinky jednotlivých biogenních aminů zvyšovat (viz. 1.4 Účinky biogenních aminů na lidský organizmus) [4 - 6, 8].

Vysoká množství biogenních aminů lze nalézt zejména v mléčných produktech, především v sýrech, protože vytváří ideální prostředí pro tvorbu biogenních aminů. Nejčastějšími biogenními aminy, které se v mléčných výrobcích vyskytují, jsou tyramin, histamin, putrescin, kadaverin, tryptamin a fenylethylamin. S delší dobou zrání či skladování se obsah biogenních aminů výrazně zvyšuje. Kromě vhodného prostředí je v mléčných výrobcích přítomnost bakterií s dekarboxylázovou aktivitou. Tyto bakterie mohou být součástí startovacích kultur, tzv. startéry, či jako nonstartéry. Kromě bakterií, které se do mléčných výrobků při výrobě přidávají záměrně, se mohou vyskytnout i kontaminující bakterie s dekarboxylázovou aktivitou. Největší zaznamenaná množství biogenních aminů byla zpozorována v mléčných produktech vyrobených ze syrového mléka, kde je riziko vlivu právě kontaminující mikroflóry mající dekarboxylační aktivitu, zejména čeleď *Enterobacteriaceae*. Tomuto jevu lze ovšem předcházet vhodnou hygienou při výrobě potravin, díky níž se přítomnost kontaminující mikroflóry v mléčných výrobcích minimalizuje [3 - 9].

1.6 Metody stanovení biogenních aminů

Mezi současné metody stanovení biogenních aminů patří zejména tenkovrstvá chromatografie, plynová chromatografie, kapalinová chromatografie a kapilární elektroforéza. Podle Smělé a kol. [27] se v běžných laboratorních podmínkách používá vysoce citlivá chromatografická metoda RP-HPLC (vysokoučinná chromatografie s obrácenými fázemi) s fluorescenční nebo UV detekcí. Další metodou pro stanovení biogenních aminů v potravinách je např. iontově – výměnná chromatografie.

Před samotným použitím konkrétní metody pro stanovení biogenních aminů v potravinách je nutná extrakce těchto nízkomolekulárních dusíkatých látek ze zkoumaného potravinového vzorku. V případě nápojů je příprava vzorku složena obvykle pouze z filtrace. Proestos a kol. [31] uvádí, že při stanovení biogenních aminů ve víně je vhodné použít polyvinylpyrrolidon (PVP), který odstraňuje substance, jež by mohly ovlivnit derivatizaci a následné stanovení množství derivátů. Polyvinylpyrrolidon reaguje například s polyfenoly za vzniku usazenin, které mohou být odstraněny pomocí centrifugy či filtrace. U ostatních potravin se pro extrakci biogenních aminů používají různá extrakční činidla. V dnešní době mezi nejpoužívanější extrakční činidla patří zejména kyselina chloristá o různých koncentracích, kyselina chlorovodíková ($0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$), 5% [w/w] kyselina trichloroctová, methanol, petrolether. Pro extrakci z masných výrobků a ryb se nejčastěji používá methansulfonová kyselina. Po homogenizaci vzorku s vybraným činidlem je nutné odstranit vysrážené složky pomocí odstředivky a filtrace [32 - 36].

1.6.1 Derivatizace pro HPLC a CE

Pro stanovení biogenních aminů se používá derivatizace, která je pro řadu metod téměř stejná, zejména při využití vysokoúčinné kapalinové chromatografie či kapilární elektroforézy. Lingeman a Underberg [37] ve své publikaci uvádí: „Derivatizace je nutné zlo“. Lores a kol. [38] uvádí dva obecné cíle při použití derivatizace. Prvním cílem je zvýšit citlivost detekce (získá vhodných sloučenin s vyšší odezvou). Druhým cílem je zvýšení selektivity použitím specifických a selektivních derivatizačních reakcí. Derivatizace se zpravidla provádí před použitím samotné chromatografické separace, to je pre-chromatografická či prekolonová derivatizace, nebo až po chromatografické separaci, jedná se o postkolonovou derivatizaci. Derivatizace provedená před chromatografickou separací může mít za důsledek i zlepšení chromatografických vlastností analytu. Použití činidla a zvolení pre- či postkolonové derivatizace záleží především na analytu a reakčním systému. Citlivost stanovení biogenních aminů může být rovněž zvýšena použitím fluorescence místo diodového detektoru. Pro derivatizaci se velmi často používá *o*-ftalaldehydem (OPA), dansylchlorid (Dns-Cl), dabsylchlorid, nebo 6-aminoquinoyl-*N*-hydroxysukcinimid karbamát. Bylo zjištěno, že *o*-ftalaldehydem reaguje pouze s primárními aminy a jejich fluorescenční deriváty jsou poměrně nestálé. Dansylchlorid a dabsylchlorid reaguje jak s primárními, tak sekundárními aminy,

a poskytují poměrně stálé deriváty [31]. Jako další derivatizační činidla se mohou využívat i *o*-ftalaldehyd ve směsi s merktaptoethanolem (2-ME), 1,2-naftochinon-4-sulfonát, 4-chloro-7-nitrobenzofurazan, 9-fluoroenylmethyloxo karbamát (Fmoc), aj. [32 - 36, 39].

Fan a kol. [40] ve své publikaci uvádí možnosti nových derivatizačních činidel pro využití v kapalinové chromatografii. Jako nejběžnější derivatizační činidlo uvádí fenylisothiokyanát (PITC), benzoyl chlorid, 4-nitrobenzoyl chlorid, 3,5-dinitrobenzoyl chlorid. Ale tyto sloučeniny mají poměrně nízkou citlivost. Využití PITC má dvě nevýhody. První nevýhodou je časová náročnost metody. Druhou nevýhodou je nadměrné množství derivatizačních činidel, které jsou nutné k odstranění daných složek před samotnou analýzou [40,41].

1.6.2 Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC)

HPLC je velmi často využívanou metodou obzvláště díky její vysoké citlivosti a přesnosti, svou všestranností i jednoduchou přípravou vzorků [31]. Často používanou variantou je RP-HPLC. Při použití merktaptoethanolu (2-ME) ve směsi s *o*-ftalaldehydem se využívá fluorimetrická detekce, u derivatizačního činidla 1,2-naftochinon-4-sulfonátu a 4-chloro-7-nitrobenzofurazanu spektrofotometrická detekce. Pro detekci některých biogenních aminů není nutné použití derivatizačního činidla, zejména u stanovení histaminu a tryptaminu. Kromě výše uvedených detektorů je možné použít i UV/VIS DAD detektor, tj. detektor diodového pole. U této metody lze mimo jiné použít i konduktometrický detektor. V poslední době je stále častěji používanou metodou pro stanovení biogenních aminů kombinace HPLC s hmotnostní spektrometrií (HPLC-MS) [26, 33, 36, 42 - 46].

1.6.3 Kapilární elektroforéza (CE)

Z elektromigračních metod se při stanovení biogenních aminů uplatňuje zejména kapilární zónová elektroforéza (CZE). Stejně jako v případě chromatografií je také u elektromigračních metod nutná derivatizace analyzovaných složek. Kromě kapilární zónové elektroforézy je možné využít i gelové elektroforézy (GCE), micelární elektrokinetické kapilární chromatografie (MECC), kapilární elektrochromatografie (CEC), kapilární isoelektrické fokusace (cIEF) či kapilární isotachoforézy (cITP) [47]. Pomocí derivatizačního činidla dochází ke vzniku fluoreskujících či absorbujících produktů. Analyt může s činidlem reagovat před dělením nebo až po rozdělení směsi v kapiláře. Je možné

využít i derivatizace vzorku přímo v kapiláře („on-column“ nebo „in-capillary“), v níž je obsažen základní elektrolyt dohromady s derivatizačním činidlem (např. OPA) [7, 12, 26, 32 - 35].

Bardelmaier a kol. [47] uvádí kromě ultrafialové detekce i další možné způsoby, jako například laserově indukovanou fluorescenční, chemiluminiscenční nebo elektrochemickou detekcí.

1.6.4 Tenkovrstvá chromatografie (TLC)

TLC je poměrně jednoduchá metoda, která je poměrně časově velmi náročná. V případě analýzy biogenních aminů se používá dvoufázová TLC. Tato metoda využívá systému rozpouštědel chloroform – diethyleter – triethylamin (6:4:1) a dále chloroform – triethylamin (6:1). Po derivatizaci, především pomocí DnsCl, následuje denzitometrická detekce při 254 nm. Výhody této metody spočívají v tom, že je možné ji použít pro větší množství vzorků. Ovšem nejedná se o příliš přesnou metodu [33, 34].

1.6.5 Plynová chromatografie (GC)

Nejčastěji se tato metoda pro stanovení biogenních aminů využívá ve spojení s hmotnostní spektrometrií (GC-MS). U GC-MS se jako derivatizační činidlo používá anhydrid kyseliny heptafluoromáselné (HFBA) za účelem převodu biogenního aminu na těkavý derivát [42]. Metoda GC byla podle Önala [26] použita např. pro stanovení biogenních aminů v portském víně a celkovém času analýzy 18 min.

Önal [26] uvedl i další postup využívající plynovou chromatografii, při které odpadá nutnost derivatizace analytu. Tento postup byl využit pro stanovení obsahu histaminu v rybách a rybích produktech. Histamin byl nejprve ze vzorku extrahován alkalickým methanolem a poté injektován na chromatografickou kolonu bez derivatizace, doba analýzy činila 20 minut [26, 33, 48].

2 AMINOKYSELINY

Aminokyseliny mohou být v organismu vázané nebo volné. Přibližně 99 % aminokyselin je vázáno v bílkovinách a peptidech. Zbytek (přibližně 1 %) jsou volné aminokyseliny. Větší množství volných aminokyselin bývá obsaženo v potravinách, při jejichž výrobě či procesu zrání dochází k proteolýze [49 - 51].

Spojením méně než 50 aminokyselinových jednotek pomocí peptidových (amidových) vazeb, tj. vazba aminoskupiny jedné aminokyseliny a karboxylové skupiny druhé aminokyseliny, dochází ke vzniku peptidů. Při spojení více jak 50 aminokyselinových jednotek vznikají bílkoviny. Z aminokyselin mohou reakcemi vznikat jejich deriváty, například biogenní aminy [49 - 52]. Reakce aminokyselin za vzniku biogenních aminů jsou uvedeny v kapitole 1.2 Vznik biogenních aminů.

Pro organismus jsou aminokyseliny nepostradatelnou složkou, kde jsou součástí řady důležitých funkcí. Některé volné aminokyseliny mohou v organismu plnit funkci hormonů. Jako hormon v těle může působit například thyroxin, hormon štítné žlázy. McMurry J. [52] uvádí, že významnou sloučeninou mající biologický účinek je GABA (γ -aminomáselná kyselina), která plní v mozku funkci přenašeče nervových vzruchů. Některé mohou být pro lidský organismus toxické. Například při poruše metabolismu u některých jedinců může fenylalanin vyvolávat onemocnění fenylketonurie. Homocystein, který je přítomný v krvi, pravděpodobně souvisí s koronárními onemocněními srdce [49 - 52].

Velíšek [49] uvádí, že enzymové hydrolyzáty bílkovin (např. sójová omáčka) nebo kyselé hydrolyzáty bílkovin (polévkové koření) jsou složeny převážně z volných aminokyselin a nikoli z bílkovin. Některé aminokyseliny a jejich produkty mají vliv na organoleptické vlastnosti potravin. Produkty vzniklé reakcemi aminokyselin bývají důležitými vonnými či chuťovými látkami [49 - 52].

Význam, proč jsou volné aminokyseliny sledovány v sýrech, je, že jejich množství je ukazatelem proteolytické aktivity enzymů během zrání. Během zrání dochází k proteolýze bílkovin za vzniku právě volných aminokyselin (více uvedeno v kapitole 3.2 Procesy probíhající při zrání sýrů holandského typu) [49 - 52].

3 SÝRY HOLANDSKÉHO TYPU

Z hlediska výživy člověka tvoří přírodní sýry důležitou součást stravy, protože obsahují významné výživové složky. Z nutričního hlediska lze mléčné složky rozdělit na dvě hlavní skupiny, a to na tuk (smetanu) a v něm rozpustné vitaminy a tukuprostou mléčnou sušinu (kromě tuku – tzv. mléčná plazma), například bílkoviny, ve vodě rozpustné vitaminy, sacharidy a minerální látky [53 - 62]. V Příloze I jsou v tabulce uvedeny jednotlivé látky a jejich množství, které se v plnotučném mléce mohou vyskytovat [53].

Mléko je také významným zdrojem nasycených a nenasycených mastných kyselin, například palmitová, stearová, olejová, linolenová, linolová a další [53, 62, 63].

Oblíbenost sýrů u spotřebitelů stále stoupá. Dle Českého statistického úřadu [64] byla celková spotřeba sýrů 10,9 kg na jednu osobu za rok 2008, z toho 6,6 kg přírodních tvrdých sýrů, kam se dle některé literatury mohou řadit i sýry holandského typu.

Sýry holandského typu dle vyhlášky 77/2003 Sb. patří do skupiny přírodních sýrů, podskupina polotvrdé nebo tvrdé sýry [65]. Tyto sýry mají zpravidla obsah sušiny v rozmezí 40 - 53 %. Sýry holandského typu se dále mohou dělit dle obsahu tuku na vysokotučné (více jak 60 % tuku v sušině), plnotučné (45 – 60 % t.v.s.), polotučné (25 – 45 % t.v.s.), nízkotučné (10 – 25 % t.v.s.) a odtučněné (méně než 10 % t.v.s.). Obsah tuku v prosté sušině však zcela záleží na technologii výroby a charakteru finálního produktu sýra [54, 66].

Vznik sýrů holandského typu je podle Foxe připisován na rok 1697, ve kterém byly zaznamenány první zmínky o Goudy [67]. Tento typ sýrů je vyráběn převážně z kravského mléka (viz. kapitola 3.1 Technologie výroby sýrů holandského typu). Sýry jsou baleny převážně do fólií nebo jsou zalévány voskem pro zachování nejlepší kvality.

Nejznámějším zástupcem sýrů pocházejících z Nizozemska je Gouda. Jeho název je odvozen od stejnojmenného města poblíž Rotterdamu, kde se po dlouhá staletí vyrábí. Podle Kodexu standardu pro Goudu [68] jde o zrající tvrdý/polotvrdý sýr, barva blízká bílé či slonové až ke světle žluté. Sýr by měl být pružný bez ok či větších trhlinek s obsahem sušiny 54 – 60 % a s 30 – 50 % tuku v sušině [61, 69]. Vše ovšem záleží na stupni vyzrálости Goudy [67]. Podle délky zrání se Gouda může dělit do několika kategorií, a to:

- mladá Gouda – jejíž doba zrání je přibližně 4 až 6 týdnů a její chuť je velmi jemná, barva je světlá,
- středně prozrálá Gouda – tento typ zraje 3 až 6 měsíců, vyznačuje se tmavší barvou a pikantnější chutí,
- prozrálá Gouda – její doba zrání se pohybuje v rozmezí 18 měsíců až 5-ti let, během kterých sýr získává karamelovou barvu, nasládlou chuť a drobnou strukturu. Takto uzrálá Gouda se výrazně podobá Parmezánu. Drobná struktura může být způsobena dlouhým zráním a zvyšováním obsahu sušiny (obsah sušiny u Parmezánu je 68 – 70 %) [59, 61].

Dalším sýrem této skupiny je Edam. Název dostal podle města Edam nedaleko Amsterdamu. Pro Edam je typická nasládlá ořechová chuť a poněkud měkčí konzistence než u Goudy. Měkčí konzistence může být důsledkem toho, že Edam má menší obsah sušiny než Gouda (52 – 56 %) a o obsahu tuku v sušině zpravidla 40 – 45 % t.v.s. [59, 61].

Českým zástupcem, který je chutí a texturou podobný sýrům holandského typu, je Eidam. Jde o mírně nasládlý sýr s velmi jemnou chutí. V ČR je vyráběn ve více variantách, a to s nižším obsahem tuku v sušině (20 % a 30 %), a s vyšším obsahem tuku v sušině (40 % či 45 %). Výrobní proces eidamu je principiálně stejný jako jeho „předchůdce“ z Nizozemska. Jejich název je rozdílný, protože po sedmiletém sporu o názvu Nizozemsko již získalo v říjnu roku 2010 ochrannou známku na sýr s názvem „Holland Edam“. Nizozemsko ovšem požádalo o ochranu zeměpisného původu pro značku „Holland Edam“, což by mohlo znamenat konec výroby Eidamu pod tímto názvem. Proti uznání ochrany zeměpisného původu se stále vede spor, ve kterém proti Nizozemsku stojí včetně České republiky dalších 8 zemí, například Německo, Francie, Rakousko, a další [70, 71].

3.1 Technologie výroby sýrů holandského typu

Sýry holandského typu jsou nejčastěji vyráběny z kravského mléka. Codex Alimentarius [68] pro Goudu avšak uvádí jako základní surovinu pro výrobu Goudy nejen kravské mléko, ale i buvolí mléko, či směs kravského a buvolího mléka. Nejčastěji je nejen Gouda vyráběna z kravského mléka. Pro výrobu těchto sýrů je nejvhodnější plnotučné mléko, které se ovšem před samotnou výrobou sýra musí upravit. Prvním nejčastějším krokem úpravy mléka je vyčištění mléka od větších nečistot pomocí filtrace. Někdy mohou být

filtry pro odstranění hrubších nečistot součástí potrubí vedoucí mléko. Poté následuje odstředění v bubnových odstředivkách za zisku mléka s minimálním obsahem tuku (asi 0,03 – 0,05 %) a smetany o obsahu tuku 35 – 45 %. Po získání odtučněného mléka a smetany se provádí standardizace. Ta spočívá ve smíchání odstředěného mléka a smetany (někdy i plnotučného mléka) v daném poměru. Tento krok umožňuje výrobu sýru o požadované tučnosti [54 - 58, 61]. Následně může být použita baktofugace, která má za úkol odstranit pokud možno co nejvíce mikroorganismů a jejich vegetativních spory. Pro baktofugaci se používají tzv. baktofugační odstředivky [54].

