

# **Biogenní aminy ve vybraných skupinách přírodních sýrů**

Ing. Radka Flasarová, Ph.D.

Teze disertační práce

Dizertační práce

## **Biogenní aminy ve vybraných skupinách přírodních sýrů**

**Biogenic amines in selected cheese groups**

Autor: **Ing. Radka Flasarová, Ph.D.**

Studijní program: P2901 Chemie a technologie potravin

Studijní obor: 2901V013 Technologie potravin

Školitel: prof. doc. Ing. František Buňka, Ph.D.

Konzultanti: prof. RNDr. Vlastimil Kubáň, DrSc.  
doc. Ing. Vendula Pachlová, Ph.D.

Oponenti: prof. Ing. Stanislav Kráčmar, DrSc.  
prof. Ing. Juraj Čuboň, CSc.  
doc. MVDr. Michaela Černíková, Ph.D

Zlín, srpen 2018

© Radka Flasarová

Vydala **Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně** v edici **Doctoral Thesis**.  
Publikace byla vydána v roce 2018.

*Klíčová slova: dekarboxylázová aktivita, biogenní aminy, volné aminokyseliny, přírodní sýry, Lactococcus, Lactobacillus, zákysové a nezákysové bakterie mléčného kvašení*

*Key words: decarboxylation activity, biogenic amines, free amino acids, nature type of cheese, Lactococcus, Lactobacillus, starter and nonstarter lactic acid bacteria*

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

ISBN 978-80-7454-785-0

## ABSTRAKT

Cílem předložené dizertační práce bylo zabývat se problematikou vzniku a výskytu biogenních aminů ve vybraných skupinách přírodních sýrů. Navzdory tomu, že biogenní aminy mohou plnit v nízkých koncentracích u řady mikroorganismů, rostlin i živočichů významné fyziologické funkce, příjem vyšších koncentrací biogenních aminů může mít negativní vliv na konzumentovo zdraví. Sýry představují vhodné prostředí pro vznik a výskyt vyšších koncentrací biogenních aminů, neboť řada mikroorganismů využívajících se při výrobě sýrů jako zákysové mikroorganismy vykazují značnou pozitivní dekarboxylázovou aktivitu.

V praktické části byl sledován obsah biogenních aminů v přírodních sýrech, přičemž vzorky byly odebírány v různých fázích technologického procesu výroby. Následně byla zkoumána míra schopnosti produkovat biogenní aminy mikroorganismy, které byly z těchto sýrů izolovány a identifikovány. Dekarboxylázová aktivita vybraných kmenů byla zkoumána v reálném systému přírodního sýru holandského typu, který byl vyroben laboratorně. Hodnoty všech sledovaných biogenních aminů byly srovnávány s kontrolními modelovými vzorky sýrů, tedy sýry bez přídavku sledovaného dekarboxyláza pozitivního kmene.

Bylo zjištěno, že zástupci zákysových kultur *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 824 a CCDM 946 vykazují značnou pozitivní dekarboxylázovou aktivitou, přičemž vzniká putrescin a tyramin ve významně vysokých koncentracích. Hodnoty putrescinu byly na konci doby zrání u obou vzorků vyšší než  $800,0 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ . Během sledování dekarboxylázové aktivity nezákysových bakterií bylo zjištěno, že v přítomnosti kmene *Lactobacillus paracasei* DEPE T51 a DEPE T52 nedochází ke vzniku tak závažných koncentrací, jako tomu bylo v případě bakterií *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* DEPE T3 a DEPE T36. Celkové množství biogenních aminů u *Lactobacillus paracasei* DEPE T51 a DEPE T52 nepřesáhly hodnotu  $100,0 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ . U bakterií rodu *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* DEPE T3 a DEPE T36 byla zpozorována významná tyramin-pozitivní dekarboxylázová aktivita, neboť koncentrace tyraminu 90. den zrání modelových vzorků byla v rozmezí  $188,2 - 222,1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ . Porovnání s koncentracemi celkového obsahu biogenních aminů bylo zjištěno, že tyramin tvořil až 66 % z celkového množství 8 sledovaných biogenních aminů.

## ABSTRACT

The aim of this dissertation thesis was to deal with rice and occurrence of biogenic amines in selected groups of natural cheeses. These amines can play important physiological functions at many microorganisms, plants and animals. On the other hand, higher concentrations of biogenic amines may have a negative effect on consumer health. Cheeses represent suitable environment for the rise of higher concentrations of biogenic amines. Number of microorganisms used in the cheeses production as feed microorganisms exhibit a marked positive decarboxylase activity. Thanks this reaction free amino acids appeared which are than decarboxylated to form biogenic amines.

In the practical part, the content of biogenic amines in natural cheeses was monitored. The samples were taken from various stages of the technological process of production. Subsequently, the degree of ability to produce biogenic amines by means of microorganisms was investigated. The microbes were isolated and identified from cheeses. The decarboxylase activity of selected strains has been investigated in a real Dutch-type natural cheese which was made in laboratory.

It has been found that representatives of the *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 824 and CCDM 946 show a marked positive decarboxylase activity. Production of putrescine and tyramine at significantly high concentrations was observed. The putrescine amount at the end of the maturation time of both samples were greater than 800,0 mg·kg<sup>-1</sup>. During the monitoring of the decarboxylase activity of non-starter bacteria, it was found that in the presence of the *Lactobacillus paracasei* strain DEPE T51 and DEPE T52, no such rise of significant concentrations as in the case of *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* DEPE T3 and DEPE T36. The total amount of biogenic amines in *Lactobacillus paracasei* DEPE T51 and DEPE T52 did not exceed 100 mg·kg<sup>-1</sup>. For bacteria of the genus *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* DEPE T3 and DEPE T36, significant tyramine-positive decarboxylase activity was observed, because the tyramine concentration was from 188, 2 to 222,1 mg·kg<sup>-1</sup>. on the 90th day of maturation. Two samples inoculated by means of *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* DEPE T3 a DEPE T36 showed tyramine concentrations in 66% from total numbers of 8 biogenic amines which were studied.