Dalším krokem může být pasterace mléka. Tento krok není podmínkou. U některých druhů sýrů se během výroby sýru pasterace nepoužívá, avšak tento sýr může rychleji podléhat kažení. Tudíž sýry vyrobené z nepasterovaného mléka skýtají vyšší rizika než sýry vyrobené z pasterovaného mléka. Při technologii výroby sýrů holandského typu se nejčastěji používá zejména šetrná pasterace, která probíhá 15 – 20 sekund při teplotě 72 °C. Šetrná pasterace se používá proto, že jsou minimálně ovlivněny senzorycké a technologické vlastnosti mléka. Šetrnou pasterací bývá zachována aktivita laktoperoxidázy, menší procento denaturace bílkovin, a další. Pasterace mléka dle postupu výrobce může následovat ihned po standardizaci mléka. Cílem tepelného ošetření mléka by mělo být zničení většiny saprofytických mikroorganismů a inaktivace termorezistentní mikroflóry, které jsou při výrobě sýra nežádoucí nebo by dokonce mohly ohrozit zdraví konzumenta [54 - 58, 61, 63, 67].

Před samotným sýřením se do upraveného mléka přidávají primární a sekundární kultury. Tyto kultury jsou zodpovědné za jejich výsledné aroma a další vlastnosti. Jako primární kultury se přidávají například bakterie mléčného kvašení, zejména mikroorganismy rodu *Lactococcus*, konkrétně *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* a *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, dále například rody *Streptococcus* a *Lactobacillus*. Významným prodejcem nejen kyselinových kultur je např. Christian Hansen, DMS Food Specialties, aj.. Tyto mikroorganismy pro svůj růst a rozmnožování využívají jako zdroj energie mléčný sacharid laktózu. Tento disacharid je nejdříve štěpen na monosacharidy, zejména glukózu a galaktózu, které jsou dále rozkládány na organické kyseliny. V případě homofermentativního kvašení jako konečný produkt ze 70 – 90 % vzniká kyselina mléčná (více v kapitole 3.2 Procesy probíhající při zrání sýrů holandského typu). Pokud jde o kvašení heterofermentativní, kromě kyseliny mléčné mohou vznikat i další, například

propionová kyselina aj.. Přítomnost kyseliny mléčné způsobuje i pokles pH, které se sníží z hodnoty pH = 6,2 až na pH 4,5 – 5,0, a tím vytváří nevhodné podmínky pro některé kontaminující mikroorganismy [54 - 58, 60 - 63, 72].

U sýrů holandského typu se používá zejména sýření enzymatické nebo-li sladké. Přídavkem syřidla dochází ke srážení kasienu za vzniku sýřeniny. Dříve se jako syřidlo používal převážně chymosin, který se získává ze žaludku sajících telat. V současnosti je chymosin kvůli jeho nedostatku nahrazován syřidlovými preparáty, které jsou především mikrobiálního původu. Pomocí geneticky modifikovaných mikroorganismů (GMM) je získáváno syřidlo mikrobiálního původu (do příslušného mikroorganismu se vnese gen pro tvorbu chymosinu). Mezi nejčastěji používané GMM pro tyto účely patří například *Bacillus subtilis*, *Apergillus niger* a *Escherichia coli*, přičemž na našem trhu se využívají především dva posledně zmínění producenti [3, 54 - 58, 61 - 63, 66 - 69].

Sýření u tvrdých sýrů probíhá zpravidla 30 – 35 minut při teplotě okolo 32 °C. Díky kratší době sýření je nutná vyšší dávka syřidla. Následně je sýřenina krájena a míchána. Po uplynutí doby sýření je nutné odstranit syrovátku. Nově vzniklá sýrařská zrna mohou být dohřívána. Dohřívání je proces, který umožňuje dosažení požadované sušiny konečného výrobku. Pro polotvrdé až tvrdé sýry o obsahu tuku v sušině okolo 45 % se používá dohřívací voda o teplotě 60 – 90 °C. Do sýřeniny se pomalu přidává voda o dané teplotě, které má za úkol přehřívát sýřeninu (přibližně o 2 °C za 3 minuty). Po dohřívání nastupuje dosoušení, kdy se míchá sýřenina v syrovátce a snižuje se tak teplota sýřeniny. Pro sýry s nízkodohřívanou sýřeninou trvá dosoušení 20 – 30 minut. Takto připravená sýrařská zrna jsou vypouštěna do forem, kde dochází k formování konečného tvaru sýra. Jednotlivé tvary a velikosti forem závisí na jednotlivém druhu sýra. Pro urychlení odkapu syrovátky je možno použít lisování. Po odstranění syrovátky jsou sýry vyndány z forem a ponořeny po dobu 24 hodin do solné lázně. U sýrů holandského typu má solná lázeň koncentraci takovou, aby konečná hodnota NaCl v sýru byla okolo 1,5 – 3,0 %. Následně jsou sýry vytaženy ze solné lázně a po krátkém okapání jsou baleny do obalů, ve kterých před samotným uváděním na trh zrají sýry ve zracích sklepech. Například jak je uvedeno již výše, Gouda bývá zpravidla zalévána voskem. Eidam je v ČR balen do polopropustných cryovaků. Cryovaky jsou polyolefinové fólie, která propouští výpary směrem ven a tudíž zabrání kondenzaci těchto výparů na povrchu sýra. Zároveň ale zachovává po dlouhou dobu chuť a vůni sýra. Tato fólie rovněž zabraňuje prostupu

pachu z okolí dovnitř. Doba zrání sýrů holandského typu by měla být 6 – 8 týdnů při teplotě 10 ± 2 °C s relativní vlhkostí okolí 80 – 90 °C, pro sýry zrající v cryovacích přibližně 60 – 80 % relativní vlhkosti okolí. Delší doba zrání sýrů zatěžuje ekonomiku podniku, a tudíž je stále častěji zkoumáno zkrácení doby zrání. Nejběžnější možností akcelerace zrání sýrů je zvýšení zrací teploty. Vyšší teplota avšak může mít negativní vliv na celkovou jakost sýru. Z toho důvodu je nutné, aby u výroby sýru byly co nejkvalitnější hygienické podmínky s minimální možností kontaminace mikroorganismy [3, 53 - 61, 66, 67].

3.2 Procesy probíhající při zrání sýrů holandského typu

Díky zejména mikrobiálním enzymům v sýrech během zrání dochází k řadě biochemickým procesům, které mají vliv na konečnou strukturu sýrů, jejich chuť, vůni, aj.. U polotvrdých až tvrdých sýrů se porovnává tzv. hloubka zrání. Jde o srovnání celkového počtu aminokyselin a jejich produktů vztažených k celkovému dusíku [54].

- a) Rozklad laktózy na kyselinu mléčnou a přeměna kyseliny mléčné - jedná se zejména o homofermentativní kvašení způsobené bakteriemi mléčného kvašení, a to jak je již uvedeno výše jde především o bakterie rodu *Lactococcus*. Tyto bakterie zkvašují sacharid laktózu za vzniku jediného produktu (kromě oxidu uhličitého) kyseliny mléčné. Největší fermentace laktózy probíhá během formování sýrů při odkapávání a lisování. Pokud tento proces není zcela ukončen, ukládají se sýry na police pro dokončení fermentace, který je ukončen nejpozději do 24 hodin. Nově vzniklá kyselina reaguje s uvolněným vápníkem z kaseinu a vzniká tak mléčnan vápenatý. Během rozkladu laktózy dochází ke spojování sýřeniny za vzniku homogenní směsi. Kyselina mléčná má vliv i na konečnou kyselost sýra. Během prvních dnů zrání přeměňuje anorganické soli fosfátů a větší části vápenatých solí na rozpustné soli. V dalším průběhu zrání dochází k rozkladu kyseliny mléčné na další kyseliny (například propionová, octová, aj.), vodu, oxid uhličitý a další. Takto vzniklý oxid uhličitý způsobuje tvorbu ok, které jsou v malé míře u sýrů holandského typu žádoucí, a to 3 – 5 ok o velikosti hrášku. Menší oka jsou důsledkem toho, že sýry holandského typu mají méně laktózy a zrání probíhá při poněkud nižších teplotách (10 ± 2 °C) [3, 54 - 63, 72].

- b) Proteolýza – během proteolýzy dochází k rozpadu bílkovin na proteiny s nižším počtem aminokyselinových jednotek nebo až na jednotlivé aminokyseliny. Může probíhat buď jako primární (anaerobně v celé hmotě) nebo sekundární (aerobně od povrchu hmoty) zrání. Proteolýza je důsledkem působení enzymů primárních mlékařských kultur nebo přidavkem syřidla. U tepelně neošetřeného mléka může proteolýza probíhat i díky proteázám nativního mléka. Nejprve bílkoviny pomocí endoproteáz degradují na peptidy s vyšší molekulovou hmotností a následnou hydrolyzou se rozpadají na peptidy o nižší molekulové hmotnosti. Tripeptidy, dipeptidy nebo dokonce aminokyseliny mohou takto také vznikat, avšak po delší době zrání. Pozorování úrovně proteolýzy v sýru na konci doby zrání je důležité, protože poukazuje na peptidázovou aktivitu, a tudíž rozklad mléčné bílkoviny za vzniku volných aminokyselin [3, 54 - 63, 66].
- c) Reakce volných aminokyselin – z aminokyselin vznikají zráním takové látky, které výrazně mohou ovlivňovat zejména chuť a vůni (především aldehydy, ketony, kyseliny, aminoak, a další.). Za vhodných podmínek (kapitola 1.2.1 Podmínky pro vznik biogenních aminů) mohou z aminokyselin vznikat biogenní aminy, které při vyšších koncentracích jsou pro lidský organizmus toxické [3, 54 - 63, 66 - 69].
- d) Lipolýza a následné reakce volných mastných kyselin – lipolýza je proces, při kterém dochází k odbourávání tuku. Během tohoto procesu dochází k uvolňování mastných kyselin z triacylglycerolových jednotek. Lipolýza je velmi důležitý proces, protože následnými reakcemi volných mastných kyselin vznikají sensoricky významné látky (např. estery mastných kyselin, aj.) [3, 54 - 63, 67, 69, 72].

II. PRAKTICKÁ ČÁST

4 CÍL PRÁCE

Cílem teoretické části této diplomové práce bylo:

- charakterizovat biogenní aminy a popsat jejich význam sledování v potravinách,
- popsat výrobu holandských sýrů, zejména přírodní sýry eidamského typu.

Cílem praktické části této diplomové práce bylo:

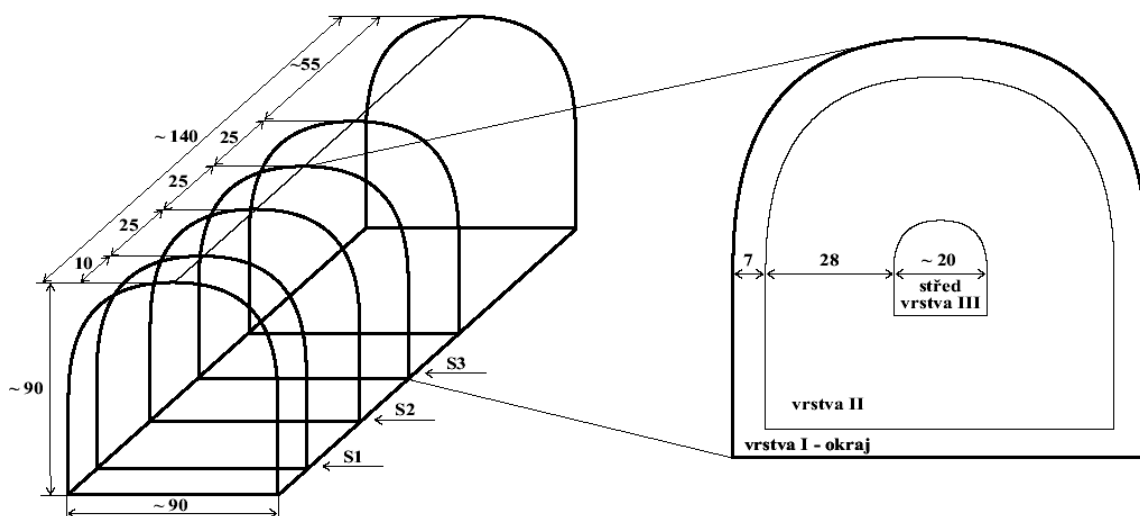
- založit zrací pokus sýrů eidamského typu při běžné zrací teplotě 10 ± 2 °C a 16 ± 2 °C,
- pozorovat koncentrace volných aminokyselin a biogenních aminů v průběhu zrání ve vybraných částech sýra,
- zhodnotit, jaký vliv má vyšší teplota na pH, koncentraci NaCl a sušiny v jednotlivých vrstvách, a na konečné koncentrace volných aminokyselin a biogenních aminů.

5 MATERIÁL A METODIKA

5.1 Charakteristika vzorků

Bylo vyrobeno 28 bloků sýru holandského typu (Eidam) o obsahu sušiny 50 % [w/w] a 30 % [w/w] obsahu tuku v sušině. Průměrná hmotnost vyrobených bloků byla $1,42 \pm 0,17$ kg (rozměry 90 mm šířka, 90 mm výška, 140 mm hloubka). Sýry byly vyrobeny běžným technologickým postupem z pasterovaného kravského mléka. První den výroby byly sýry po vyjmutí z forem vloženy do solné lázně. Následující den byly bloky vyjmuty ze solné lázně a po okapání byly baleny do cryovaků a umístěny do zracího sklepa. 4. den ode dne výroby bylo 10 bloků sýra umístěno do zrací komory při teplotě 16 ± 2 °C (sýr, u kterého byla použita akcelerace, dále označení A) a zbylých 18 bloků bylo ponecháno nadále ve zracím sklepě při teplotě 10 ± 2 °C (dále označeno jako kontrolní vzorek C). Analýza sýrů typu A probíhala 7., 14., 28., 42. a 56. den ode dne výroby. Vzorky sýrů typu C byly odebírány 1., 4., 7., 14., 28., 42., 56., 84. a 112. den ode dne výroby. Vzorky 1. den analýzy byly odebrány ještě před vložením do solné lázně. U vzorků C i A byla souběžně provedena základní chemická analýza i analýza pro zjištění koncentrace volných aminokyselin a biogenních aminů ve výše uvedené odběrové dny. Z každého analyzovaného bloku sýra byl nejprve odkrojen plát o tloušťce 10 mm, který nebyl použit k analýze. Z takto připraveného vzorku byly ukrojeny tři pláty, každý o tloušťce 25 mm (na Obrázku 6 označeny jako S1 – S3, dále v textu používáno jako C1 – C3 pro kontrolní vzorek sýra a A1 – A3 pro sýr, u něhož byla použita akcelerace). Každý plát byl dále rozdělen na tři vrstvy. Okrajová vrstva o tloušťce 7 mm (označena jako vrstva I), druhá vrstva o tloušťce 28 mm (vrstva II) a zbývající jádro (vrstva III o velikosti ~ 20 mm). Rozkrájení plátu na jednotlivé vrstvy je znázorněno na Obrázku 6. Po nařezání byla každá vrstva jednotlivě rozmělněna a připravena pro další analýzu. Vzorky byly pro kontrolu vždy připraveny ze dvou cihel zrajících ve stejné teplotě. Pro extrakci biogenních aminů byly připraveny lyofilizáty pomocí lyofilizátoru Christ Alpha 1 – 4 (Christ, Německo). Parametry lyofilizace: teplota – 40 °C, tlak ~ 12 Pa, 2 dny.

Obrázek 6 – Příprava bloků Eidamu pro analýzu.



5.2 Základní chemická analýza

Sušina byla stanovována sušením v sušárně při teplotě 102 ± 2 °C do konstantního úbytku hmotnosti. Tento způsob stanovení sušiny odpovídá ISO 5534:2004 [73]. Sušina byla u každého plátu z každé vrstvy stanovována dvakrát. pH bylo měřeno vpichem pomocí automatického kalibrovaného pH metru s přesností $\pm 0,01$ pH (pH Spear – Eutech Instruments). pH bylo měřeno u každého plátu a v každé vrstvě třikrát. Obsah NaCl v jednotlivých vrstvách byl stanoven argentometrickou metodou, kterou popsali Indra a Mizera [74]. Jedná se o titrační metodu, kde se jako činidlo používá dusičnan stříbrný a jako indikátor je zde chroman draselný, který v bodě ekvivalence vytváří hnědočervenou sraženinu chromanu stříbrného. Obsah NaCl byl stanovován u každého plátu z každé vrstvy dvakrát (stejně jako u stanovení sušiny).

5.3 Extrakce a stanovení biogenních aminů

Extrakce biogenních aminů byla provedena podle Buňkové a kol. [75, 76]. Do 15 ml zkumavek byl navážen 1 gram předem připravených lyofilizátů, ke kterému bylo přidáno 4 ml sodno-citrátového pufru (pH 2,2). Tato směs byla homogenizována při pokojové teplotě po dobu 20 minut a odstředována 15 minut při 6 000 g. Supernatant byl nalit do 10ml odměrné baňky a pelet reextrahován dalšími 4 ml sodno-citrátového pufru. Následovala extrakce a odstředování výše zmíněným způsobem. Oba supernatanty byly spojeny a odměrná baňka doplněna po rysku. Následně byla směs směs odstředována

pomocí odstředivky při 4 °C, 30 minut, 15 000 g. Takto připravený supernatant byl filtrován přes 0,45 µm nylonový filtr. Filtrát byl analyzován iontově-výměnnou kapalinovou chromatografií s postkolonovou derivatizací ninhydrinem pomocí Automatického analyzátoru aminokyselin AAA 400 (Ingos, Praha, Česká republika) s kolonou 55 x 3,7 mm a iontoměničem Ostion LG ANG. Analýza byla zaměřena na 4 biogenní aminy (histamin, tyramin, putrescin, kadaverin). Teplotní podmínky a eluční program jsou uvedeny v Tabulce 3. Složení jednotlivých pufrů je v Tabulce 5 [76]. Činidla, která byla během extrakce a chromatografické analýzy použita byla od firmy Ingos (Praha, Česká republika). Standardy, které byly použity, byly od firmy SigmaAldrich (St. Louis, MO, USA).

Tabulka 3 – Teplotní a eluční program použitý při chromatografickém stanovení biogenních aminů [76].

| Čas [min] | Činidlo | Teplota kolony [°C] |
|-----------|------------------------------|---------------------|
| 0 – 41 | pufr A | 65 |
| 41 – 60 | | 45 |
| 60 – 86 | pufr B | |
| 86 - 101 | 0,2 mol.l ⁻¹ NaOH | |
| 101 - 111 | pufr A | 65 |
| 111 - 120 | | |

5.4 Extrakce a stanovení volných aminokyselin

Chromatografická analýza byla zaměřena na přítomnost 22 volných aminokyselin a jejich derivátů (asparagová kyselina, threonin, serin, glutamová kyselina, glutamin, prolin, glycin, alanin, valin, methionin, cystein, isoleucin, leucin, tyrosin, phenylalanin, lysin, histidin, arginin, ornitin, citrulin, γ-aminomáselná kyselina). Extrakce byla provedena podle Pachlové a kol. [77]. 1 gram rozmělněného vzorku sýra byl navážen do 15ml zkumavek, do kterých byly přidány 4 ml sodno-citrátového pufru (pH 2,2). Následovala homogenizace při pokojové teplotě po dobu 20 minut a poté odstředění 15 minut při 6 000 g. Vzniklý supernatant byl převeden do 10ml odměrné baňky. Pelet byl reextrahován 4 ml sodno-citrátového pufru. Poté byly vzorky extrahovány a odstředovány způsobem, který je popsán výše. Supernatanty byly slity do jedné odměrné baňky, které byla následně doplněna po rysku. Poté byly supernatanty odstředovány při 4 °C po dobu 30 minut

při 15 000 g. Následovala filtrace pomocí 0,45 μm nylonového filtru. Získaný filtrát byl analyzován iontově-výměnnou kapalinovou chromatografií pomocí Automatického analyzátoru aminokyselin AAA 400 (Ingos, Praha, Česká republika) s kolonou 150 x 3,7 mm s iontoměničem Polymer AAA. Program pro stanovení volných aminokyselin trval 213 minut. Eluční program a teplotní podmínky jsou uvedeny v Tabulce 4. Složení jednotlivých pufrů je v Tabulce 5 [76]. Všechna použitá činidla pro extrakci a chromatografickou analýzu volných aminokyselin pochází od firmy Ingos (Praha, Česká republika). Standardy byly zakoupeny od firmy SigmaAldrich (St. Louis, MO, USA).

Tabulka 4 – Teplotní a eluční program použitý při chromatografickém stanovení biogenních aminů [76].

| Čas [min] | Činidlo | Teplota kolony [°C] |
|-----------|------------------------------|---------------------|
| 0 – 2 | pufr C | 40 |
| 2 – 46 | pufr D | |
| 46 – 83 | pufr E | 65 |
| 83 – 101 | pufr F | 70 |
| 101 – 162 | pufr G | |
| 162 – 180 | 0,2 mol.l ⁻¹ LiOH | |
| 180 – 213 | pufr C | 40 |

Tabulka 5 – Složení pufrů pro chromatografickou analýzu biogenních aminů a volných aminokyselin na 1000 ml [76].

| Činidlo | Pufr | | | | | | |
|----------------------------------|--------|--------|------|-------|-------|-------|-------|
| | A | B | C | D | E | F | G |
| monohdrát kyseliny citronové [g] | 1,55 | 14,00 | 9,56 | 10,19 | 10,05 | 9,50 | 8,96 |
| dihdrát citrátu sodného [g] | 21,00 | - | - | - | - | - | - |
| citrát lithný [g] | - | - | 2,08 | 3,24 | 6,25 | 15,45 | 50,02 |
| chlorid sodný [g] | 5,00 | - | - | - | - | - | - |
| chlorid lithný [g] | - | - | 6,68 | 7,01 | 12,01 | 7,01 | 28,32 |
| chlorid draselný [g] | - | 171,50 | - | - | - | - | - |
| bromid draselný [g] | 41,65 | - | - | - | - | - | - |
| hydroxid draselný [g] | - | 10,00 | - | - | - | - | - |
| azid sodný [g] | - | - | 0,10 | 0,10 | 0,10 | 0,10 | 0,10 |
| kyselina chlorovodíková [ml] | - | - | - | - | - | - | - |
| isopropanol [ml] | 250,00 | - | - | - | - | - | - |
| thiodiglykol [ml] | - | - | 2,5 | 2,5 | - | - | - |

6 VÝSLEDKY A DISKUZE

Kontrolní vzorek sýra zrál při teplotě 10 ± 2 °C 112 dnů ve zracím sklepě a vzorek A byl uložen při teplotě 16 ± 2 °C 56 dnů ve zrací komoře. V odběrové dny byly prováděny analýzy na zjištění obsahu nejen volných aminokyselin a biogenních aminů, ale i obsah sušiny, pH a koncentrace NaCl v jednotlivých vrstvách obou vzorků. Pomocí základní chemické analýzy bylo vyhodnoceno jaký vliv má vyšší teplota zrání na jednotlivé parametry sýra.

6.1 Základní chemická analýza

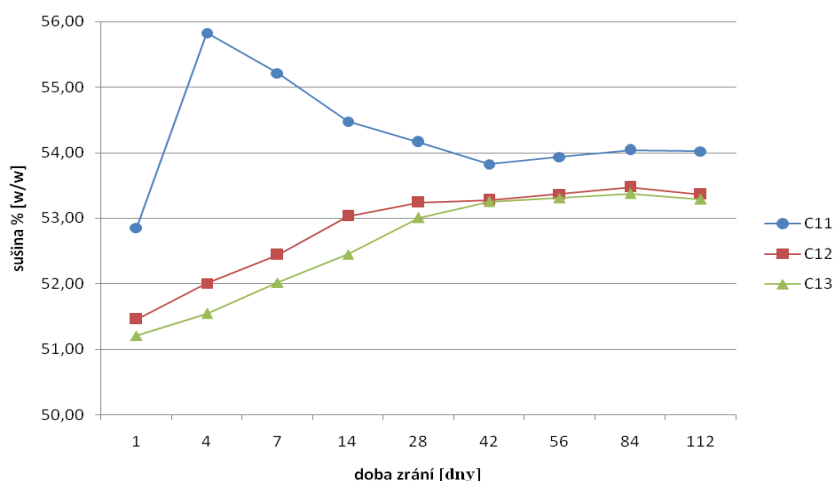
Po celou dobu zrání v porovnání všech plátů sýrů byl největší obsah sušiny zaznamenán v 1. plátu v I. vrstvě (vzorek C 11). První odběrový den v tomto vzorku byl obsah sušiny 52,85 %. Na konci experimentu (112. den) byl obsah sušiny v tomtéž vzorku 54,02 %. U všech plátů v I. vrstvách (C11, C 21, C 31) bylo zpozorováno, že 4. den analýzy došlo k výraznému vzrůstu obsahu sušiny, tato hodnota se přiblížila k hranici 56 %. Během 30. dne zrání došlo k vyrovnání obsahu sušiny a až do konce experimentu se tento obsah nijak výrazně neměnil. U vrstvy II a III (u všech plátů) nebyl zaznamenán významný rozdíl. Z počátku analýzy byl nejvyšší obsah sušiny naměřen u vzorku C12 (51,46%), naopak nejnižší obsah sušiny byl zpozorován u vzorku C22, a to 50,79 %. Od prvního dne analýzy měl obsah sušiny pozvolný rostoucí trend jak u vrstvy II, tak i u vrstvy III. Zpočátku byly vyšší obsahy sušiny naměřeny u vrstvy II než u vrstvy III, ale přibližně od 42. dne se tyto koncentrace začaly vyrovnávat a ve výjimečných případech, zejména u plátu 2 a 3, bylo zpozorováno, že vrstva III obsahovala více sušiny v porovnání s vrstvou II. Vyšší teplota zrání neměla na obsah sušiny v jednotlivých vrstvách a plátech žádný vliv a nebyly zpozorovány žádné významné rozdíly. Proto jsou níže uvedené grafy (Graf 1 – 3 pro jednotlivé pláty) jen pro obsah sušiny v kontrolním vzorku C.

Množství NaCl 1. den bylo téměř zanedbatelné. Ve všech plátech i vrstvách bylo naměřeno množství NaCl v rozmezí 0,13 – 0,16 % [w/w] ($P \geq 0.05$). Po nasolení vzorků došlo k rapidnímu nárůstu obsahu NaCl, zejména v okrajových vrstvách. Například koncentrace NaCl 4. den analýzy v I. vrstvách všech třech plátů byla v rozmezí 2,84 – 3,31 %. Od tohoto dne koncentrace NaCl v okrajových vrstvách pozvolna klesala až do konce analýzy, kde konečné hodnoty v krajních vrstvách byly v rozmezí 2,11 – 2,13 %.

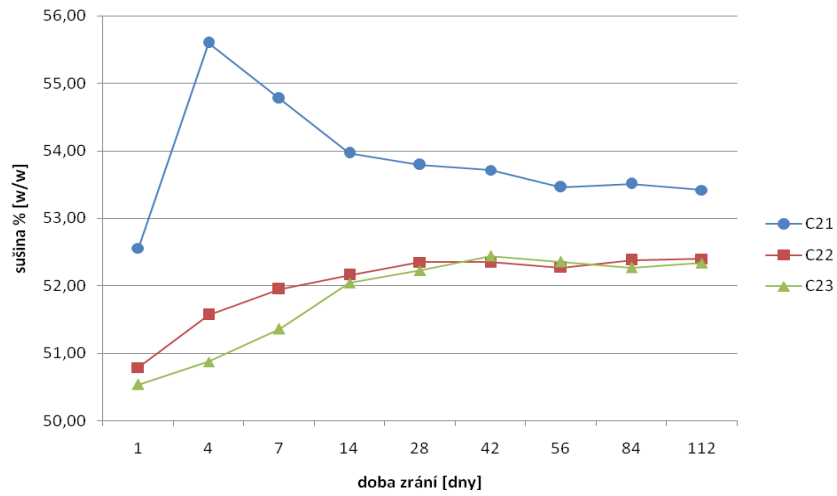
Ve II. a II. vrstvě všech plátů od nasolení docházelo ke zvyšování koncentrace NaCl a po 28. dnu zrání sýrů se koncentrace NaCl začaly vyrovnávat ve všech vrstvách. Vyšší teplota zrání ani poloha plátu neměly na výsledné obsahy NaCl v jednotlivých vrstvách téměř žádný vliv. Konečné obsahy NaCl ve všech vrstvách všech plátů sýru C byly v rozmezí 2,11 – 2,16 % [w/w] ($P < 0.05$). Koncentrace NaCl v jednotlivých plátech i vrstvách kontrolního vzorku C jsou znázorněny v Grafu 4 – 6. Jsou uvedeny koncentrace NaCl pouze pro kontrolní vzorek C, protože vyšší teplota zrání sýrů neměla na difuzi NaCl z okrajových do středových vrstev a tudíž nebyly zpozorovány žádné významné rozdíly mezi vzorkem C a A po celou dobu experimentu.

pH u kontrolního vzorku C bylo 1. odběrový den v rozmezí 6,30 – 6,33. U vzorku A byly hodnoty pH v rozmezí 6,28 – 6,31 ($P < 0.05$). Nebyly zaznamenány významné rozdíly mezi vzorky C a A pro konkrétní vrstvy a pláty. Bylo zpozorováno, že 4. den experimentu došlo k výraznému poklesu pH. Tento jev byl zaznamenán u všech vrstev všech plátů, a to vzorku C i vzorku A, hodnoty pH u obou vzorků v rozmezí 5,49 – 5,85 ($P < 0.05$). Od 7. dne až do konce experimentu hodnoty pH kolísaly u všech vrstev. Největší pH bylo naměřeno u všech plátů v krajních vrstvách. Hodnoty pH u vzorku A byly 1. a 4. stejné jako u kontrolního vzorku C. Avšak od 7. dne bylo pH u vzorku A poněkud vyšší než u vzorku C. Naměřené hodnoty 56. den analýzy ve vzorku A byly v rozmezí 5,52 – 5,73. Poněkud nižší hodnoty pH byly naměřeny u vzorku C 112. den experimentu, a to 5,56 – 5,65. Jelikož byl vývoj pH v průběhu zrání u jednotlivých plátů obou vzorků velmi podobný, je uveden pouze jeden graf. V Grafu 7 je znázorněn vývoj pH vzorku C i A po celou dobu zrání ve všech vrstvách 1. plátů.

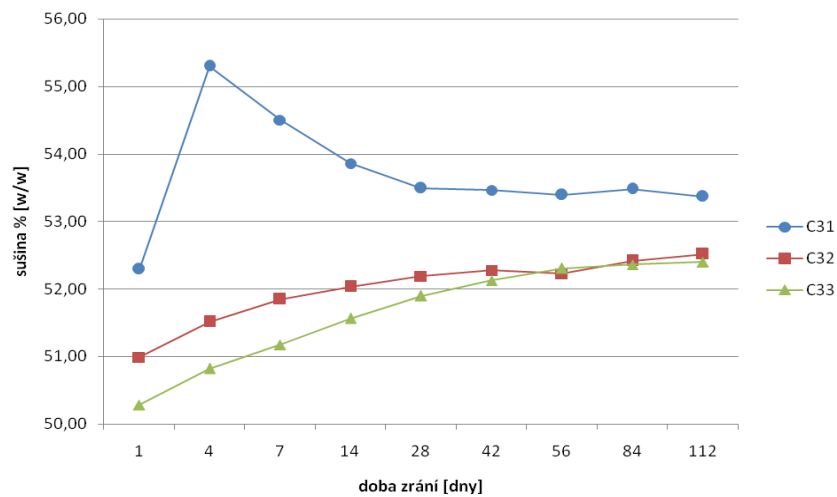
Graf 1 – Vývoj obsahu sušiny v 1. plátu kontrolního vzorku C.



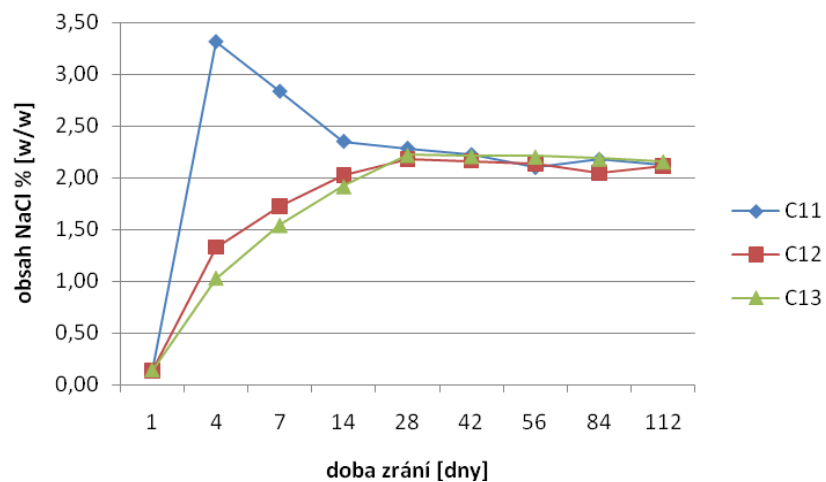
Graf 2 – Vývoj obsahu sušiny v 2. plátu kontrolního vzorku C.



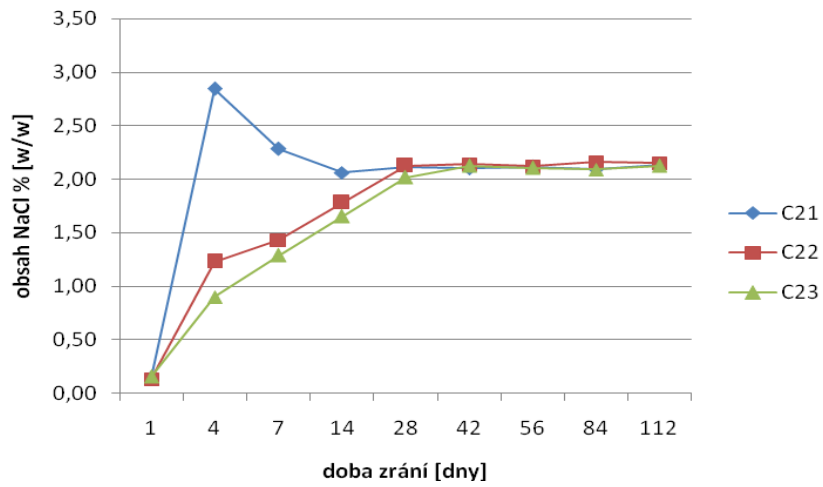
Graf 3 – Vývoj obsahu sušiny v 3. plátu kontrolního vzorku C.