# OBSAH

ABSTRAKT.....	3
ABSTRACT.....	4
1. ÚVOD.....	7
2. SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY.....	8
2.1 Biogenní aminy.....	8
2.1.1 Vznik biogenních aminů.....	8
2.1.2 Toxikologické účinky biogenních aminů.....	9
2.1.3 Výskyt biogenních aminů.....	9
2.2 Zrání přírodních sýrů.....	10
2.2.1 Metabolismus laktózy a reakce kyseliny mléčné.....	11
2.2.2 Metabolismus citrátu.....	11
2.2.3 Proteolýza a metabolismus aminokyselin.....	12
2.2.4 Lipolýza a metabolismus mastných kyselin.....	12
2.3 Mikroorganismy produkující biogenní aminy ve vybraných skupinách přírodních sýrů.....	12
3. CÍLE DIZERTAČNÍ PRÁCE.....	14
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	15
4.1 První experiment.....	15
4.2 Druhý experiment.....	15
4.3 Třetí experiment.....	16
5. ZVOLENÉ METODY ZPRACOVÁNÍ.....	17
5.1 Laboratorní výroba vzorků přírodních sýrů.....	17
5.2 Posouzení dekarboxylázové aktivity.....	19
5.3 Základní parametry přírodních sýrů.....	19
5.4 Texturní profilová analýza.....	19
5.5 Mikrobiologická analýza.....	20
5.6 Stanovení obsahu volných aminokyselin.....	20
5.7 Stanovení obsahu biogenních aminů.....	20
5.8 Statistické zpracování dat.....	20
6. VÝSLEDKY.....	21
6.1 Výsledky 1. experimentu.....	21
6.2 Výsledky 2. experimentu.....	24
6.3 Výsledky 3. experimentu.....	28
7. PŘÍNOS PRÁCE PRO VĚDU A PRAXI.....	32
8. ZÁVĚR.....	33
9. SUMMARY.....	35
9.1 Current state of solved issues.....	35
9.2 Aims of the thesis.....	35
9.3 Experimental part.....	36
9.4 Contribution to the science and practice.....	37
9.5 Results.....	38

10.	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....	40
11.	SEZNAM OBRÁZKŮ .....	46
12.	SEZNAM TABULEK .....	48
13.	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK .....	49
14.	PUBLIKAČNÍ AKTIVITY AUTORA .....	50
15.	ODBORNÝ ŽIVOTOPIS AUTORA .....	52

# 1. ÚVOD

Přírodní sýry se v posledních letech řadí ke stále více oblíbeným potravinám, což dokazuje i statistika Českého statistického úřadu, kde přírodní sýry jsou rozděleny na skupiny tvrdé, měkké a plísňové sýry. Spotřeba přírodních sýrů vzrostla z 9,4 kg na 1 osobu za rok 2004 na 11,3 kg na 1 osobu za rok 2016. V případě spotřeby mléka a mléčných výrobků došlo meziročně ke zvýšení o 5,8 kg obyvatele za rok 2016 na hodnotu 242,3 kg ve srovnání s rokem předešlým (Báčová, 2016; Lukavcová, 2017; Vodičková, 2016).

Sýry mají své charakteristické organoleptické vlastnosti (zejména chuť a vůni), které jsou důsledkem řady biochemických reakcí, protože při nich vznikají významné sensorické látky (Calzada et al., 2013, s. 4817; El-Zahar, El-Zager a Ramadan, 2014, s. 73; Fox et al., 2000, s. 12-15; 2004, s. 103-140; Roginski, Fuquay a McSweeney, 2002, s. 795). Tyto biochemické reakce probíhají již od prvních hodin výroby sýrů (nejvíce během lisování a solení sýrů), avšak k největším biochemickým změnám dochází až v průběhu zrání sýrů. Během zrání sýrů mohou být mimo jiné tvořeny biogenní aminy (BA) ve významných koncentracích, přičemž přítomnost a konzumace vysokých koncentrací mohou negativně ovlivňovat konzumentovo zdraví (Church, McCance & Widdowson, 2002, s. 110; Fox et al., 2000, s. 15; McSweeney, 2004, s. 128; Roginski, Fuquay a McSweeney, 2002, s. 799).

Dekarboxylázová aktivita byla upozorována u řady mikroorganismů, které jsou součástí kyslíkových kultur. Mimo kyslíkové mikroorganismy se v sýrech mohou vyskytovat i nekyslíkové bakterie, u kterých byla také detekována schopnost dekarboxylace aminokyselin za vzniku BA (Buňková et al., 2010, s. 880; Innocente et al., 2007, s. 1285; Calzada et al., 2013, s. 4817; El-Zahar, El-Zager a Ramadan, 2014, s. 74). Přítomnost nekyslíkových bakterií je do jisté míry u sýrů žádoucí, neboť se mohou značně podílet na řadě biochemických reakcí v průběhu zrání sýrů. Vlastnost mít pozitivní dekarboxylázovou aktivitu mají jednotliví zástupci, nikoliv celý kmen. Mezi bakterie s pozitivní dekarboxylázovou aktivitou se řadí např. *Lactobacillus brevis*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Streptococcus thermophilus*. Druhým předpokladem pro vznik BA je delší doba zrání sýrů, neboť s jeho rostoucí dobou zpravidla rostou i koncentrace BA. Třetím předpokladem je mikrobiální čistota vstupní suroviny, tedy mléka. V případě výroby sýrů z tepelně neošetřeného mléka je riziko vyšší tvorby BA způsobeno pomocí bakterií mléčného kvašení či kontaminující mikroflóry, zejména pomocí bakterií čeledi *Enterobacteriaceae*.

Výskyt konkrétních BA v přírodních sýrech se může lišit v závislosti na použité mikroflóře (ať už kyslíkových či nekyslíkových mikroorganismů s pozitivní dekarboxylázovou aktivitou). Mezi velmi často vyskytující se BA v přírodních sýrech byly detekovány zejména histamin, tyramin, putrescin a kadaverin (Buňková et al., 2009, s. 535; 2013, s. 549; Calzada et al., 2013, s. 4817; Schirone et al., 2013, s. 138).



## 2. SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

### 2.1 Biogenní aminy

Biogenní aminy jsou nízkomolekulární dusíkaté látky, které vznikají dekarboxylací příslušných aminokyselin působením mikroorganismů (MO) s pozitivní dekarboxylázovou aktivitou. Výskyt BA v nízkých koncentracích je přirozený u všech živočichů, rostlin i mikroorganismů, kde plní řadu významných fyziologických funkcí (Brown, Stevens a Haas, 2001, s. 638; Buňková et al., 2013, s. 548; Dadáková, Křížek a Pelikánová, 2009, s. 365; El-Zahar, El-Zager a Ramadan, 2014, s. 74; Önal, 2007, s. 1475). Na druhou stranu konzumace vyšších množství BA může mít závažný negativní vliv na organismus (Buňková et al., 2009, s. 534, 2010, s. 880; El-Zahar, El-Zager a Ramadan, 2014, s. 74; Fiechter, Sivec a Mayer, 2013, s. 191; Innocente et al., 2007, s. 1285; Li et al., 2014, s. 355).

#### 2.1.1 Vznik biogenních aminů

BA vznikají v potravinách převážně degradací volných aminokyselin pomocí mikroorganismů s pozitivní dekarboxylázovou aktivitou. Dekarboxylázy, které katalyzují reakce vzniku BA, mohou být produkovány různými druhy mikroorganismů, avšak jedná se spíše o vlastnost konkrétních kmenů než celého druhu (BioCyc Database Collection, 2016; Buňková et al., 2009, s. 534; 2011, s. 113; Fiechter, Sivec a Mayer, 2013, s. 191; Loizzo et al., 2013, 38-40, Pachlová et al., 2016, 1-2).