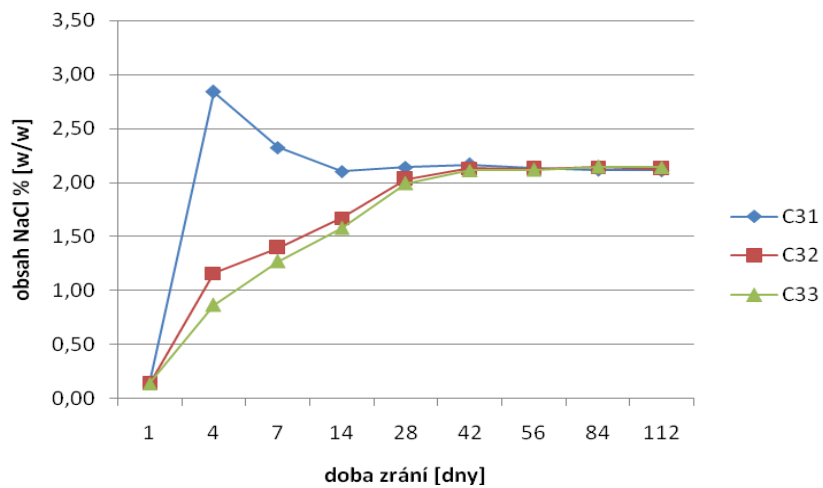
Graf 4 – Koncentrace NaCl po dobu zrání v 1. plátu vzorku C.



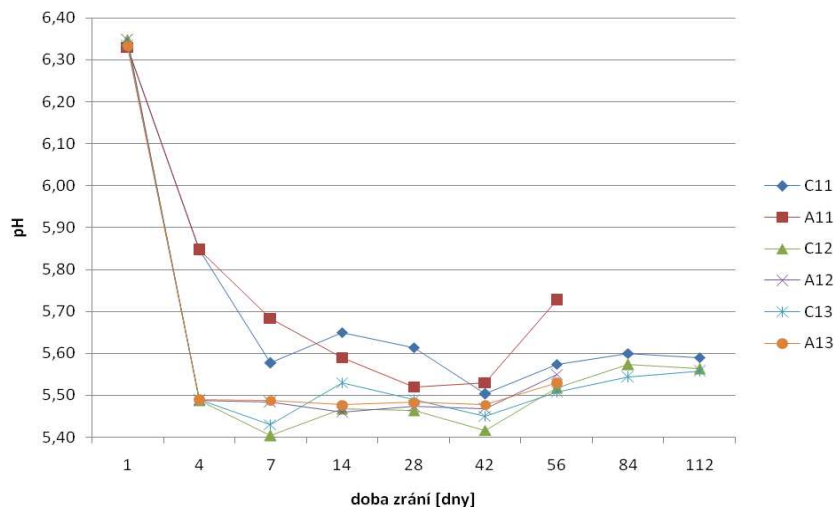
Graf 5 – Koncentrace NaCl po dobu zrání ve 2. plátu vzorku C.



Graf 6 – Koncentrace NaCl po dobu zrání ve 3. plátu vzorku C.



Graf 7 – Vývoj pH ve všech vrstvách I. plátů vzorku C a A.



6.2 Analýza obsahu biogenních aminů

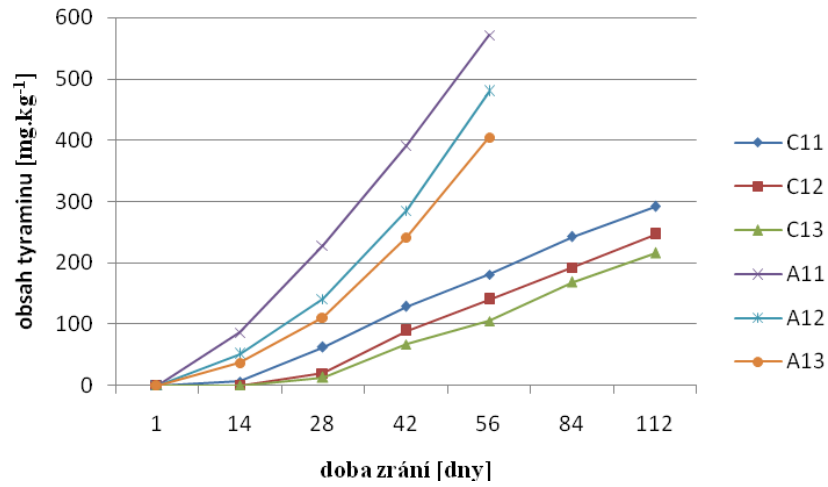
Během doby zrání sýrů byly pozorovány koncentrace 4 biogenních aminů (histamin, tyramin, putrescin a kadaverin). Histamin nebyl po celou dobu analýzy detekován ani v jednom ze vzorků C a A po celou dobu experimentu. Po celou dobu zrání byly naměřeny vyšší koncentrace tyraminu, putrescinu a kadaverinu nalezeny u vzorků A ($P < 0.05$).

Nejvyšší množství z biogenních aminů tvořil tyramin. Již od 4. dne analýzy byly koncentrace tyraminu výrazně vyšší u vzorku A. Po celou dobu jeho obsah ve vzorcích téměř exponenciálně narůstal. 56. den experimentu byly koncentrace u vzorku A téměř dvojnásobně vyšší než konečné koncentrace 112. den zrání vzorku C. Největší množství tyraminu byly detekovány v prvních plátech, zejména v okrajových vrstvách u všech plátů. V prvním plátu v okrajové vrstvě u vzorku A 56. den analýzy bylo naměřeno $571,6 \text{ mg.kg}^{-1}$, zatím co u kontrolního vzorku C 112. den experimentu byla naměřena hodnota $291,4 \text{ mg.kg}^{-1}$. Koncentrace tyraminu po celou dobu zrání v obou vzorcích jsou znázorněny v Grafu 8 – 10.

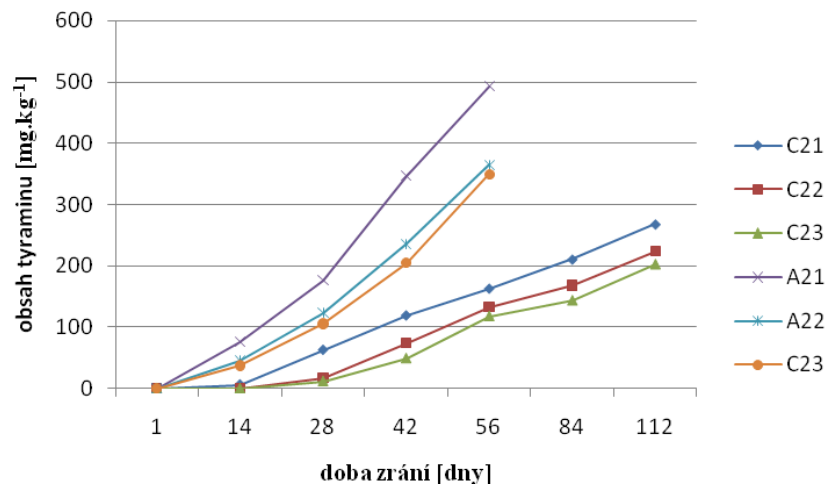
Vývoj koncentrace putrescinu byl téměř shodný s vývojem obsahu tyraminu. Největší hodnoty putrescinu naměřené ve vzorcích byly $257,5 \text{ mg.kg}^{-1}$, a to u vzorku A 56. den zrání sýrů. Opět byly nejvyšší koncentrace putrescinu zaznamenány v prvních plátech v okrajových vrstvách. V Grafu 11 – 13 je uveden vývoj obsahu putrescinu po celou dobu experimentu.

Koncentrace kadaverinu byly v porovnání s putrescinem a tyraminem nejmenší. Významný nárůst obsahu kadaverinu byl zpozorován 28. den analýzy. Jeho koncentrace narůstaly téměř exponenciálně až do konce experimentu. Stejně jako u tyraminu a putrescinu, tak i u kadaverinu naměřené množství 56. den u vzorku A ($108,3 \text{ mg.kg}^{-1}$ v I. plátu v okrajové vrstvě) byly téměř dvojnásobné než u vzorku C ($56,5 \text{ mg.kg}^{-1}$ také v I. plátu v okrajové vrstvě). I u kadaverinu byly vyšší koncentrace naměřeny v okrajových vrstvách než ve středové vrstvě. Vývoj koncentrací kadaverinu v jednotlivých plátech a vrstvách je znázorněno v Grafu 14 – 16.

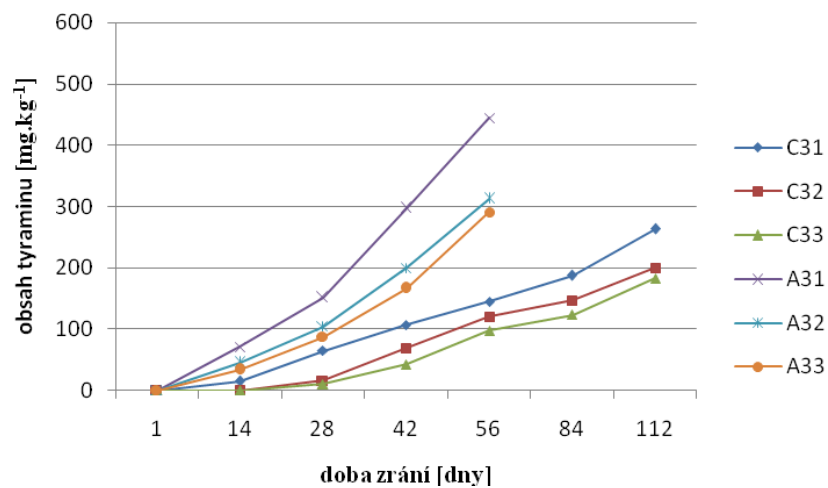
Graf 8 – Vývoj obsahu tyraminu u vzorku C a A v 1. plátech.



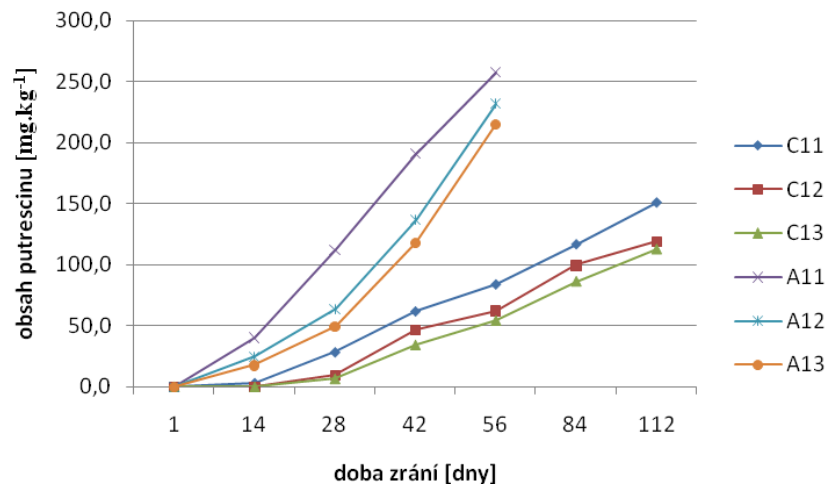
Graf 9 – Vývoj obsahu tyraminu u vzorku C a A ve 2. plátech.



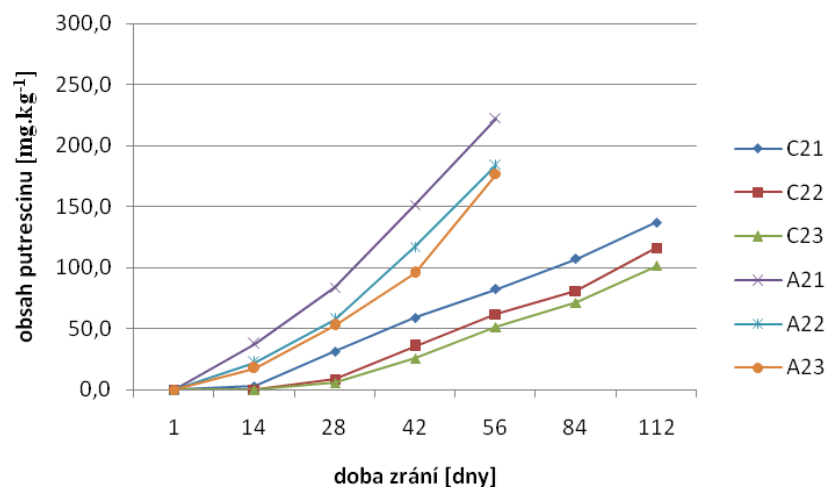
Graf 10 – Vývoj obsahu tyraminu u vzorku C a A ve 3. plátech.



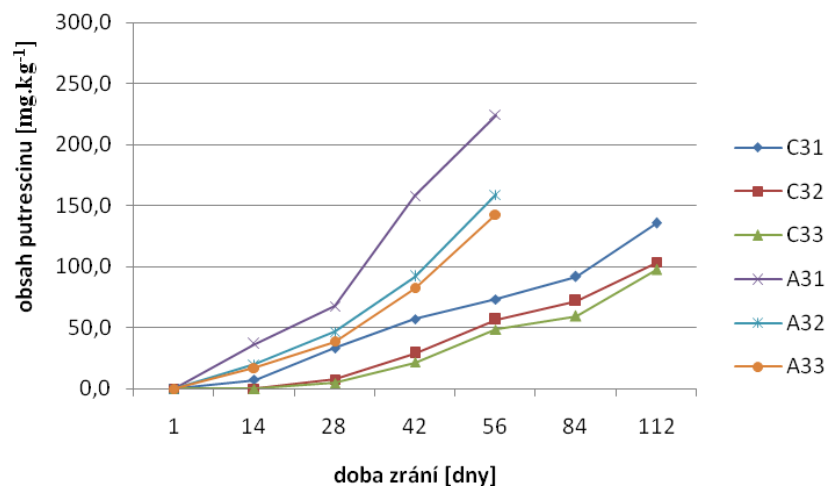
Graf 11 – Vývoj obsahu putrescinu u vzorku C a A v 1. plátech.



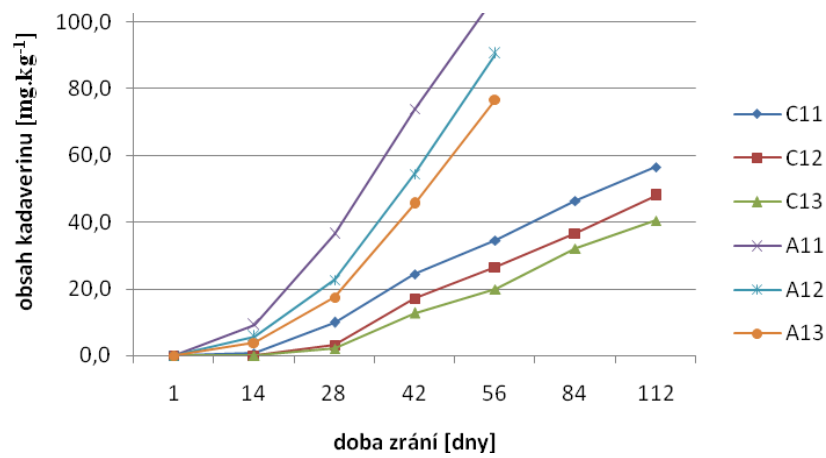
Graf 12 – Vývoj obsahu putrescinu u vzorku C a A ve 2. plátech.



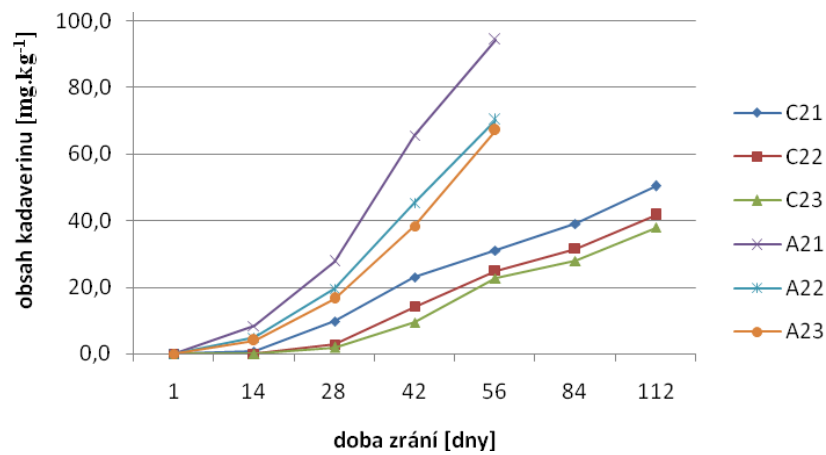
Graf 13 – Vývoj obsahu putrescinu u vzorku C a A ve 3. plátech.



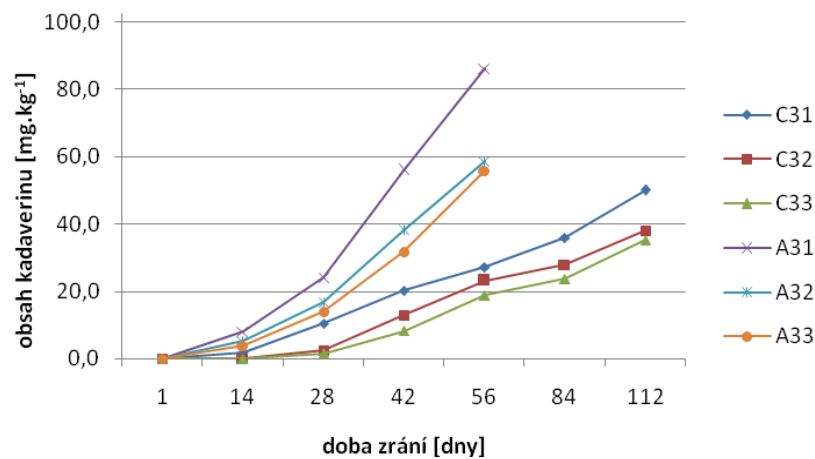
Graf 14 – Vývoj obsahu kadaverinu u vzorku C a A v 1. plátech.



Graf 15 – Vývoj obsahu kadaverinu u vzorku C a A ve 2. plátech.



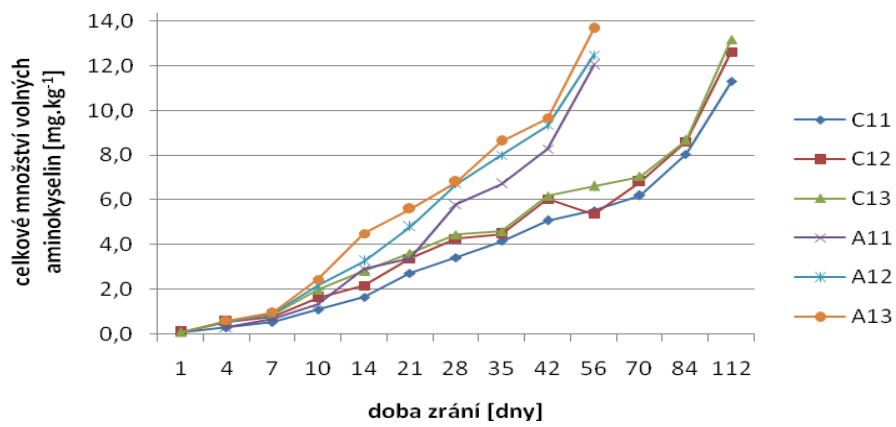
Graf 16 – Vývoj obsahu kadaverinu u vzorku C a A ve 3. plátech.



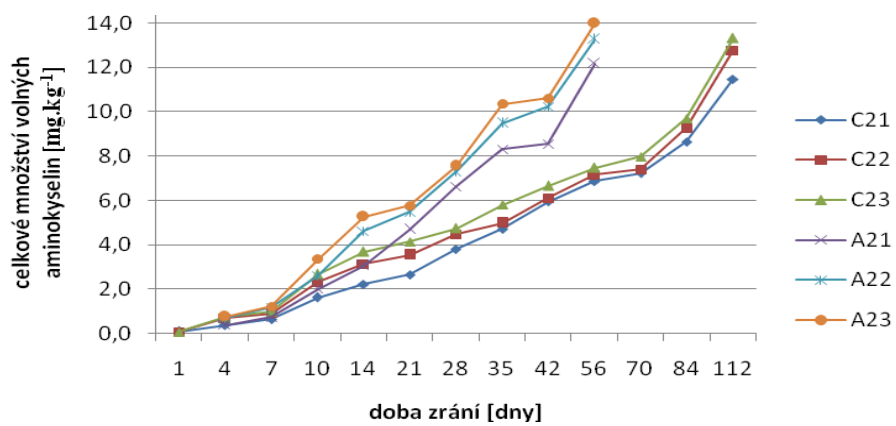
6.3 Analýza obsahu volných aminokyselin

Analýza volných aminokyselin byla zaměřena na přítomnost 22 aminokyselin a jejich derivátů, a to asparagová kyselina, threonin, serin, glutamová kyselina, glutamin, prolin, glycin, alanin, valin, methionin, cystein, isoleucin, leucin, tyrosin, phenylalanin, lysin, histidin, arginin, ornitin, citrulin, γ -aminomáselná kyselina. Výsledky byly vyjádřeny jako celkové součty jednotlivých volných aminokyselin či jejich derivátů. Od 1. do 10. dne analýzy docházelo k pozvolnému nárůstu celkového množství volných aminokyselin a nebyly zpozorovány žádné významné rozdíly mezi vzorky C a A. Od 14. dne analýzy výrazně vzrostlo množství volných aminokyselin zejména ve druhé a třetí vrstvě vzorku A (u všech plátů). Tento jev byl zaznamenán u všech analyzovaných vzorků. Ale od 0. do 14. Dne analýzy bylo zpozorováno, že celkové obsahy volných aminokyselin u druhé a třetí vrstvy vzorku C převyšovaly i koncentrace první okrajové vrstvy vzorku A. Až od 21. den experimentu výrazně vzrostla i celková koncentrace volných aminokyselin i v první vrstvě u vzorku A. U kontrolního sýra byl nárůst celkového množství volných aminokyselin poněkud pozvolnější než u vzorku A. 56. den analýzy byla koncentrace volných aminokyselin ve vzorku A téměř dvakrát vyšší než množství volných aminokyselin naměřené u kontrolního vzorku C tentýž den ($P < 0.05$). Nejvyšší naměřené koncentrace volných aminokyselin u vzorku A byla $14,36 \text{ mg.kg}^{-1}$. Ve vzorku C ve středu třetího plátu byla tato koncentrace $7,94 \text{ mg.kg}^{-1}$. Až 112. den analýzy se poměrně celkové koncentrace volných aminokyselin vyrovnaly a byly srovnatelné s koncentracemi ve vzorku A 56. den experimentu (ve středu třetího plátu vzorku C byl součet volných aminokyselin 112. den analýzy $14,35 \text{ mg.kg}^{-1}$). Nejnižší koncentrace volných aminokyselin tedy byly v krajních vrstvách, naopak nejvyšší ve středu plátu. V Grafu 17 – 19 je znázorněn vývoj celkového obsahu volných aminokyselin ve vzorku C i A.

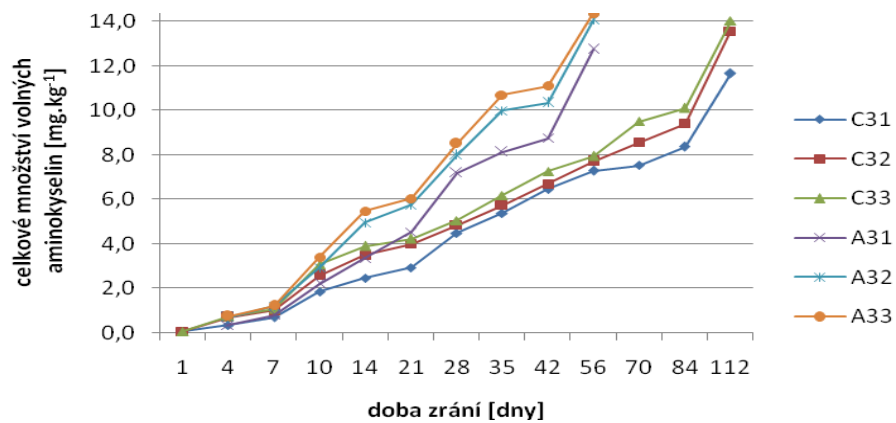
Graf 17 – Vývoj celkového obsahu volných aminokyselin ve vzorcích C a A v 1. plátech ve všech vrstvách.



Graf 18 – Vývoj celkového obsahu volných aminokyselin ve vzorcích C a A ve 2. plátech ve všech vrstvách.



Graf 19 – Vývoj celkového obsahu volných aminokyselin ve vzorcích C a A ve 3. plátech ve všech vrstvách.



6.4 Souhrnná diskuze

Vzorky C byly ponechány 112 dnů ve zracím sklepě při obvyklé zrací teplotě (~10 °C). Vzorky A zrály po dobu 56 dnů při vyšší teplotě ve zrací komoře (~16 °C). Po celou dobu zrání byla prováděna u obou vzorků základní chemická a chromatografická analýza. Základní chemickou analýzou bylo zjištěno, že vyšší teplota zrání neměla žádný významný vliv na obsah sušiny v jednotlivých vrstvách. Bylo zpozorováno, že největší obsah sušiny byl 1. plátu v krajní vrstvě, a to 52,85 %. U stejné vrstvy (C11) došlo 4. den k výraznému vzrůstu obsahu sušiny (55,83 %) a od 30. dne se obsah sušiny výrazně neměnil až do konce experimentu (54,02 %). Hodnoty ve II. a III. vrstvě se výrazně nelišily, a od počátku experimentu měly rostoucí trend. Konečné obsahy sušiny u II. a III. vrstev byly v rozmezí 52,40 – 53,36 %. Nebylo nashromážděno dostatek informací pro vysvětlení jevu, že u I. vrstvy byly naměřeny vyšší obsahy sušiny, a to po celou dobu experimentu u všech plátů. Lze však předpokládat, že právě vyšší obsah sušiny v okrajové vrstvě může být důsledkem interakcí polopropustného obalového materiálu s okrajovou vrstvou a také vzájemnými interakcemi mezi jednotlivými vrstvami plátů [59, 60, 77].

Dále byla základní chemickou analýzou pozorována difuze NaCl od I. vrstvy k jádru plátu. Před samotným nasolením vzorků byla koncentrace NaCl ve všech vrstvách téměř zanedbatelná (0,12 – 0,16 %). Po nasolení sýrů došlo k výraznému vzrůstu koncentrace NaCl zejména v okrajových vrstvách. Od 28. dne docházelo k vyrovnávání koncentrace NaCl mezi jednotlivými vrstvami. Bylo zpozorováno, že vyšší teplota v průběhu zrání na difuzi NaCl mezi jednotlivými vrstvami neměla žádný výrazný vliv.

Základní chemickou analýzou byl pozorován i vliv teploty na hodnoty pH v průběhu experimentu. Naměřené hodnoty pH 1. den analýzy byly v rozmezí 6,28 – 6,33). Avšak 4. den experimentu byl zpozorován pokles pH ve všech vrstvách u všech plátů. Do 4. dne byl zaznamenán pokles hodnot pH, které se u většiny vnitřních vrstev pohybovaly na úrovni pH ~ 5,50. Po 4. dnu se hodnoty pH začaly velmi pozvolně zvyšovat a na konci experimentu dosahovaly obvykle hodnot pH ~ 5,60. Od tohoto dne hodnoty pH kolísaly až do konce experimentu. Naměřené hodnoty pH u vzorku A byly poněkud vyšší než u vzorku C. Důvodem výrazného poklesu pH 4. den analýzy může být vznik kyseliny mléčné, jejíž přítomnost ve vzorcích je důsledkem rozkladem laktózy pomocí bakterií mléčného kvašení. Následný vzrůst pH může být důvodem metabolismu vzniklé kyseliny

mléčné, kdy mohou vznikat sloučeniny se zásaditou reakcí (viz. 3.2 Procesy probíhající při zrání sýrů holandského typu) [59, 60, 62, 67].

Chromatografickou analýzou byly stanoveny koncentrace volných aminokyselin, jejichž množství může být významným ukazatelem probíhající proteolýzy během zrání. Úroveň proteolýzy při zrání sýrů je významná, protože má vliv na konečnou jakost, vůni či chuť sýra. Zvyšující se množství volných aminokyselin bylo zaznamenáno od 7. dne experimentu. Již od tohoto dne byly detekovány vyšší koncentrace ve vzorku, který byl po celou dobu experimentu uskladněn při vyšší teplotě. Stejně jako u biogenních aminů rostlo celkové množství volných aminokyselin po celou dobu analýzy exponenciálně. Konečné koncentrace u vzorku C (112. den analýzy) byly v rozmezí 11,5 – 14,5 mg.kg⁻¹. Tyto hodnoty jsou srovnatelné s obsahem volných aminokyselin ve vzorku A 56. den analýzy, které byly v rozmezí 12,0 – 14,5 mg.kg⁻¹. Jak u vzorku C, tak i u vzorku A byly vyšší koncentrace volných aminokyselin zjištěny ve středových vrstvách. Důvodem vyššího množství volných aminokyselin u sýru zrajícího při vyšší teplotě může být vyšší teplota zrání. Předpokládá se, že při vyšší teplotě zrání je mikrobiální činnost bakterií mléčného kvašení vyšší. Díky tomu předpokladu dochází při vyšší teplotě k rychlejšímu rozkladu bílkovin na jednotlivé volné aminokyseliny.

Chromatografickou analýzou vzorku C a A bylo zjištěno, že nejvíce zastoupeným biogenním aminem po celou dobu experimentu byl tyramin. Naopak nejnižší naměřené koncentrace v průběhu zrání u obou vzorků patřily kadaverinu. Přítomnost histaminu po celou dobu zrání u obou vzorků nebyla zjištěna ani u jednoho ze dvou vzorků sýrů. Celkové množství biogenních aminů po celou dobu zrání exponenciálně rostlo. U kontrolního vzorku C byly koncentrace biogenních aminů do 14. dne analýzy zanedbatelné. Avšak od 28. dne došlo k pozvolnému nárůstu celkového množství, které se zvyšovalo až do 112. dne, kde konečná celková koncentrace biogenních aminů byla v rozmezí 264 – 500 mg.kg⁻¹. U vzorku sýra A byl významný nárůst celkového množství biogenních aminů zaznamenán již 14. den analýzy, a již 56. den byly celkové hodnoty v rozmezí 490 - 940 mg.kg⁻¹. Nejvyšší koncentrace byly naměřeny v krajních vrstvách. Tyto vysoké hodnoty mohou být důsledkem toho, že při vyšší teplotě zrání sýrů mají mikroorganismy vyšší dekarboxylázovou aktivitu. Výrazně vyšší celkové koncentrace u vzorku zrajícího při vyšší teplotě mohly být způsobeny právě vyšší teplotou, díky větší aktivitě přítomných mikroorganismů (především nonstartéry) [75, 77]. Takto poměrně

vysoké hodnoty již nejsou zcela bezpečné pro lidský organizmus a mohou jej negativně ovlivňovat [8]. Například koncentrace tyraminu ve vzorku A 56. den skladování byla v rozmezí 209 – 575 mg.kg⁻¹. Současná vyhláška již neuvádí horní hranice koncentrace tyraminu [24]. Avšak dřívější, dnes již neplatná, vyhláška stanovovala maximální koncentraci tyraminu v sýrech na 200 mg.kg⁻¹ [28].

Z hlediska proteolýzy má vyšší teplota zrání pozitivní vliv. Dle provedeného experimentu lze konstatovat, že z hlediska konečného obsahu volných aminokyselin má vyšší teplota výrazný vliv na zkrácení doby zrání sýru. U analyzovaného sýra byly naměřeny stejné hodnoty již 56. den experimentu u vzorku A jako u kontrolního vzorku 112. den experimentu. Dle úrovně proteolýzy je díky vyšší teplotě skladování zkrácena doba zrání o polovinu. Avšak na koncentraci biogenních aminů má vyšší teplota zrání sýrů spíše negativní vliv. Byly naměřeny hodnoty, které dle dostupných zdrojů překročí hranici doporučené maximální koncentrace jednotlivých biogenních aminů [3], [20], [26]. Přítomnost vyšších koncentrací (zejména tyraminu) může u konkrétních jedinců mít negativní důsledky na zdraví lidského organismu. Předpokládá, že právě vyšší teplota je důsledkem vysokých koncentrací biogenních aminů ve vzorku A. Přítomnost kadaverinu a putrescinu může mít za následek zvyšování zejména negativních účinků detekovaného tyraminu na lidský organizmus (viz kapitola 1.4 Účinky biogenních aminů na lidský organizmus).

ZÁVĚR

V rámci diplomové práce byl založen experiment, ve kterém měly být srovnány vybrané parametry sýrů zrajících při běžné teplotě (~ 10 °C) a zvýšené teplotě (~ 16 °C). Základní chemickou analýzou a chromatografickou analýzou byly sledovány hodnoty pH, obsahy sušiny, volných aminokyselin a vybraných biogenních aminů v jednotlivých částech testovaných přírodních sýrů.

Základní chemickou analýzou bylo zjištěno, že:

- vyšší teplota zrání neměla významný vliv na vyrovnávání obsahu sušiny či NaCl,
- u vzorku sýra zrajícího při vyšší teplotě byly naměřeny mírně vyšší hodnoty pH, a to zejména u okrajových vrstev.

Chromatografickou analýzou bylo zjištěno, že:

- celkové obsahy volných aminokyselin ve vzorku A 56. den analýzy odpovídaly celkovým koncentracím 112. den experimentu ve vzorku zrajícím při běžné zrací teplotě (vzorek C),
- u vzorku A byly 56. den celkové koncentrace biogenních aminů téměř dvojnásobné než u kontrolního sýra 112. den analýzy.

Z provedených chromatografických analýz lze usoudit, že proteolýza probíhala rychleji u sýra zrajícího při vyšší teplotě. Dle naměřených celkových koncentrací volných aminokyselin lze říci, že vyšší teplota zrání má pozitivní vliv na proteolýzu a tudíž naznačuje možnost zkrácení doby zrání sýrů na polovinu. Avšak u vzorku A byly naměřeny významné koncentrace sledovaných biogenních aminů, které mohou negativně ovlivňovat zdraví konzumenta. Díky vyšší teplotě zrání dochází ke zvýšení dekarboxylázové aktivity mikroorganismů.

Závěrem lze říci, že vyšší teplotou lze dosáhnout urychlení zracích procesů a tím zkrátit dobu zrání až na polovinu. Na druhou stranu je nutné velmi obezřetně sledovat obsah biogenních aminů, který může v důsledku akcelerace značně vzrůst a ohrozit tak bezpečnost konzumovaných sýrů.