Řada biogenních aminů vzniká jednostupňově, např. histamin z L-histidinu působením histidin-dekarboxylázy. Některé biogenní aminy však mohou vznikat i z jiných biogenních aminů. Například spermidin vzniká methylací, či reakce spermidinu za vzniku sperminu (Ancín-Azpilicueta et al., 2008, s. 258; BioCyc Database Collection, 2016; Halász et al., 1994, s. 43; Kalač, 2014, s. 27; Komprda et al., 2008, s. 30).

Vznik putrescinu je mnohem složitější a jeho syntéza je závislá na typu přítomných bakterií, kterými je dekarboxylován. V přítomnosti gramnegativních bakterií může být putrescin tvořen až třemi drahami. Působením grampozitivních bakterií může být putrescin tvořen dvěma drahami (Ancín-Azpilicueta et al., 2008, s. 258; Fiechter, Sivec a Mayer, 2013, s. 191; Loizzo et al., 2013, 38-40; Roginski, Fuquay a McSweeney, 2002, s. 842).

Mezi přímé faktory vzniku BA patří přítomnost dostatečného množství volných aminokyselin z nichž jsou BA pomocí dekarboxylace syntetizovány (Komprda et al., 2008, s. 220; Linares et al., 2012, s. 2-3; Novella-Rodriguez et al., 2004, s. 246). Druhým, velmi podstatným, předpokladem pro vznik BA je přítomnost mikroorganismů s pozitivní dekarboxylázovou aktivitou (Buňková et al., 2010, s. 881; Mayer, Fiechter a Fischer, 2010, s. 7955).

Nepřímé faktory pro vznik biogenních aminů jsou takové, které mají vliv na samotné množení, růst a celkový metabolismus mikroorganismů s pozitivní dekarboxylázovou aktivitou. Mezi takové podmínky patří například koncentrace sacharidů (především glukózy), teplota, pH, přítomnost kyslíku, koncentrace NaCl, aj. Tyto podmínky jsou však závislé na konkrétním druhu a nelze tak souhrnně specifikovat výše uvedené podmínky (Bover-Cid et al., 2008, s. 270, Buňková et al., 2011, s. 113-114).

### **2.1.2 Toxikologické účinky biogenních aminů**

Lidský organizmus je přirozeně chráněn před intoxikací biogenními aminy, a to pomocí detoxifikačního mechanismu. Jeho účinnost ale může vlivem různých faktorů být snížena. Konzumace potravin s vysokými koncentracemi BA může negativně ovlivňovat lidský organizmus. Z hlediska jejich toxikologického působení na lidský organizmus jsou biogenní aminy rozděleny na psychoaktivní (působící na nervové přenašeče) a vazomotorní látky (vliv na kardiovaskulární systém, aj.). Intoxikace psychoaktivními látkami se může projevovat dočasnými změnami vnímání či chování. Vazomotorní BA mohou být dále na vazokonstrikční (např. tyramin) či vazodilatační (např. fenylethylamin) (Buňková et al., 2010, s. 881; Dang, Pesek a Matyska, 2013, s. 4227; Křížek et al., 2014, s. 466-467; Mayer, Fiechter a Fischer, 2010, s. 3252).

Mezi nejvýznamnější biogenní aminy z hlediska negativního účinku na lidský organizmus se řadí zejména histamin a tyramin. Intoxikací těmito BA může docházet k anafylaktickému šoku, snížení krevního tlaku, bolestem hlavy přecházející v silné migrény, aj. Konzumace potravin s koncentrací histaminu nad  $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  může vést k velmi silným otravám (Buňková et al., 2010, s. 881; Li et al., 2014, s. 356; Innocente et al., 2007, s. 1286; Dang, Pesek a Matyska, 2013, s. 4227; Křížek et al., 2014, s. 467; Mayer, Fiechter a Fischer, 2010, s. 3252).

Tyramin se řadí mezi vazokonstrikční biogenní aminy, které mohou způsobovat hypertenzi. Mimo to může tyramin způsobovat bolesti hlavy, zvracení, či rozšíření cév, aj. Koncentrace tyraminu  $100 - 800 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  v potravine je v řadě publikací označována jako toxická pro lidský organizmus (Buňková et al., 2010, s. 881; Calzada et al., 2013, s. 4817; Křížek et al., 2014, s. 467; Önal, 2007, s. 1476). Obdobné toxikologické účinky na lidský organizmus může mít také konzumace vyšších koncentrací tryptaminu a fenylethylaminu (Anonym, 2011, s. 21).

Další BA putrescin a kadaverin mohou zesilovat výše uvedené účinky histaminu a tyraminu.

### **2.1.3 Výskyt biogenních aminů**

Biogenní aminy jsou v nízkých koncentracích přirozeně se vyskytující látky u všech mikroorganismů, živočichů i rostlin. Z hlediska fyziologie zde plní řadu významných a důležitých funkcí jako například stabilizátory makromolekul, lokální tkáňové hormony, aj.

Vznik závažně vysokých koncentrací BA může být důsledkem přítomné mikroflóry v potravinách (Buňková et al., 2010, s. 880; Mayer, Fiechter, Fischer, 2010, s. 3252). Původ přítomných mikroorganismů s pozitivní dekarboxylázovou aktivitou v potravinách může být:

- mikroorganismy z původní suroviny (často tyto MO mohou být vnímány také jako kontaminanty, avšak mohou se podílet na řadě významných biochemických procesech). V mlékárenství se těmto mikroorganismům přispívajícím k vytváření typické jakosti výrobku říká „nezákysové bakterie“, nebo také nonstartérové;
- přídavek mikroorganismů do suroviny během technologie výroby – jedná se o zákysové (neboli startérové) kultury;
- mikroorganismy, které se do suroviny dostaly v průběhu technologického procesu – nezákysové (nonstartérové), významně podílí na důležitých biochemických procesech v průběhu zrání sýrů;
- kontaminující mikroflóra, která se do potraviny dostala v průběhu technologie výroby potravin vlivem špatných hygienických podmínek, či nevhodným skladováním (Komprda, 2004, s. 53; Mayer, Fiechter, Fischer, 2010, s. 3252; Santos, 1996, s. 214).

Na základě typu potravin v souvislosti s jejím technologickým procesem výroby je můžeme rozdělit na fermentované a nefermentované potraviny (Buňková et al., 2010, s. 881; Innocente et al., 2007, s. 1285; Mayer, Fiechter, Fischer, 2010, s. 3252; Moreno-Arribas a Polo, 2009, s. 341; Önal, 2007, s. 1476).

Přítomnost BA v nefermentovaných potravinách je zejména díky výskytu a působení kontaminující mikroflóry. Vzhledem k tomuto faktu mohou být BA označovány jako ukazatel kažení potravin.