Tato diplomová práce je součástí komplexnějšího článku „The effect of elevated temperature on ripening of Dutch type cheese” (Příloha II), který bude zaslán k recenzi do mezinárodního časopisu.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] *Spotřeba potravin a nealkoholických nápojů na 1 obyvatele v ČR v letech 2000 – 2009* [online]. [cit. 23. března 2011]. Dostupné z: [http://www.czso.cz/csu/2010ediciplan.nsf/t/EA0049D17E/\\$File/30041001.pdf](http://www.czso.cz/csu/2010ediciplan.nsf/t/EA0049D17E/$File/30041001.pdf)
- [2] *Dutch-type cheese* [online]. [cit. 23. března 2011]. Dostupné z: <http://dutchfood.about.com/od/aboutdutchcooking/a/SayCheese.htm>
- [3] ROGINSKI, H.; FUQUAY, J.W.; FOX, P.F. *Encyclopedia of dairy sciences*. London: Academic press, 2002. ISBN 0-12-227235-8.
- [4] KOMPRDA, T. *Obecná hygiena potravin*. Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, 2004. ISBN 80-7157-757-X.
- [5] KALAČ, P.; KŘÍŽEK, M. Biogenní aminy a polyaminy v potravinách a jejich vliv na lidské zdraví. *Potravinářská Revue*, 2005, 2, 40-42.
- [6] VELÍŠEK, J. *Chemie potravin 3*. Tábor: Osis, 1996. ISBN 80-902391-5-3.
- [7] SHALABY, A.R. Significance of biogenic amines to food safety and human health. *Food Research International*, 1996, 29 (7), 675-690.
- [8] SANTOS, M.H.S. Biogenic amines: their importance in foods. *Journal of Food Microbiology*, 1996, 29 (2-3), 213-231.
- [9] NOUT, M.J.R. Fermented foods and food safety. *Food Research International*, 1994, 27 (3), 291-298.
- [10] *Syntézy vzniku biogenních aminů a aminokyselin* [online]. [citace 15. ledna 2011]. Dostupné z: <http://biocyc.org/>
- [11] EDWARDS, S.T.; SANDINE, W.E. Symposium: Microbial metabolites of importance in dairy products. *Journal of Dairy Science*, 1981, 64 (12), 2341-2438.
- [12] LANGE, J.; THOMAS, K.; WITTMANN CH. Comparison of a capillary electrophoresis method with high-performance liquid chromatography for the determination of biogenic amines in various food samples. *Journal of Chromatography B*, 2002, 779 (2), 229-239.

- [13] ROON, R.J; BARKER, H.A. Fermentation of agmatine in *Streptococcus faecalis*: occurrence of putrescine transcarbamoylase. *Journal of bacteriology*, 1972, 109 (1), 44-55.
- [14] HALÁSZ, A.; BARÁTH, Á.; SIMON-SARKADI, L.; HOLZAPFEL, W. Biogenic amines and their production by microorganism in food. *Trends in Food Science & Technology*, 1994, 5 (2), 42-49.
- [15] NOVELLA-ROGRÍGUEZ, S.; VECIANA-NOGUÉS, T.; VIDAL-CAROU, C. Biogenic amines and polyamines in milks and cheeses by ion-pair high performance liquid chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2000, 48 (11), 5117-5123.
- [16] BODMER, S.; IMARK, C.; KNEUBÜHL, M. Biogenic amines in foods: Histamine and food processing. *Inflammation Research*, 1999, 48 (6), 296-300.
- [17] DRABIK-MARKIEWICZ, G.; DEJAEGHER, B.; DE MEY, E.; KOWALSKA, T.; PAELINCK, H.; HEYDEN, V.Y. Influence of putrescine, cadaverine, spermidine or spermine on the formation of *N*-nitrosamine in heated cured pork meat. *Food chemistry*, 2011
- [18] YURCHENKO, S.; MÖLDER, U. Volatile *N*-nitrosamines in various fish products. *Food chemistry*, 2006, 96, 325-333.
- [19] KALAČ, P.; KRAUSOVÁ, P. A review of dietary polyamines: formation, implications for growth and health and occurrence in food. *Food Chemistry*, 2005, 90 (1-2), 219-230.
- [20] KALAČ, P.; HLAVATÁ, V.; KŘÍŽEK, M. Concentrations of five biogenic amines in Czech beers and factors affecting their formation. *Food Chemistry*, 1997, 58 (3), 209-214.
- [21] RIOG-SAGUÉS, A.X.; MOLINA, A.P.; HERNÁNDEZ-HERRERO, M.M. Histamine and tyramine-forming microorganisms in Spanish traditional cheeses. *European food research and technology*, 2001, 215 (2), 96-100.
- [22] JAYARAJAH, C.N.; SKELLEY, A.M.; FORTNER, A.D.; MATHIES, R.A. Analysis of neuroactive amines in fermented beverages using a portable microchip capillary electrophoresis system. *Analytical chemistry*, 2007, 79 (21), 8162-8169.

- [23] MORENO-ARRIBAS, M.V.; POLO, M.C. *Wine chemistry and biochemistry*. New York: Springer, 2009. ISBN 978-0-387-74116-1.
- [24] Vyhláška Ministerstva zdravotnictví 305/2004 Sb. (platné znění) ze dne 6. května 2004, kterou se stanoví druhy kontaminujících a toxikologicky významných látek a jejich přípustné množství v potravinách. In *Sbírka zákonů České republiky*. 2004, částka 100, s. 6398-6406.
- [25] STANDARDA, S.; VESELÁ, M.; DRDÁK, M. Determination of biogenic amines in cheese by ion exchange chromatography. *Nahrung/Food*, 2000, 44 (1), 28-31.
- [26] ÖNAL, A. A review: current analytical methods for the determination of biogenic amines in foods. *Food Chemistry*, 2007, 103 (4), 1475-148.
- [27] SMĚLÁ, D.; PECHOVÁ, P.; KOMPRDA, T.; KLEJDUS, B.; KUBÁŇ, V. Chromatografické stanovení biogenních aminů v trvanlivých salámech během fermentace a skladování. *Chemické listy*, 2004, 98, 432-437.
- [28] Vyhláška Ministerstva zdravotnictví č. 298/1997 Sb. (zrušena od 1. 3. 2002) ze dne 28. listopadu 1997, kterou se stanoví chemické požadavky na zdravotní nezávadnost jednotlivých druhů potravin a potravinových surovin, podmínky jejich použití, jejich označování na obalech, požadavky na čistotu a identitu přídatných látek a potravních doplňků a mikrobiologické požadavky na potravní doplňky a látky přídatné. In *Sbírka zákonů České republiky*. 1997, částka 99, s. 5474-5799.
- [29] RAN, I.; MIURA, R.M.; PUIL, E. Spermine modulates neuronal excitability and NMDA receptors in juvenile gerbil auditory thalamus. *Hearing research*, 2003, 176 (1-2), 65-79.
- [30] ADIBHATLA, R.M.; HATCHER, J.F.; SAILOR, K.; DEMPSEY, R.J. Polyamines and central nervous system injury: spermine and spermidine decrease following transient focal cerebral ischemia in spontaneously hypertensive rats. *Brain research*, 2002, 938 (1-2), 81-86.
- [31] PROESTOS, C.; LOUKATOS, P.; KOMAITIS, M. Determination of biogenic amines in wines by HPLC with precolumn dansylation and fluorimetric detection. *Food chemistry*, 2008, 106 (3), 1218-1224.

- [32] OGURI, S. Electromigration methods for amino acids, biogenic amines and aromatic amines. *Journal of Chromatography B*, 2000, 747 (1-2), 1-19.
- [33] LATORRE-MORATALLA, M.L.; BOVER-CID, S.; VECIANA.NOGUÉS, T.; VIDAL-CAROU, M.C. Thin-layer chromatography for the identification and semi-quantification of biogenic amines produced by bacteria. *Journal of Chromatography A*, 2009, 1216 (18), 4128-4132.
- [34] MARCOBAL, A.; RIVAS, B.; de las MUÑOZ, R. Methods for the detection of bacteria producing biogenic amines on foods: A Survey. *Journal of Consumer Protection and Food Safety*, 2006, 1 (3), 187-196
- [35] ARCE, L.; RIOS, A.; VALCÁRCEL, M. Selective and rapid determination of biogenic amines by capillary zone electrophoresis. *Chromatographia*, 1997, 46 (3-4), 170-176
- [36] BOCKHARDT, A.; KRAUSE, I.; KLOSTERMEYER, H. Determination of biogenic amines by RP-HPLC of the dabsyl derivatives. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und Forschung A*, 1996, 203 (1), 65-70.
- [37] LINGEMAN, H.; UNDERBERG, W.J.M. *Detection-oriented derivatization techniques in liquid chromatography*. New York: Marcel Dekker, 1990, ISBN 0824782879.
- [38] LORES, M.; CABALEIRO, O.; CELA, R. Post-column photochemical derivatization in high-performance liquid chromatography. *Trends in analytical chemistry*, 1999, 18 (6), 392-400.
- [39] OGURI, S.; OKUYA, Y.; YANASE, Y.; SUZUKI, S. Post-column derivatization capillary electrochromatography for detection of biogenic amines in tuna-meat. *Journal of chromatography A*, 2008, 1202 (1), 96-101.
- [40] FAN, X.; YOU, J.; KANG, J.; OU, Q.; ZHU, Q. New reagents for determination of amino acids by liquid chromatography with pre-column fluorescence derivatization. *Analytica Chimica acta*, 1998, 367 (1-3), 81-91.
- [41] YOU, J.; FAN, X.J.; ZHU, Q.; SU, Y. Liquid chromatographic determination of amino acids and peptides by pre-column fluorescence derivatization with *N*-

- hydroxysuccinimidyl- α -(9-acridine)-acetate. *Analytica chimica acta*, 1998, 367 (1-3), 69-79.
- [42] PEÑA-GALLEGO, A.; HERNÁNDEZ-ORTE, P.; CACHO, J.; FERREIRA, V. Biogenic amine determination in wines using solid-phase extraction: A comparative study. *Journal of Chromatography A*, 2009, 1216, (15), 3398-3401.
- [43] CASTILLO, M.A.; CASTELLS, R.C. Procedure for the determination of biogenic amines by derivatization with dabsyl chloride and reversed phase liquid chromatography. *Chromatographia*, 2001, 54 (11/12), 711-716.
- [44] KURT, S.; ZORBA, Ö. The effects of ripening period, nitrite level and heat treatment on biogenic amine formation of „sucuk“ – A Turkish dry fermented sausage. *Meat Science*, 2009, 82 (2), 179-184.
- [45] BUSTO, O.; VALERO, Y.; GUASCH, J.; BORRULL, F. Solid phase extraction applied to the determination of biogenic amines in Wines by HPLC. *Chromatographia*, 1994, 38 (9/10), 571-578.
- [46] GARCÍA-VILLAR, N.; HERNÁNDEZ-CASSOU, S.; SAURINA, J. Determination of biogenic amines by pre-column derivatization and high-performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry. *Journal of chromatography A*, 2009, 1216 (36), 6387-6393.
- [47] BARDELMEIJER, H.A.; LINGEMAN, H.; DE RUITER, C.; UNDERBERG, W.J.M. Derivatization in capillary electrophoresis. *Journal of chromatography A*, 1998, 807 (1), 3-26.
- [48] FERNANDES, J.O.; JUDAS, I.C.; OLIVEIRA, M.B.; FERREIRA, I.M.P.L.V.O.; FERREIRA, M.A. A GC-MS method for quantitation of histamine and other biogenic amines in beer. *Chromatographia*, 2001, 53 (1), 327-331.
- [49] VELÍŠEK, J. *Chemie potravin 1*. Vyd. 2. uprav. Tábor: OSSIS, 2002. ISBN 8086659003.
- [50] ODSTRČIL, J.; ODSTRČILOVÁ, M. *Chemie potravin*, Brno: Národní centrum ošetrovatelství a nelékařských zdravotnických oborů, 2006. ISBN 8070134356.
- [51] DAVÍDEK, J.; HAJŠLOVÁ, J.; POKRNÝ, J.; VELÍŠEK, J. *Chemie potravin*, Vyd. 2. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 1991. ISBN 8070800976.

- [52] McMURRY, J. *Organická chemie*, Vyd. 1. Brno: VUTIUM, 2007. ISBN 9788021432918.
- [53] JENNESS, R.; KEENEY, M.; MARTH, E.H. *Fundamentals of dairy chemistry*, 3rd edition Gaithersburg: Aspen publishers, 1999. ISBN 0-8342-1360-5.
- [54] BUŇKA, F. *Speciální potravinářská technologie II. (přednášky)* Zlín: UTB, únor – květen 2010.
- [55] ZIMÁK, E. *Technologie*. Nakladatelství technické literatury, n.p., 1988. ISBN 0480488.
- [56] BŘEZNINA, P.; HRABĚ, J.; KOMÁR, A. *Technologie, zbožíznalectví a hygiena potravin II.část - technologie, zbožíznalectví a hygiena potravin živočišného původu*. Vyškov: VVŠ PV, 2001. ISBN 80-7231-076-8.
- [57] KADLEC, P., et al. *Technologie potravin II.*, 1st ed. Praha: VŠCHT, 2002. ISBN 80-7080-510-2.
- [58] GAJDUŠEK, S. *Mlékařství II.*, 1st ed. Brno: MZLU, 1998. ISBN 80-7157-342-6.
- [59] FOX, P.F.; McSWEENEY, P.; COGAN, T.M.; GUINEE, T.P. *Cheese -major cheese groups*, volume 2. 3rd ed. Academic press, 2004. ISBN 978-0-1226-3653-0.
- [60] FOX, P.F. *Cheese - chemistry, physics and microbiology*, volume 1. 2nd ed. Springer, 1999. ISBN 978-0-8342-1339-5.
- [61] SCOTT, R.; ROBINSON, R.K.; WILBEY, R.A. *Cheesemaking practice*. Verlag : Springer, 1998. ISBN 978-0-7514-0417-3.
- [62] FOX, P.F.; McSWEENEY, P.L.H. *Dairy chemistry and biochemistry*. 1st edition Tullamore: Thomson science, 1998. ISBN 0412720000.
- [63] HUI, I.; YIU, H. *Dairy science and technology handbook*, New York: Wiley-VCH, 1993. ISBN 1-56081-078-5.
- [64] *Spotřeba potravin, nápojů a cigaret na 1 obyvatele v ČR v letech 2000-2008* [online]. [citace 9. září 2010]. Dostupné z: http://www.czso.cz/csu/2009edicniplan.nsf/publ/3004-09-v_roce_2008
- [65] *Vyhláška Ministerstva zemědělství č. 77/2003 Sb.* (novelizována vyhláškou č. 78/2005 Sb. a vyhláškou 370/2008 Sb.) ze dne 27. března 2003, kterou se stanoví

- požadavky pro mléko a mléčné výrobky, mražené krémy a jedlé tuky a oleje. In *Sbírka zákonů České republiky*. 2003, částka 32, s. 2488 – 2516.
- [66] McCance a Widdowson's: *The Composition of Foods*, 6. Summary edition. Royal Society of Chemistry Cambridge a Food Standard Agency, 2008. ISBN 978-0-85404-428-3.
- [67] FOX, P. F.; et. al. *Fundamentals of cheese science*. Gaithersburg: Aspen Publishers, 2000. ISBN 0-8342-1260-9.
- [68] *Codex standard for Gouda*, Formerly codex STAN C-5-1966. Adopted 2001, revision 2007, amendment 2008.
- [69] ALEWIJN, M. *The formation of fat-derived flavour compounds during the ripening of Gouda-type cheese*, Netherlands: Wageningen University, 2006. ISBN 90-8504-381-6.
- [70] *Válka o sýr: Češi bojují za eidam, Holanďani chtějí edam* [online]. [citace 14. března 2011]. Dostupné z: <http://domaci.ihned.cz/c1-35280040-valka-o-syr-cesi-bojuji-za-eidam-holandani-chteji-edam>
- [71] *Česko prohrálo spor o goudu a eidam* [online]. [citace 14. března 2011]. Dostupné z: <http://www.janbrezina.cz/index.php/cs/media/komentare/357-esko-prohralo-spor-o-goudu-a-eidam>
- [72] ADAMS, M.R.; NOUT, M.J.R. *Fermentation and food safety*, Gaithersburg: Aspen Publishers, 2001. ISBN 0-8342-1843-7.
- [73] *ISO Standard No. 5534:2004*. Cheese and processed cheese – Determination of the total solid content (Reference method). Geneva: International Organization for Standardization.
- [74] INDRA, Z.; MIZERA, J. *Control methods for milk and milk products*. Prague: SNTL Publishing, (1992). (in Czech).
- [75] BUŇKOVÁ, L., BUŇKA, F., MANTLOVÁ, G., ČABLOVÁ, A., SEDLÁČEK, I., ŠVEC, P., PACHLOVÁ, V., KRÁČMAR, S. The effect of ripening and storage conditions on the distribution of tyramine, putrescine and cadaverine in Edam-cheese. *Food Microbiology*, 2010, 27, 880-888.

- [76] BUŇKOVÁ, L.; BUŇKA, F.; HLOBILOVÁ, M.; VAŇÁTKOVÁ, Z.; NOVÁKOVÁ, D.; DRÁB, V. Tyramine production of technological important strains of *Lactobacillus*, *Lactococcus* and *Streptococcus*. *Eur. Food Research Technology*, 2009, 229, 533-538.
- [77] PACHLOVÁ, V., BUŇKA, F., BUŇKOVÁ, L., WEISEROVÁ, E., BUDINSKÝ, P., ŽALUDEK, M., KRÁČMAR, S. The effect of three different ripening/storage conditions on the distribution of selected parameters in individual parts of Dutch-type cheese. *International Journal of Food Science and Technology*, 2011, 46, 101-108.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

| | |
|--------|--|
| 2-ME | 2-merkptoethanol (2-mercaptoethanol) |
| CE | Kapilární elektroforéza (capillary electrophoresis) |
| CEC | Kapilární elektrochromatografie (capillary electrochromatography) |
| cIEF | Kapilární isoelektrická fokusace (capillary isoelectric focusation) |
| cITP | kapilární isotachoforéza (capillary isotachophoresis) |
| CZE | Kapilární zónová elektroforéza (capillary zone electrophoresis) |
| Dns-Cl | Dansylchlorid (dansyl chloride) |
| FMOOC | 9-fluoroenylmethyloxo karbamát (9-fluoroenylmethyloxy carbamate) |
| GC | Plynová chromatografie (gas chromatography) |
| GC-MS | Plynová chromatografie s hmotnostní spektrometrií (gas chromatography-mass spectrophotometry) |
| GCE | Gelová kapilární elektroforéza (gel capillary electrophoresis) |
| HFBA | Heptafluoromáselná kyselina (heptaflourobutyric acid) |
| HPLC | Vysoce účinná kapalinová chromatografie (highperformance liquid chromatography) |
| IARC | Mezinárodní agentura pro výzkum rakoviny (International Agency for Research on Cancer) |
| MECC | Micelární elektrokinetické kapilární chromatografie (micelle electrokinetics capillary chromatography) |
| NDBA | <i>N</i> -nitrosodibutylamin (<i>N</i> -nitrosodibutylamine) |
| NDEA | <i>N</i> -nitrosodiethylamin (<i>N</i> -nitrosodiethylamine) |
| NDMA | <i>N</i> -nitrosodimethylamin (<i>N</i> -nitrosodimethylamine) |
| NPIP | <i>N</i> -nitrosopiperidin (<i>N</i> -nitrosopiperidine) |
| NPYR | <i>N</i> -nitrosopyrrolidin (<i>N</i> -nitrosopyrrolidine) |
| OPA | <i>o</i> -ftalaldehyd (<i>o</i> -ftalaldehyde) |

| | |
|---------|--|
| PITC | Fenylisothiokyanát (phenyl isothiocyanate) |
| PVP | Polyvinylpyrrolidon (polyvinylpyrrolidone) |
| RP-HPLC | Vysoce účinná kapalinová chromatografie s obrácenými fázemi (reversed phase highperformance liquid chromatography) |
| TLC | Tenkvrstvá chromatografie (thin layer chromatography) |
| T.V.S. | Obsah tuku v sušině |

SEZNAM OBRÁZKŮ

| | |
|---|----|
| <i>Obrázek 1 – Schéma vzniku histaminu z L-histidinu [10].</i> | 14 |
| <i>Obrázek 2 – Dráha I., kde putrescin vzniká z L-argininu přes agmatin [10].</i> | 14 |
| <i>Obrázek 3 – Dráha II., kde putrescin vzniká z L-arginin přes agmatin a N-karbamoylputrescin [10],[13].</i> | 15 |
| <i>Obrázek 4 – Schéma vzniku putrescinu dekarboxylací L-ornitinu [10].</i> | 16 |
| <i>Obrázek 5 – Obecné reakční schémata biogenních aminů [6].</i> | 18 |
| <i>Obrázek 6 – Příprava bloků Eidamu pro analýzu.</i> | 38 |

SEZNAM TABULEK

| | |
|---|----|
| <i>Tabulka 1 – Vybraní zástupci biogenních aminů, jejich triviální a systematický název a zařazení do skupin [3].</i> | 13 |
| <i>Tabulka 2 – Biogenní aminy, jejich prekurzory a biologický význam [6].</i> | 20 |
| <i>Tabulka 3 – Teplotní a eluční program použitý při chromatografickém stanovení biogenních aminů [76].</i> | 39 |
| <i>Tabulka 4 – Teplotní a eluční program použitý při chromatografickém stanovení biogenních aminů [76].</i> | 40 |
| <i>Tabulka 5 – Složení pufrů pro chromatografickou analýzu biogenních aminů a volných aminokyselin na 1000 ml [76].</i> | 41 |

SEZNAM GRAFŮ

| | |
|--|----|
| <i>Graf 1 – Vývoj obsahu sušiny v 1. plátu kontrolního vzorku C.</i> | 43 |
| <i>Graf 2 – Vývoj obsahu sušiny v 2. plátu kontrolního vzorku C.</i> | 44 |
| <i>Graf 3 – Vývoj obsahu sušiny v 3. plátu kontrolního vzorku C.</i> | 44 |
| <i>Graf 4 – Koncentrace NaCl po dobu zrání v 1. plátu vzorku C.</i> | 44 |
| <i>Graf 5 – Koncentrace NaCl po dobu zrání ve 2. plátu vzorku C.</i> | 45 |
| <i>Graf 6 – Koncentrace NaCl po dobu zrání ve 3. plátu vzorku C.</i> | 45 |
| <i>Graf 7 – Vývoj pH ve všech vrstvách I. plátů vzorku C a A.</i> | 45 |
| <i>Graf 8 – Vývoj obsahu tyraminu u vzorku C a A v 1. plátech.</i> | 47 |
| <i>Graf 9 – Vývoj obsahu tyraminu u vzorku C a A ve 2. plátech.</i> | 47 |
| <i>Graf 10 – Vývoj obsahu tyraminu u vzorku C a A ve 3. plátech.</i> | 47 |
| <i>Graf 11 – Vývoj obsahu putrescinu u vzorku C a A v 1. plátech.</i> | 48 |
| <i>Graf 12 – Vývoj obsahu putrescinu u vzorku C a A ve 2. plátech.</i> | 48 |
| <i>Graf 13 – Vývoj obsahu putrescinu u vzorku C a A ve 3. plátech.</i> | 48 |
| <i>Graf 14 – Vývoj obsahu kadaverinu u vzorku C a A v 1. plátech.</i> | 49 |
| <i>Graf 15 – Vývoj obsahu kadaverinu u vzorku C a A ve 2. plátech.</i> | 49 |
| <i>Graf 16 – Vývoj obsahu kadaverinu u vzorku C a A ve 3. plátech.</i> | 49 |
| <i>Graf 17 – Vývoj celkového obsahu volných aminokyselin ve vzorcích C a A v 1. plátech ve všech vrstvách.</i> | 51 |
| <i>Graf 18 – Vývoj celkového obsahu volných aminokyselin ve vzorcích C a A ve 2. plátech ve všech vrstvách.</i> | 51 |
| <i>Graf 19 – Vývoj celkového obsahu volných aminokyselin ve vzorcích C a A ve 3. plátech ve všech vrstvách.</i> | 51 |

SEZNAM PŘÍLOH

| | |
|--|-----------|
| PŘÍLOHA I – Jednotlivé výživové složky mléka a jejich koncentrace na 1 gram mléka..... | 70 |
| PŘÍLOHA II – The effect of elevated temperature on ripening of Dutch type cheese (Running title - Accelerated Dutch-type cheese)..... | 71 |

PŘÍLOHA I – Jednotlivé výživové složky mléka a jejich koncentrace na 1 gram mléka

| Živina | Množství (na 1 gram mléka) |
|------------------------------|-----------------------------------|
| bílkoviny (N x 6,38) | 0,380 g |
| sacharidy (celkové množství) | 0,536 g |
| minerální látky: | |
| ▪ vápník | 13,800 mg |
| ▪ železo | 0,006 mg |
| ▪ hořčík | 1,600 mg |
| ▪ fosfor | 10,800 mg |
| ▪ draslík | 17,500 mg |
| ▪ sodík | 5,700 mg |
| ▪ zinek | 0,044 mg |
| vitamíny: | |
| ▪ kyselina askorbová | 0,108 mg |
| ▪ thiamin | 0,004 mg |
| ▪ riboflavin | 0,019 mg |
| ▪ niacin | 0,010 mg |
| ▪ kyselina pantothenová | 0,036 mg |
| ▪ pyridoxin | 0,005 mg |
| ▪ kyselina listová | 0,600 mg |
| ▪ kobalamin | 0,041 mg |
| ▪ retinol | 9,300 mg |
| ▪ tokoferol | 0,080 mg |
| ▪ fylochinon | 0,003 mg |
| cholesterol | 0,140 mg |

PŘÍLOHA II – The effect of elevated temperature on ripening of Dutch type cheese (Running title - Accelerated Dutch-type cheese)

ABSTRACT

The aim of this study was to explore the effect of elevated temperature (16°C) on ripening of Dutch-type cheese. To investigate cheese ripening thoroughly, three slices of each cheese block were further divided into three layers and the changes in all the slices and layers were studied. For the purpose of comparison, the processes in a control sample of cheese ripening at 10°C were monitored, too. During the experiment, the content of both free amino acids and biogenic amines (histamine, tyramine, putrescine and cadaverine) and cheese hardness were observed.

The content of free amino acids in the accelerated cheese grew faster compared to the amount of amino acids in the control cheese. On the 56-th day post-manufacture, the content of free amino acids in accelerated cheese was two times higher than their amount in control samples ($P < 0.05$). In the whole experiment, the highest content of free amino acids was observed in cores of all slices of cheeses ripening at both lower and higher temperature ($P < 0.05$). On the contrary, the lowest content of free amino acids was found in the edge ($P < 0.05$) throughout the entire experiment. High intensity of formation of biogenic amines was observed in all slices and layers of accelerated cheese ($P < 0.05$). The content of tyramine in all layers of studied slices almost reached the value of $500 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ during 56 days of the experiment; its content in the edge grew even higher. Accelerated cheese showed faster equalization of hardness than control samples ($P < 0.05$). Throughout the whole experiment, hardness of the edge was higher than hardness of the other parts of slices, regardless of their original location in blocks and ripening temperature. Based on the study results, increase of temperature by 6°C can hasten the ripening process two times/twice and hence reduce the ripening time in cellar approximately to half.

Keywords:

Dutch-type cheese, accelerated ripening; free amino acids, biogenic amines, hardness.

INTRODUCTION

Cheese ripening represents a very important technological process, during which cheese undergoes significant microbiological and biochemical changes. Milk quality, chemical composition of rennet (e.g. moisture, fat or NaCl content), choice of proper starter lactic acid bacteria (SLAB), presence of non-starter lactic acid bacteria (NSLAB), and also length and conditions of ripening may influence processing occurring in maturing cheeses (Fenelon and Guinee, 2000, Shakeel-Ur Rehman et al., 2000, Al-Otaibi and Wilbey, 2004, Flourly, Camier et al., 2009, Pachlová et al. 2011).

Cheese texture, functional and sensory properties develop during the process of ripening; however, maturation is a costly process (Forde and Fitzgerald, 2000).

The length of cheese ripening depends on the type of cheese. Dutch-type cheese is stored in ripening cellars for 6-8 weeks minimum. Because of reduction of production expenses, cheese manufacturers try to decrease ripening time; that is why insufficiently ripened cheeses can be supplied to distribution network. Their organoleptic properties differ substantially from the qualities of cheese matured under standard conditions (Pachlová et al., 2011).

Acceleration of the ripening process could solve the aforementioned problems. It could compress the ripening period and ripeness of the products can reach satisfactory level.

As reported by Fox *et al.* (1996), the following factors can accelerate cheese ripening: (i) elevated ripening temperatures, (ii) exogenous enzymes, (iii) chemically or physically modified cells, (iv) genetically modified starters, (v) adjunct cultures, (vi) cheese slurries.

From the technical point of view, elevation of temperature is regarded the simplest method of acceleration of the ripening process. However, strict hygienic standards have to be maintained in the manufacture of accelerated cheese (Sihufe et al., 2010). Besides the quick growth of both SLAB and NSLAB, propagation of other contaminating microorganisms can occur and they can deteriorate the quality of cheese and, moreover, also cause alimentary intoxication or infection (Iurlina and Fritz, 2004). Sihufe et al. (2010) report possible double or triple reduction of ripening time due to increasing the ripening temperature by 6°C.

Biogenic amines are low-molecular nitrogen compounds formed predominantly by microbial decarboxylation of free amino acids (Silla Santos, 1996). Wide range of lactic

acid bacteria (LAB) possess decarboxylation enzymes (Silla Santos, 1996; Buňková et al., 2009, 2010). Elevated ripening temperature shows influence on metabolism of LAB and hence it can increase activity of decarboxylases, which might lead to higher content of biogenic amines in final products and thereby endanger consumers who are sensitive to the above substances. The influence of acceleration of ripening by elevated temperatures on production of biogenic amines has not been reported on.

For consumers, texture plays a key role at cheese purchase. It is mainly influenced by intensity of proteolysis, contents of NaCl, dry matter and fats, and by pH (Lawrence et al., 1987, Everard et al., 2006, Saint-Eve et al., 2009).

As reported by Komprda et al. (2007), Buňková et al. (2010), Pachlová et al. (2011), and Buňka et al. (2012), the extent of microbiological and biochemical processes in individual parts of cheese might differ, that is why differences in development of texture parameters in individual segments of cheese blocks can be expected. A study dealing with the aforementioned differences has not been found.

The aim of this study was to compare selected properties of Dutch-type cheese ripening at common temperature (10°C) with qualities of the cheese whose maturation processes were accelerated by elevation of ripening temperature (16°C). Our research was focused on detailed evaluation of texture properties and on monitoring of content of free amino acids as a remarkable marker of proteolytic processes (Stepaniak, 2004). Moreover, we also evaluated content of biogenic amines that can substantially influence safety of foods (Silla Santos, 1996). Both flavour and intensity of off-flavour of control and accelerated cheese samples were subjected to sensory analysis?

MATERIALS AND METHODS

Materials

Eighty four blocks of Dutch-type cheese (Edam cheese; 50% w/w dry matter and 30% w/w fat in dry matter; average weight 1.51 ± 0.15 kg; approx. 90mm height, 90mm width and 140mm depth) were taken from a batch manufactured within common production of a Czech producer of cheeses made from pasteurised milk. The manufacture protocol used by Pachlová et al. (2011) was followed. During the first day, the cheeses were manufactured, pressed and placed into brine. On the second day, the blocks were taken out from brine,

packed into Cryovac packagings and put into a ripening cellar with temperature 10 ± 2 °C. On the 4-th day postmanufacture, selected samples (30 cheese blocks) were moved to a moderately heated ripening chamber with temperature 16 ± 1 °C (labelled as A) and the other cheese samples were kept at 10 ± 1 °C since then (control cheese labelled as C). The control cheeses were sampled on the following days: 1st (before the placement into brine), 4th, 7th, 14th, 28th, 42nd, 56th, 84th and 112th. The samples of accelerated cheeses were collected on the 7th, 14th, 28th, 42nd and 56th days. Two parallel cheese blocks were taken for chemical, microbiological and textural analyses, respectively. Three batches manufactured according to the same protocol were sampled.

A 10mm slice was cut off each block (the slice was not used for analysis) and 3 slices were labelled S1, S2 and S3 (control samples were labelled CS1, CS2, CS3; AS1, AS2 and AS3 for accelerated sample) were taken for testing subsequently (approx. 90mm height, 90mm width and each 25mm depth). Each tested slice was divided into three layers: 7mm from the edge (labelled layer I); the next 28mm (labelled layer II); and the remaining core (labelled layer III). Figure 1A shows a diagram illustrating the sampling procedure. The layers I and II were further divided into 6 segments subjected to texture analysis (see Figure 1B and the chapter “Texture analysis”).

Basic chemical analysis

Dry matter content was determined by gravimetric method according to ISO 5534:2004. The pH values of the samples were measured using a calibrated pH-meter (pH Spear for food testing, Eutech Instruments). Sodium chloride content was determined by argentometric method according to Indra & Mizera (1992). All reagents used were of analytical grade (LachNer, Czech Republic). All parameters of each type of sample and each layer were measured six times.

Before the analysis of free amino acids and biogenic amines contents, the samples of individual layers were lyophilized using a Christ Alpha 1–4 (Christ, Germany) device. They were stored at -80 °C prior to the analysis.

Microbiological analysis

A cheese sample from each layer (10 g) was weighed aseptically into 90 mL of sterile physiological solution and the mixture was subsequently agitated using a stomacher for

15 minutes. Total amounts of both aerobic mesophilic and facultative anaerobic bacteria (TC; Plate Count Agar; HiMedia, Bombay, India) and LAB (LAB; MRS agar, Oxoid, Basingstoke, UK) were determined in samples. All microorganisms were incubated at $30\pm 1^\circ\text{C}$ for 48 hours.

Determination of free amino acid content

Prior to determination of content of free amino acids, extraction of lyophilized samples was implemented as reported by Pachlová et al. (2011). Each sample from each layer, parallel block and ripening regime was extracted three times. Twenty two free amino acids and their derivatives (aspartic acid, threonine, serine, asparagine, glutamic acid, glutamine, proline, glycine, alanine, valine, methionine, cysteine, isoleucine, leucine, tyrosine, phenylalanine, lysine, histidine, arginine, ornithine, citrulline, γ -aminobutyric acid) were determined by ion-exchange chromatography (AAA400 Amino Acid Analyser; Ingos, Prague, Czech Republic) as reported by Buňková *et al.* (2009). Each extract was analysed twice. The reagents for sample preparation, separation and detection were obtained from Ingos (Prague, Czech Republic). Standards were purchased from SigmaAldrich (St. Louis, MO, USA).

Determination of biogenic amine content

Extraction of lyophilized samples was implemented as described by Buňková et al. (2010) prior to determination of biogenic amines. Each sample from each layer, parallel block and ripening regime was extracted three times. Four biogenic amines (histamine, tyramine, putrescine, cadaverine) were determined by ion-exchange chromatography (AAA400 Amino Acid Analyser; Ingos, Prague, Czech Republic) as described by Buňková *et al.* (2009). Each extract was analysed twice.

Texture Analysis

Prior to analysis, the tested slices had been wrapped into a protective foil to prevent water evaporation and they were tempered subsequently at 20°C for 3 hours. A spherical probe (5 mm diameter; P5S) was used for compression of samples (depth of 5 mm) at speed of $1\text{ mm}\cdot\text{s}^{-1}$ (trigger force of 5 g). Maximum force F_{max} (N) was recorded as an indicator of hardness (Delgado, F.J. *et al.*, 2010; Sirisomboon, P. *et al.*, 2000). Texture analysis was performed using a TA.XTplus Texture Analyser (with compression cell in capacity of 30

kg) (Stable Micro Systems, Surrey, UK). Thirteen segments of all three slices were subjected to measurement: 6 segments of layer I; 6 segments of layer II; and core (Figure 1B).