Z hlediska obsahu BA představují fermentované potraviny poměrně významnější skupinu potravin, neboť jsou zde detekovány značné koncentrace biogenních aminů. BA ve fermentovaných potravinách mohou vznikat působením nejen zákysových kultur (pokud pomineme produkci BA působením kontaminující mikroflóry), ale i nezákysových mikroorganismů. (Buňková et al., 2010, s. 881; El-Zahar, El-Zager a Ramadan, 2014, s. 74; Innocente et al., 2007, s. 1286). Proto je podstatné vybírat kombinaci takových startérových mikroorganismů, které nevykazují žádnou či minimální pozitivní dekarboxylázovou aktivitu (Mayer, Fiechter, Fischer, 2010, s. 3252; Quereshi et al., 2013, s. 304).

## **2.2 Zrání přírodních sýrů**

V přírodních sýrech dochází v průběhu zrání k řadě významných biochemických reakcí, které mají za následek vývoj typické textury, aroma i chuti přírodních sýrů. Na těchto významných biochemických procesech se může podílet nejen živá mikroflóra, ale také neživá mikroflóra. Lyzí těchto buněk dochází k uvolňování enzymů do okolí, které se rovněž podílí na řadě

biochemických reakcí (Calzada et al., 2013, s. 4817; El-Zahar, El-Zager a Ramadan, 2014, s. 74; Fox et al., 1998, s. 384; 2000, s. 524; 2004, s. 421; Roginski, Fuquay a McSweeney, 2002, s. 842; Schirone et al., 2013, s. 138).

### 2.2.1 Metabolismus laktózy a reakce kyseliny mléčné

Laktóza (disacharid složený z galaktózy a glukózy, které jsou spojeny  $\beta$  1 – 4 glykozidickou vazbou) je nejvíce zastoupeným sacharidem obsaženým v mléce. Laktóza je ve větší míře rozložena již během prvních 24 hodin od počátku výroby sýrů, u polotvrdých a tvrdých přírodních sýrů dochází k úplnému rozkladu laktózy během prvních dnů zrání (Fox et al., 2000, s. 487). U přírodních sýrů dochází k homofermentativnímu rozkladu laktózy zejména pomocí bakterií mléčného kvašení (BMK) (především bakterie *Lactococcus* spp., *Leuconostoc* spp., *Lactobacillus* spp., *Streptococcus thermophilus*), které ji využívají jako zdroj energie pro jejich růst a množení. BMK mohou metabolizovat laktózu třemi způsoby, které jsou závislé na jejím způsobu transportu.

V případě utilizace laktózy dvěma drahami vzniká současně i glukóza, která je pomocí glukokinázy přeměněna na glukóza-6-fosfát. Glukóza následně vstupuje do Emden-Meyerhofovy dráhy. Třetí možnost utilizace laktózy probíhá za přítomnosti laktóza-galaktohydrolázy. Díky přidavku vody vzniká D-glukopyranóza a  $\beta$ -D-galaktóza.

Permeázový systém neboli Leloirova dráha představuje hlavní cestu pro využití galaktózy při nízkých koncentracích extracelulárních sacharidů (Fox et al. 1993, s. 354; 2000, s. 489; 2004, s. 347; McSweeney a Sousa, 2000, s. 294; Roginski, Fuquay a McSweeney, 2002, s. 842).

Principem Emden-Meyerhofovy dráhy je postupná fosforylace glukózy. V důsledku následného vzniku laktátu dochází v prvních dnech k poklesu pH sýrů (Fox et al., 2000, s. 489; 2004, s. 347; McSweeney, 2004, s. 128).

Následnou reakcí kyseliny mléčné dochází k nárůstu pH sýrů a vzniku dalších sensoricky aktivních látek. Pomocí nezakysových BMK či zakysovými bakteriemi rodu *Lactobacillus* může docházet k racemizaci. Laktát může být následně přeměňován na formiát, acetát, etanol a oxid uhličitý (Fox et al., 1998, s. 342; 2000, s. 387; 2004, s. 521; Grossiord et al., 1998, s. 78; McSweeney a Sousa, 2000, s. 294; Roginski, Fuquay a McSweeney, 2002, s. 842).

### 2.2.2 Metabolismus citrátu

Mléko obsahuje přibližně 1600 – 1800 mg citrátu na 1 l mléka, přičemž ~ 94 % veškerého citrátu přechází do syrovátky (v rozpustné formě), zbylý citrát zůstává v sýřenině ve formě koloidního citrátu (Fox, 1993, s. 478; McSweeney a Sousa, 2000, s. 294). Metabolismus citrátu může být významným prekurzorem pro vznik sensoricky aktivních látek produkovaných mezofilní zakysovou kulturou. Citrát může být metabolizován působením citrát-pozitivních laktokoků (např. *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis*) (Fox et al., 2000, s. 612; McSweeney a Sousa, 2000, s. 294).

### 2.2.3 Proteolýza a metabolismus aminokyselin

Proteolýza je katalyzována enzymy, které mohou pocházet z různých zdrojů, avšak pro přírodní sýry jsou významné enzymy pocházející z koagulačního činidla, enzymy mléka a enzymy přítomných bakterií mléčného kvašení (zákysové a nezákysové). Vzniklé aminokyseliny mohou dále reagovat za vzniku významných sensoricky aktivních látek a současně dochází ke vzniku požadované textury (Fox et al., 2000, s. 75, 2004, s. 185; McSweeney a Sousa, 2000, s. 294; Yvon a Rijnen, 2001, s. 186).

Dekarboxylace AMK za vzniku BA je jedna z nejvýznamnějších reakcí, která probíhá působením dekarboxylačních enzymů mikroorganismů. Jednou z významných reakcí v sýrech během zrání je deaminace AMK (odštěpení aminoskupiny) za vzniku  $\alpha$ -ketokyselin. Další reakcí AMK a  $\alpha$ -ketokyselin vznikají aldehydy a příslušné kyseliny dle Streckerovy degradace (např. vznik isobutanalu z leucinu a izoleucinu, methionalu z valinu, 3-metylbutanal z methioninu, aj.) (BioCyc Database Collection, 2016; Buňková et al., 2009, s. 534; 2011, s. 113; Fiechter, Sivec a Mayer, 2013, s. 191; Loizzo et al., 2013, s. 39; Pachlová et al., 2016, s. 2).

### 2.2.4 Lipolýza a metabolismus mastných kyselin

Lipolýza není u většiny přírodních sýrů žádoucí ve velké, neboť vysoké koncentrace mastných kyselin by mohly vést ke žluknutí. Přibližně 3,5 – 4,5 % (w/w) lipidů je obsaženo v kravském mléce, přičemž 97 – 98 % z těchto lipidů tvoří triacylglyceroly (Fox et al., 2000; Fox & McSweeney, 1998; McSweeney, 2004).

Enzymy (lipázy) se mohou v sýrech vyskytovat z několika zdrojů (lipázy mléka, lipázy syřidlových past – zejména u syřidlových past používaných pro výrobu některých druhů italských sýrů, lipázy zákysových a nezákysových bakterií, přídavek exogenních lipáz, či lipázy sekundárních kultur). (Fox et al., 2000; Fox & McSweeney, 1998; McSweeney, 2004).