Sensory analysis

A simple sensory evaluation of samples was performed by 24 selected assessors (employees and students of Faculty of Technology, Tomas Bata University in Zlin) trained according to ISO 8586 (1993). Samples of both control and accelerated cheese were evaluated in a sensory laboratory in booths. All the samples were labelled with codes and served randomly at 20 ± 1 °C (tempered similarly like before texture analysis – see above). Two sensory parameters were assessed by seven-points ordinal scale (flavour: 1 – excellent sample, 4 – sample with minor defects but still acceptable, 7 – unacceptable sample; and intensity of off-flavour: 1 – no recognizable, 7 – very strong).

Statistical analysis of data

Kruskall-Wallis and Wilcoxon tests were used to evaluate the following data: results of basic chemical and microbiological analyses, free amino acid and biogenic amine contents, hardness and sensory analyses results (Agresti, 1984). The Unistat 5.5 statistical software (Unistat Ltd., London, UK) was used to evaluate the results of the experiments.

RESULTS AND DISCUSSION

Basic chemical and microbiological analysis

Immediately after pressing the curd and before immersing the cheese blocks into brine, the content of NaCl in individual layers or slices did not differ significantly. The NaCl content in all analyzed samples ($P \geq 0.05$) ranged between 0.12–0.16% (w/w). In all the slices, dry matter content in the edge (layer I) reached significantly higher values than the amount of dry matter in the other layers (see Figure 2) ($P < 0.05$).

To the fourth day, the dry matter and NaCl contents increased in all tested layers of all slices ($P < 0.05$). Compared to the layer II and III (core), the edge layer of all slices showed the highest growth of monitored parameters.

During 28 days, the NaCl content in individual slices of monitored parts of cheese equalised until it was almost identical ($P \geq 0.05$). Figure 2 illustrates equalisation of NaCl

and dry matter contents in the slices CS1, CS2 a CS3 of the control samples. Regardless of slice locations and ripening temperature, the NaCl content in individual layers equalised (data not shown).

The dry matter content in the layers II and III of individual slices became equal in 42 days ($P \geq 0.05$); it fluctuated around 52–53% (w/w). Although the dry matter content in the edge (layer I) decreased significantly in the first six weeks, its values were remarkably higher than the contents of dry matter in all the other parts (layers II an III) regardless storage temperature throughout the experiment ($P < 0.05$). In all the monitored slices, the dry matter content in the layer I and in the other part of the slice differed approximately by 1–2% w/w. Satisfactory explanation of the aforementioned phenomenon has not been found in literature. Surface interactions between cheese and packing material, partial permeability of packing material and interactions between edge and other parts of cheese might be considered the cause (Fox et al., 2000).

Similar processes were found in this type of cheese also by Pachlová et al. (2011). Different ripening temperature did not show any significant effect on dry matter content in individual slices (data not shown).

To the 7-th day of ripening, pH in all samples, layers and slices decreased. In control samples, it dropped from 6.25 ± 0.05 to 5.12 ± 0.03 and in samples ripening at higher temperature pH fell to 5.20 ± 0.02 ($P < 0.05$; Figure 3). In the subsequent ripening, pH increased gradually. The accelerated samples showed slightly faster rise of pH ($P < 0.05$). The changes of pH in individual slices and corresponding layers were similar ($P \geq 0.05$); that is why Figure 3 depicts only pH in the central slice S3 of both control and accelerated samples and the pH of the other slices are not shown. The decrease of pH in the first days of ripening can be caused by microbial fermentation of lactose into lactic acid (McSweeney and Sousa, 2000, McSweeney, 2004). The following increase of pH can be then influenced by the formation of alkaline substances, such as by proteolysis and production of NH_3 and also by degradation of lactic acid into other compounds etc (Fox et al., 2004-Cheese; Buňková et al., 2010; Pachlová et al., 2011).

On the day of cheese manufacture, prior to placing into brine, TC and LAB counts in cheese were (5.9 ± 0.4) $\text{CFU} \cdot \text{g}^{-1}$ and (4.7 ± 0.6) $\text{CFU} \cdot \text{g}^{-1}$, respectively. The differences between individual slices and layers were not significant ($P \geq 0.05$; data not shown). During

the first 14 days of ripening, both the TC and LAB counts showed growth ($P < 0.05$); their increase was faster in the samples A compared to the control samples ($P < 0.05$).

Edge parts of the individual slices showed slightly higher ($P < 0.05$) TC counts ((7.1 ± 0.5) CFU·g⁻¹ and (7.8 ± 0.7) CFU·g⁻¹ for C and A, respectively) compared to the values found in the other parts of cheese ((6.7 ± 0.6) CFU·g⁻¹ and (7.2 ± 0.5) CFU·g⁻¹ for C and A, respectively). Individual layers and slices did not differ in LAB counts that were (6.2 ± 0.3) CFU·g⁻¹ and (5.7 ± 0.4) CFU·g⁻¹ for A and C, respectively. On the 28th day, the TC counts of the control samples changed in contrast to (TC counts of) accelerated samples. Significantly elevated TC counts were found in every edge layer of control sample ((7.2 ± 0.5) CFU·g⁻¹), while the TC counts in all the corresponding layers of accelerated cheese decreased significantly ((6.3 ± 0.8) CFU·g⁻¹; $P < 0.05$), which can be likely explained by faster cell lysis (Beresford, 2001; Lortal, 2005) in accelerated cheese. However, LAB counts did not show the aforementioned changes to the 28th day; they practically did not differ on that day compared to values obtained on the 14th day ($P \geq 0.05$).

During the following ripening, the TC and LAB counts decreased ($P < 0.05$). On the 112th day, TC counts of control samples were (5.8 ± 0.4) CFU·g⁻¹ in edge layers and (5.3 ± 0.5) CFU·g⁻¹ in layers II and III (5.3 ± 0.5) CFU·g⁻¹ ($P < 0.05$), respectively. On the same day, the LAB counts in layers I of individual slices reached slightly higher values (4.9 ± 0.3) CFU·g⁻¹ compared to the layers II and III (4.5 ± 0.4) CFU·g⁻¹.

At the end of experiment with ripening at elevated temperature, the TC counts were (5.2 ± 0.5) CFU·g⁻¹ in sample edges and (4.7 ± 0.4) CFU·g⁻¹ in layers II and III. The LAB counts in all monitored layers of control samples ((5.4 ± 0.3) CFU·g⁻¹ and (5.0 ± 0.3) CFU·g⁻¹ for C and A, respectively) showed higher values in comparison with LAB amount on the 112th day. Throughout the whole experiment, no significant differences in LAB and TC counts in layers of individual slices ($P \geq 0.05$) were observed. Similarly, minimum differences between the layers II and III of individual slices and between the layers II and III on different days of ripening were observed.

Higher microorganism counts in edge layers of Dutch-type cheese were also reported by some other authors, for example by Komprda et al. (2007) and Buňková et al. (2010). The above phenomenon can be explained by different microenvironmental conditions such as

access of oxygen and a_w in various parts of cheese (Fox, 2000 Fund.; Novella-Rodríguez et al., 2003).

Free amino acid content

Figure 4 illustrates the changes of total free amino acid (FAA) content in individual layers and slices throughout the ripening experiment. Since the 14-th day, slightly faster increase of proteolysis rate was observed in samples ripening at higher temperature ($P < 0.05$). In the course of experiment with ripening at higher temperature, the intensity of amino acids release from matrix increased. Compared to FAA content in control samples, their amount in accelerated samples almost doubled on the 56-th day post-manufacture. As late as on the 112-th day, the total FAA contents in control samples reached the total levels of FAA in accelerated cheeses that matured for 56 days only. Thus the intensity of proteolysis in Dutch-type cheese can be doubled by increase the storage temperature to 6°C above the common ripening temperature.

The acceleration of proteolytic changes in matrix of cheese at elevated temperature can be probably explained by higher activity of particular LAB enzyme systems that usually include, intracellular peptidases (Al-Otaibi and Wilbey, 2004). The acceleration of metabolic processes and elevated rate of propagation of microorganisms in accelerated cheese might be likely justified by temperature that is more suitable for their growth. The Dutch-type cheese contains mesophilic cultures having temperature optimum of ~ 30°C (Beresford *et al.*, 2001).

The more intensive metabolism induces likely faster lysis of LAB cells and hence spill of intracellular liquid with enzymes into the cheese matter where the enzymes keep carrying out hydrolytic reactions (Wilkinson and Kilcawley, 2005; Williams et al., 2002).

Figure 4 shows that the highest FAA content was found in the cores of all the monitored slices (S1–S3) at both the ripening temperatures applied ($P < 0.05$). On the contrary, the lowest FAA content was detected in cheese edge from the 4th day throughout the whole process of ripening ($P < 0.05$). During the ripening of control and accelerated cheeses, FAA content in individual layers grew gradually ($P < 0.05$).

Significant differences between the layers I and III were observed continuously from the beginning till the end of experiment ($P < 0.05$). The total FAA content in the layer II was

gradually equalizing with the FAA level in the core. The observed equalization of FAA contents in the core and edge corresponds with findings reported by Pachlová et al. (2011). The proteolysis was also influenced by location of individual slices in cheese blocks. After a month of ripening, the corresponding layers of the S1 and S3 slices (Parts A and C of Figure 4) differed significantly in total FAA content independent of ripening temperature ($P < 0.05$). The highest level of FAA was found in the layers of the central slice S3. The total FAA content in the layers of the slice S2 ranged between the values found in the corresponding layers of the slices S1 and S3 throughout the whole experiment. Intensity of proteolysis varied across the cheese block. The rate of primary proteolytic processes such as release of amino acids from peptides and proteins was highest in the cheese core and it decreases towards the edge. Difference in proteolytic changes can be caused by diversity of microenvironment which effects metabolism of LAB and activity of reactions of their hydrolytic enzymes (Novella-Rodríguez et al., 2003; Komprda et al. 2007, 2008).

Biogenic amines content

One of the most abundant biogenic amines occurring in food, histamine (Shalaby, 1996), was not detected in samples ripened at either ripening temperatures throughout the experiment. The changes in concentrations of tyramine, putrescine, and cadaverine were monitored in the 112-day experiment and they are depicted in Figures 5–7. More intensive formation of tyramine, putrescine and cadaverine occurred in accelerated cheese ($P < 0.05$) during the whole monitoring. On the 56-th day, the contents of tyramine, putrescine and cadaverine in accelerated cheese reached double values compared to the levels found in the corresponding layers and slices of control samples ripening for 112 days ($P < 0.05$). According to Pinho (2001) and Buňková et al. (2010), the decarboxylase activity of microorganisms grows substantially at higher incubation temperature. Tyramine showed the highest concentrations, which does not agree with findings reported by Komprda et al. (2007).

The contents of biogenic amines found in some parts of cheese reached approximately 800 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ in accelerated cheese on 56th day and $\sim 350 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ in control cheese on 112th day.

Silla Santos (1996) does not consider such high concentrations safe even for humans with standard/functioning metabolism. Regardless of the slice location and ripening temperature, the highest content of biogenic amines was found in the edge layers ($P < 0.05$).

In contrast, the lowest levels of tyramine, putrescine and cadaverine were being found in the cheese core throughout the whole experiment ($P < 0.05$). Komprda et al. (2007) and Buňková et al. (2010) reported similar findings.

The contents of individual biogenic amines in various slices also differed; the edge slices showed higher contents in corresponding layers compared to levels found in the central slice ($P < 0.05$). Different intensities of decarboxylation processes across the monitored cheese blocks could have been caused by different conditions/factors influencing metabolism of LAB in individual parts of cheese (Komprda et al., 2007; Novella-Rodríguez et al., 2003). In similar samples, Buňková et al. (2010) reported/considered facultatively anaerobic NSLAB from the *Lactobacillus* genus, especially *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus curvatus* to be the main producers of biogenic amines.

Texture and sensory analysis

Figure 8 illustrates development of hardness of individual slices segments and layers of accelerated and control cheeses. On the first day, immediately after pressing the cheese curd and before placement into brine, no significant differences in hardness of any layer of CS1–CS3 ($P \geq 0.05$) slices were found. Hardness ranged approximately between 4–5 N. After brining (4th day), substantial differences between the edge and other parts of cheese were observed ($P < 0.05$; Figure 8). The segment 6 showed slightly lower hardness than the other segments in the layer I ($P < 0.05$) of all the tested slices CS1–CS3. The layers II and III of the slice CS1 demonstrated significantly higher ($P < 0.05$) hardness than corresponding layers of the slices CS2 and CS3. Their hardness was almost equal ($P \geq 0.05$). The cheese segment 12 of the tested slices CS2 and CS3 was softer than other segments of the layer II ($P < 0.05$) and the values of its hardness were equal ($P < 0.05$) to those found in the core of individual slices. The differences in hardness of the studied segments can be explained by the influence of brining, during which the dehydration of the edge layer occurs.

Water activity in the edge layer of cheese block decreases because of passage of free water (whey) from the curd into brine during salting (Fox et al., 2000; Floury et al., 2009). Moreover, sodium ions elevate ionic strength and hence limit solubility of proteins (Exterkate and Alting, 1995). Higher concentration of salt might also inhibit microflora in cheese and thereby slow down enzymatic reactions including proteolysis of casein in

fractions (Al-Otaibi and Wilbey, 2004), which correlated with the FAA content. All the aforementioned processes increase hardness of edge layer of individual slices. Similar changes can be observed in the CS1 slice. It is penetrated by sodium chloride faster than the layers II and III of the slices CS2 and CS3. Between the 4-th and 7-th day, hardness of the segments 7–11 of the slices S2 and S3 of both accelerated and control samples rose from 4–5 N to 5–6 N ($P < 0.05$), which can be caused by the penetration of NaCl into these parts of cheese from the layer I and by the subsequent swelling of protein matrix (Fox et al., 2000). The layer 12 was the only exception to the above. No significant change of its hardness occurred ($P \geq 0.05$). The cheese in this segment was softer than in the other segments of the layer II of the slices CS2 and CS3 and of the slices AS2 and AS3 as well ($P < 0.05$).

Since the 4-th day, hardness of cheese segments 7–11 of the slices CS1 and AS1 remained unchanged. In contrast, the cores of the slices S2 and S3 showed lower hardness than the other layers. There were no significant differences between the hardness of the corresponding slices of the control and accelerated cheese 3 days after the beginning of the experiment ($P \geq 0.05$).

The insignificant differences in the FAA and biogenic amines contents in corresponding layers and slices of control and accelerated samples on the 7-th day ($P \geq 0.05$) indicate similar intensity of metabolism of present microflora at that time. The changes in the layers I of all the tested slices and in the layers II of the slices S2 and S3 of accelerated cheese were more intensive than the processes in the control samples ($P < 0.05$). The decrease of hardness can be elucidated mostly by proteolysis of caseins.

Fast decrease of hardness of accelerated cheese can be attributed both to more intensive metabolism of microorganisms and to activity of proteolytic enzymes (Lawrence et al., 1987; Fox et al., 2000), which is also illustrated by results of microbiological analysis and by content of FAA (Figure 4).

The changes of hardness of all the segments 6 differed from its changes in other segments of the layers I (1–5). Cheese segment 6 demonstrated slightly lower hardness than the other segments of the layer I (Figure 8).

The above phenomenon has neither been explained clearly, nor reported in literature. It can be explained by placement of the cheese blocks on a plate. Sodium chloride cannot

then diffuse into the cheese segment 6 directly because of absence of contact with brine. It can only penetrate from the adjacent parts of the layer I. The lower content of NaCl can influence growth and metabolism of LAB and also proteolytic processes (Novella-Rodríguez *et al.*, 2003; Komprda *et al.*, 2007; Pachlová *et al.*, 2011; Buňková *et al.*, 2010).

Compared to other segments (7–11) of the layer II of studied slices, the segment 12 of control samples showed anomalous changes to the 42nd day and similar differences occurred in accelerated samples to the 28th day (Figure 8). Hardness of the accelerated samples decreased to 42nd day of experiment. Moreover, hardness of slices and majority of cheese segments equalized at 2–3 N (L kontrola). On the contrary, the segments 1-5 of all the slices showed higher hardness of 4–5 N ($P < 0.05$). In the following 14 days (56th day), no significant changes of hardness of segments or slices ($P \geq 0.05$) were reported in accelerated cheese.

Hardness of majority of analysed layers and slices decreased gradually from the 56th day of ripening ($P < 0.05$). In comparison with hardness of accelerated cheese on 42nd and 56th days of ripening, similar values ($P \geq 0.05$) were reported in corresponding slices and layers of the control samples ($P \geq 0.05$).

No significant changes of hardness of control cheese samples occurred to the 112th day ($P \geq 0.05$). Faster equalization of the texture parameters of accelerated cheese can be again attributed to higher intensity of proteolytic reactions at higher ripening temperatures (Law, 2001). The segments 1–5 (layers I) of both control and accelerated cheese showed higher hardness than the other segments or layers regardless of slice and its location.

EVIDENČNÍ LIST DIPLOMOVÉ PRÁCE

| | |
|---|--|
| Sigla (místo uložení diplomové práce) | TUPI |
| Název diplomové práce | Distribuce obsahu volných aminokyselin a biogenních aminů v přírodním sýru eidamského typu |
| Autor diplomové práce | Bc. Radka Flasarová |
| Vedoucí diplomové práce | doc. Ing. František Buňka, Ph.D. |
| Vysoká škola | UTB ve Zlíně |
| Adresa vysoké školy | UTB ve Zlíně náměstí T. G. M. 5555 760 01 Zlín |
| Fakulta (adresa, pokud je jiná než adresa VS) | Fakulta technologická Náměstí T. G. M. 275 762 72 Zlín |
| Katedra (adresa, pokud je jiná než adresa VS) | Ústav chemie Náměstí T. G. M. 275 762 72 Zlín |
| Rok obhájení DP | 2011 |
| Počet stran | 84 |
| Počet svazků | 3 |
| Vybavení (obrázky, tabulky,...) | obrázky, tabulky, grafy |
| Klíčová slova | - sýry holandského typu - biogenní aminy - volné aminokyseliny - iontově – výměnná chromatografie |