## 2.3 Mikroorganismy produkující biogenní aminy ve vybraných skupinách přírodních sýrů

Pro polotvrdé až tvrdé sýry (Gouda, Edam, aj.) jsou bakterie rodu *Lactococcus* velmi často využívány jako součást zákysových kultur. Burdychová a Komprda (2007, s. 150) se ve své publikaci zabývali sledováním dekarboxylázové aktivity u sýrů holandského typu vyrobených za požití dvou rozdílných zákysových kultur. U vzorků sýrů vyrobených ze zákysové kultury bylo izolováno 14 kmenů s tyramin-dekarboxyláza enzymem. Byla zjištěna 5x vyšší koncentrace tyraminu ve srovnání se vzorky sýrů vyrobených za použití druhé zákysové kultury (složená z mikroorganismů *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* a *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*) (Burdychová a Komprda, 2007, s. 151).

Produkcí BA 3 kmenů *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* v polotvrdých italských sýrech se zabýval i Genovese et al. (2013, 1074-1076). Schopnost produkce histaminu u dvou kmenů *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*. U jednoho kmene byla také zpozorována značná pozitivní tyramin-dekarboxylázová aktivita. Dle Ladero et al. (2012, s. 310) byly označeny kmeny *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (celkem 5 kmenů) a kmeny *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* (celkem 4 kmeny) za kmeny s pozitivní putrescin-dekarboxylázovou aktivitou.

Burdychová & Komprda (2007, s. 151) uvedli, že produkce histaminu v sýrech byla důsledkem působení bakterií rodu *Lactobacillus* (*Lactobacillus curvatus* a *Lactobacillus lactis*). U bakterií rodu *Lactobacillus* (2 kmeny *Lactobacillus brevis* a 2 kmeny *Lactobacillus curvatus*) byla popsána schopnost produkce putrescinu (Ladero et al., 2012, s. 310). Obdobné výsledky byly publikovány Buňkovou et al. (2010, s. 883). Jako producenty tyraminu byly popsány 3 kmeny *Lactobacillus curvatus*, 2 kmeny *Lactobacillus casei* a 1 kmen *Lactobacillus plantarum*. Mezi významné producenty putrescinu byly identifikovány 3 kmeny *Lactobacillus curvatus*.

Dekarboxylázovou aktivitou 2 kmenů *Lactobacillus parabuchneri* v sýrech švýcarského typu se zabýval Fröhlich-Wyder et al. (2013, s. 122-126). Koncentrace histaminu po 90 dnech zrání vzorků dosahovala hodnoty až 300 mg·kg<sup>-1</sup> (Gardini et al., 2012, s. 73-75). U sýrů inokulovaných kmenem *Streptococcus thermophilus* byla zpozorována značná produkce histaminu, kde se jeho koncentrace blížily k hranici 200 mg·kg<sup>-1</sup> (Gardini et al., 2012, s. 73-75). Tyramin-dekarboxylázová aktivita byla rovněž potvrzena i u bakterií *Lactobacillus brevis* či *Lactobacillus curvatus*.

BA mohou být produkovány i bakteriemi, které mohou být izolovány z jiných potravin, např. masa, zeleniny, nápojů, aj. Lázaro et al. (2015, s. 15-20) se zabýval souvislostí vzniku biogenních aminů a celkového počtu mezofilních bakterií a bakterií rodu *Enterobacteriaceae* v průběhu skladování různých druhů drůbežího masa. Bakterie mléčného kvašení se mohou vyskytovat i ve fermentované zelenině. Studií vzniku tyraminu pomocí BMK ve fermentované zelenině kimchi provedli Kim a Kim (2014, s. 406). 14 kmenů z izolovaných 230 dekarboxyluje tyrosin v podmínkách *in vitro* (Kim a Kim, 2014, s. 407-413).

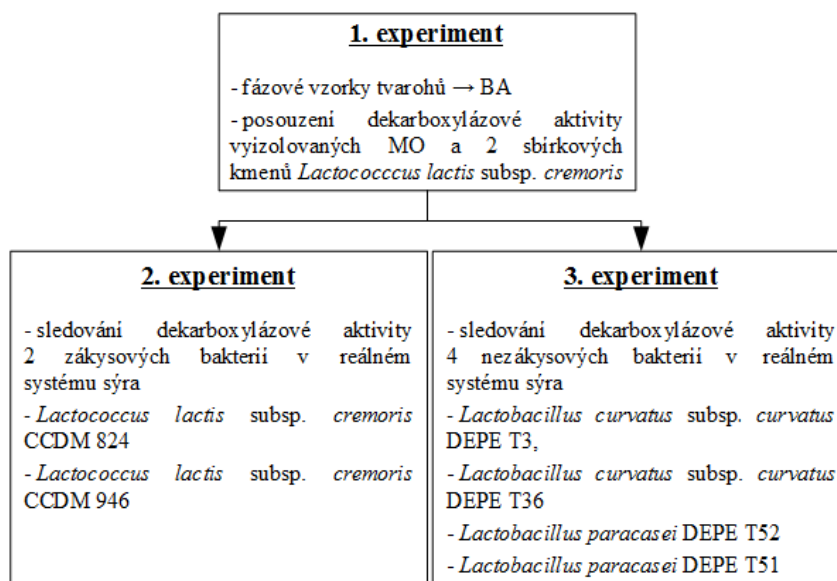
### 3. CÍLE DIZERTAČNÍ PRÁCE

Cílem dizertační práce bylo sledování dekarboxylázové aktivity vybraných kmenů mikroorganismů v reálném systému modelových vzorků sýrů. Pomocí HPLC byl sledován vznik a konečné koncentrace osmi biogenních aminů (tryptaminu, fenylethylamin, putrescinu, kadaverinu, histaminu, tyraminu, spermidinu a sperminu) v průběhu zrání přírodních sýrů. Pro dosažení základního cíle dizertační práce bylo vhodné naplnit následující dílčí cíle:

- provedení monitoringu obsahu biogenních aminů u tvarohů v různých fázích výrobního procesu;
- zjištění schopnosti produkce biogenních aminů získanými mikroorganismy, které byly izolovány z přírodních sýrů;
- na základně předchozích dílčích cílů selektovat produkční kmeny mikroorganismů, a to jak zákysových, tak nezákysových bakterií mléčného kvašení;
- výroba modelových vzorků přírodních sýrů s přídavkem zákysových bakterií s dekarboxyláza pozitivní aktivitou a sledování vývoje koncentrace biogenních aminů v průběhu zrání sýrů;
- výroba laboratorních vzorků sýrů holandského typu s přídavkem nezákysových bakterií s dekarboxyláza pozitivní aktivitou a sledování vývoje koncentrace biogenních aminů v průběhu zrání sýrů;
- studování vývoje dalších parametrů modelových vzorků sýrů s dekarboxyláza pozitivními kmeny ve srovnání s kontrolními vzorky sýrů (sýry bez přídavku sledovaného dekarboxyláza pozitivního kmene), a to texturní profilová analýza, mikrobiologická analýza, pH a parametry základní sensorické analýzy (sušina, obsah NaCl);
- vyhodnocení výsledků a formulování závěrů.

## 4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Dizertační práce byla rozdělena na 3 experimenty, které byly navrženy pro naplnění dílčích cílů. Rozdělení a cíle těchto experimentů znázorňuje Obr. 1.



Obr. 1: Rozdělení dizertační práce, popis jednotlivých experimentů a jejich cílů.

### 4.1 První experiment

Cílem prvního experimentu bylo sledovat vývoj obsahu biogenních aminů u tvarohů (Tabulka 1). Vzorky tvarohů byly odebrány v různých fázích technologie výroby a skladování. Byla posuzována dekarboxylázová aktivita u mikroorganismů, které byly z těchto vzorků izolovány. Samotná izolace a identifikace mikroorganismů však nebyla předmětem této práce. Izolované mikroorganismy byly dodány spolupracujícím pracovištěm. Kromě izolátů byly pro testování dekarboxylázové aktivity použity i 2 sbírkové izoláty, které se běžně vyskytují v přírodních sýrech.

Dekarboxylázová aktivita byla posuzována na základě kultivace vzorků v modifikovaných bujónech, které představovaly optimální podmínky pro růst mikroorganismů, a podpořily tak jejich schopnost produkovat biogenní aminy.

### 4.2 Druhý experiment

Modelové vzorky sýrů byly inokulovány vybranými kmeny *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 824 (sýry s označením B<sub>824</sub>) a CCDM 946 (sýry s označením B<sub>946</sub>). U těchto modelových vzorků sýrů byla sledována schopnost produkovat biogenní aminy po dobu zrání 90 dnů při teplotě 10 ± 1 °C. Naměřené výsledky byly sledovány s modelovými vzorky sýrů, které byly vyrobeny za použití komerční kyselové kultury, vzorky označeny A.



Tabulka 1 Kódování vzorků odebrané v průběhu výroby a skladování tvarohů

označení vzorku	charakteristika vzorku
1	syrové mléko
2	pasterované odstředěné mléko – odběr za pasterem
3	pasterované mléko – ve standardizačním tanku
4A	mléko před prokysáním – výroba č. 1
4B	mléko před prokysáním – výroba č. 2
5A	tvarohovina před krájením – výroba č. 1
5B	tvarohovina před krájením – výroba č. 2
6A	tvarohové zrno – výroba č. 1
6B	tvarohové zrno – výroba č. 2
7A	tvaroh jemný ve spotřebitelském obalu – výroba č. 1 po 1 dnu skladování
7B	tvaroh jemný ve spotřebitelském obalu – výroba č. 2 po 1 dnu skladování
8A	tvaroh jemný ve spotřebitelském obalu – výroba č. 1 po 25 dnech skladování
8B	tvaroh jemný ve spotřebitelském obalu – výroba č. 2 po 25 dnech skladování

### 4.3 Třetí experiment

Cílem třetího experimentu bylo sledování produkce biogenních aminů nezákysových bakterií v reálném systému vzorku sýrů holandského typu, které byly vybrány na základě sledování dekarboxylázové aktivity v prvním experimentu. Pro naplnění cíle třetího experimentu byly vyrobeny přírodní sýry, které byly jednotlivě inokulovány kmeny *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* DEPE T3 (sýry s označením T<sub>3</sub>), *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* DEPE T36 (sýry s označením T<sub>36</sub>), *Lactobacillus paracasei* DEPE T52 (sýry s označením T<sub>52</sub>) a *Lactobacillus paracasei* DEPE T51 (sýry s označením T<sub>51</sub>) (Obr. 16). Kontrolní vzorky sýrů vyrobené pro tento experiment byly označeny jako vzorky C.

## 5. ZVOLENÉ METODY ZPRACOVÁNÍ

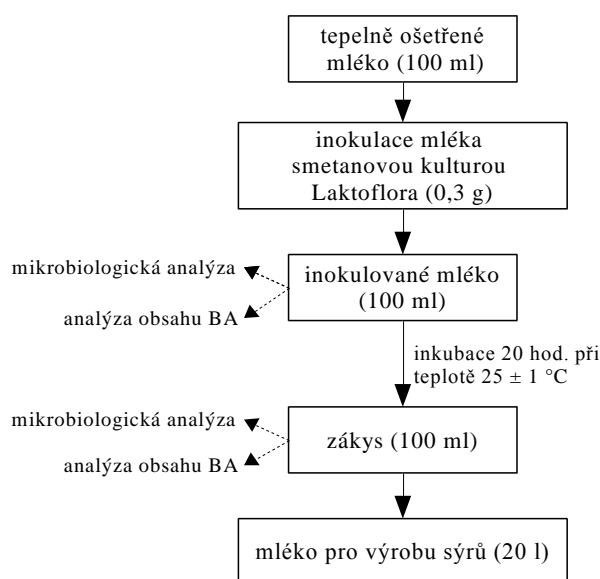
### 5.1 Laboratorní výroba vzorků přírodních sýrů

Modelové vzorky sýrů byly vyrobeny při laboratorních podmínkách. Samotný postup výroby sýrů holandského typu se mezi experimenty 2 a 3 nijak významně nelišil. Rozdíl byl pouze ve výběru mikroorganismů.

Pro každý mikroorganismus byla vyrobena 1 řada vzorků, která představovala dvě paralelní výroby (šarže), a to kontrolní výrobu A/C (sýry bez přídavku sledovaného kmene, tedy kontrolní vzorky sýrů obsahující pouze smetanovou kulturu Laktoflora, Milcom a.s., Česká republika, složená z kmenů *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* a *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* var. *diacetylactis*) a výroba sýrů inokulované sledovaným kmenem (výroby B/T) (Calzada et al., 2013, s. 4818; El-Zahar, El-Zager a Ramadan, 2014, s. 75; Fox et al., 2000, s. 243; 2004, s. 475; Roginski, Fuquay a McSweeney, 2002, s. 842; Schirone et al., 2013, s. 138).

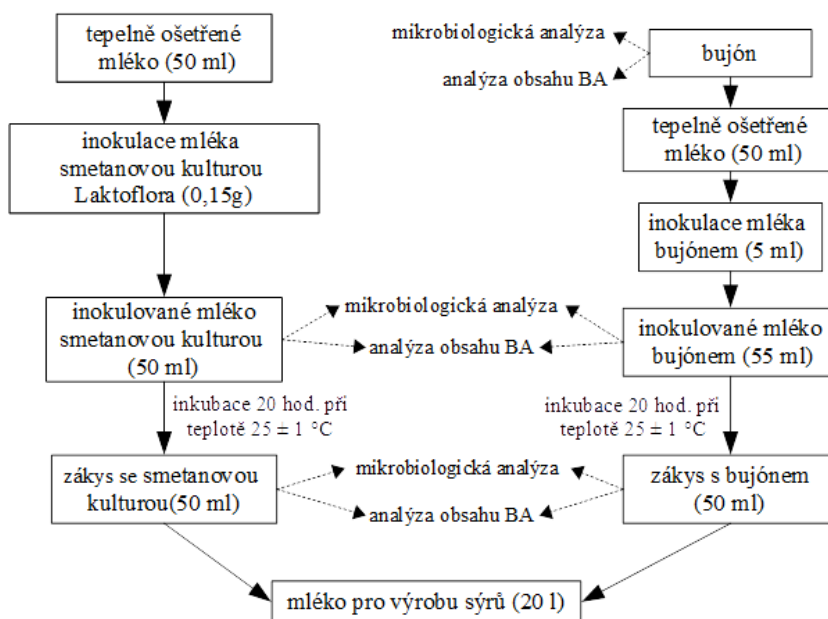
Příprava zákysů na Obr. 2 je pro výroby sýrů šarže A a C a Obr. 3 pro výroby sýrů šarže B a T. Technologii výroby sýrů a odběry znázorňují Obr. 4 a 5.

Bujóny obsahující vybrané mikroorganismy, kterými byly inokulovány dané šarže sýrů, byly připraveny podle Buňková et al. (2011, 113-115).

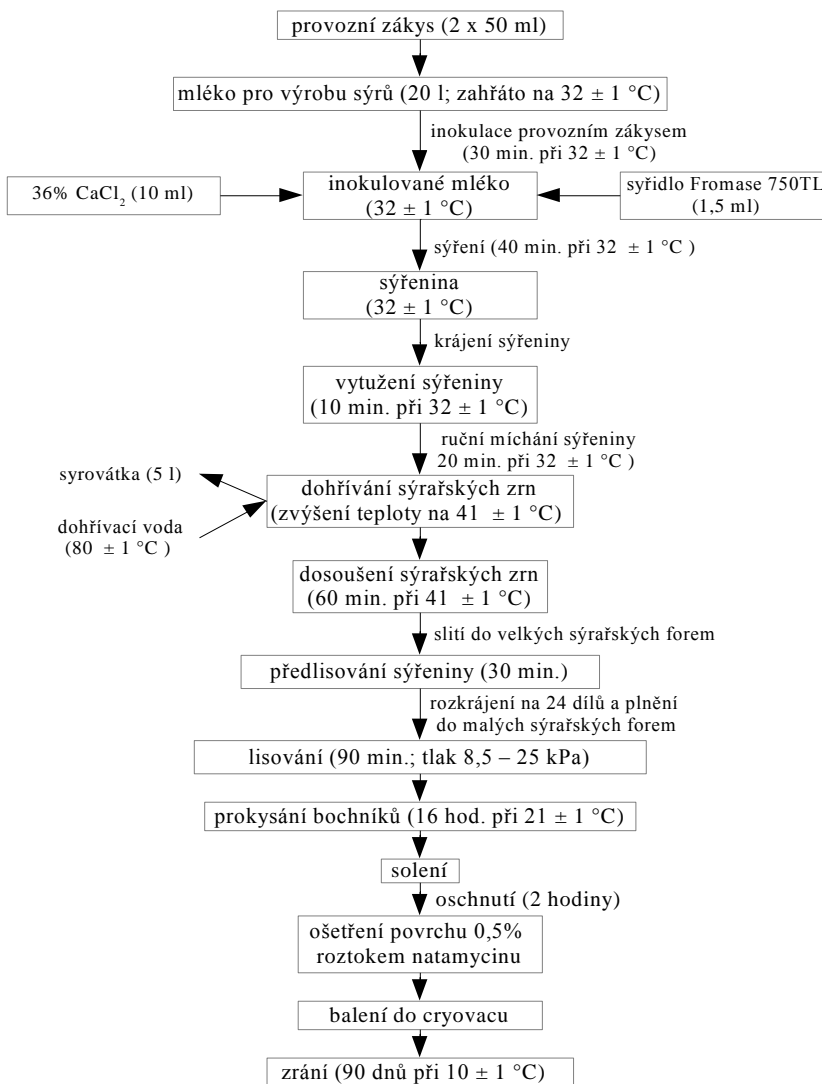


Obr. 2: Postup přípravy provozního zákysu pro kontrolní výrobu vzorků A a C bez přídavku sledovaného kmene.

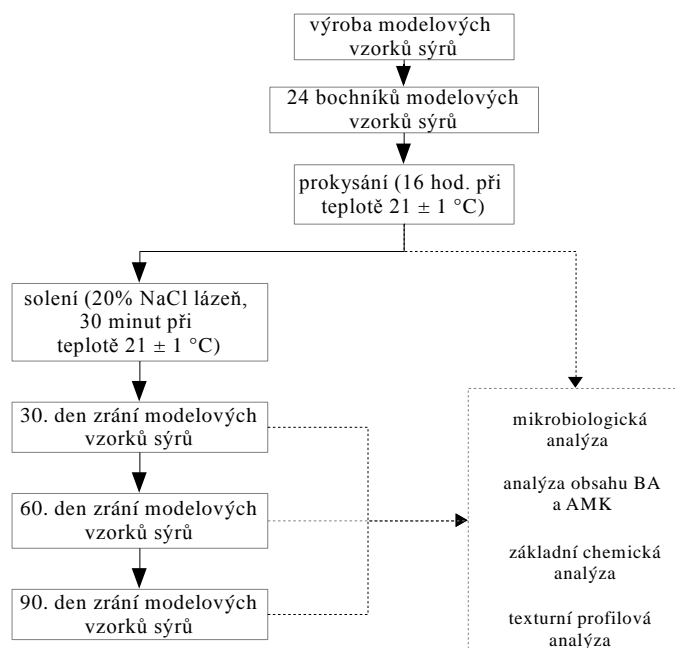
Při výrobě jedné šarže bylo použito 20 l kravského mléka o tučnosti 2,5 %, přičemž bylo vyrobeno 24 bloků sýrů o průměrné hmotnosti  $90 \pm 3$  g (Obr. 5). Výroba sýrů probíhala ve výrobním tanku MSKD-1 (Driml, Brno, Česká republika).



Obr. 3: Postup přípravy provozních zákysů pro výrobu sýrů označení B a T – zákys s běžnou komerční kulturou a zákys obsahující sledovaný kmen.



Obr. 4: Technologie výroby modelových vzorků sýrů.



Obr. 5: Způsob solení a zrání modelových vzorků sýrů holandského typu pro 2. a 3. experiment.

## 5.2 Posouzení dekarboxylázové aktivity

Decarboxylázová aktivita jednotlivých mikroorganismů byla posuzována na základě kultivace jednotlivých mikroorganismů v bujónech, které byly obohaceny o prekuzory jednotlivých sledovaných biogenních aminů o koncentraci  $2 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$  každého z nich. Směs po kultivaci byla podrobena stanovení obsahu biogenních aminů viz níže. Jako pozitivní kontrola byly vybrány mikroorganismy *Enterococcus faecalis* CCM 2665 a *Escherichia coli* CCM 3954. Jako negativní kontrola byly zvoleny mikroorganismy *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* CCM 3953 a *Pseudomonas fragi* MD 48 (Buňková et al., 2009, s. 535; Pleva et al. 2012, s. 439).

## 5.3 Základní parametry přírodních sýrů

Analýza základních parametrů byla zaměřena na stanovení obsahu sušiny, měření hodnot pH a stanovení obsahu NaCl. Sušina byla stanovována sušením při teplotě  $102 \pm 2 \text{ °C}$  dle normy EN ISO 5534:2004. Hodnoty pH byly měřeny pomocí vpichového pH metru (Spear – Eutech, Nizozemsko). Obsah NaCl byl stanovován podle Mohra (Indra a Mizera, 1992, s. 189). Poté byly vzorky lyofilizovány pomocí ALPHA 1 – 4 LCS (Christ, Německo).

## 5.4 Texturní profilová analýza

Texturní profilová analýza byla měřena pomocí analyzátoru TA.XT Plus (Stable Micro Systems, VB). Vzorek byl stlačen o 20 % původní výšky konstantní rychlostí  $1 \text{ mm} \cdot \text{s}^{-1}$  desky o průměru 50 mm. Sledovaným parametrem byla tvrdost (N) ( $n=6$ ) (Buňka, Pachlová a Nenutilová, 2013a).

## 5.5 Mikrobiologická analýza

Mikrobiologická analýza byla zaměřena na stanovení počtů 5 skupin mikroorganismů. Přehled vybraných skupin MO, kultivačních médií a podmínek kultivace pro jednotlivé skupiny mikroorganismů je uveden v Tabulce 2 (Buňková et al., 2009, s. 535; 2010, s. 881; Pleva et al. 2012, s. 439).

Tabulka 2 Přehled doby kultivace médií pro jednotlivé skupiny mikroorganismů (Buňková et al., 2009, s. 535; 2010, s. 881; Pleva et al. 2012, s. 439)

skupina mikroorganismů	půda	doba kultivace [hod]	teplota [°C]
celkový počet mikroorganismů	PCA – Plate Count Agar	24	37
mléčné koky (laktokoky, streptokoky a leukonostoky)	M17 agar	48	37
laktobacily	MRS - Mann, Rogosa & Sharpe agar	48	30
enterokoky	SB agar - Slanetz-Bartley agar	24	37
enterobakterie	Endo agar	48	37

## 5.6 Stanovení obsahu volných aminokyselin

Chromatografická analýza byla zaměřena na stanovení obsahu 30 volných aminokyselin a jejich derivátů. Postup extrakce volných aminokyselin byl zvolen podle Pachlová et al. (2011, s. 102). Připravené extrakty byly analyzovány podle Buňková et al. (2009, s. 534) pomocí iontově-výměnné kapalinové chromatografie použitím Automatického analyzátoru aminokyselin AAA 400 (Ingos, Česká republika).

## 5.7 Stanovení obsahu biogenních aminů

Z lyofilizátů byla nejprve provedena extrakce (Buňková et al., 2009, s. 534; Pachlová et al. 2011, s. 102) přítomných biogenních aminů a tyto extrakty byly následně derivatizovány dle Dadákové, Křížka a Pelikánové (2009, s. 366). BA byly stanoveny pomocí HPLC (Agilent Technologies, USA) analýzy, která byla zaměřena na detekci koncentrací tryptaminu, fenylethylaminu, putrescinu, kadaverinu, histaminu, tyraminu, spermidinu a sperminu. Separace biogenních aminů byla provedena podle Smělá et al. (2004, s. 433-434).

## 5.8 Statistické zpracování dat

Pro statistické vyhodnocení byl použit Kruskal-Wallis a Wilcoxonův test (Agresti, 1984, s. 212; Obtulovič, 2002, s. 47). Pro získaná data byl použit statistický software Unistat 6.5 (na hladině významnosti  $\alpha=0,05$ ) (Unistat Ltd., Velká Británie).

## 6. VÝSLEDKY

### 6.1 Výsledky 1. experimentu

Byl sledován vývoj obsahu BA u tvarohů. Izolované kmeny z fázových odběrů byly identifikovány (pomocí hmotnostní spektrofotometrické detekce MALDI-TOF), současně byla sledována i dekarboxylázová aktivita celkem 79 izolovaných mikroorganismů (izolace byla provedena spolupracujícím pracovištěm).

U analyzovaných vzorků byly detekovány nízké nebo nulové koncentrace sledovaných biogenních aminů (Tabulka 3). Na konci doby zrání tvarohů ve spotřebitelských obalech se hodnoty pohybovaly v rozmezí 0,36 – 0,39 mg·kg<sup>-1</sup>. Lze konstatovat, že nebyly zaznamenány žádné významné statistické rozdíly mezi vzorky výroby č. 1 a č. 2. Po celou dobu výrobního procesu koncentrace spermidinu měly mírný rostoucí trend.

Pasterované mléko obsahovalo tyramin v množství 0,15 ± 0,01 mg·kg<sup>-1</sup>. Putrescin byl v pasterovaném mléce detekován v poněkud vyšší koncentraci, a to 0,42 ± 0,01 mg·kg<sup>-1</sup>. Po celou dobu experimentu docházelo k pozvolnému nárůstu koncentrací obou biogenních aminů. Tyramin byl detekován na konci skladování u tvarohů ve více než čtyřnásobně vyšší koncentraci (7,60 – 8,25 mg·kg<sup>-1</sup>) než koncentrace putrescinu (1,92 – 2,11 mg·kg<sup>-1</sup>).

Nižší hodnoty biogenních aminů bylo možné očekávat, neboť mohou být důsledkem řady faktorů, které mohly snížit dekarboxylační aktivitu přítomných mikroorganismů (Buňková et al., 2010, s. 881; Dadáková, Křížek a Pelikánová, 2009, s. 366; Mayer, Fiechter a Fischer, 2010, s. 7955; Samková, Dádáková a Pelikánová, 20013, s. 310). Mezi takové faktory mající vliv může být nižší teplota skladování vzorků (4 – 8 °C). Současně nízké pH typické pro tvarohy mohlo do jisté míry ovlivnit produkci biogenních aminů (Komprda, 2004, s. 54; Santos, 1996, s. 214). Dalším faktorem byla i v porovnání s jinými druhy sýrů krátká doba skladování tvarohů (25 dnů) (Buňková et al., 2009, s. 534; 2011, s. 113; Fiechter, Sivec a Mayer, 2013, s. 191; Loizzo et al., 2013, s. 39; Pachlová et al., 2016, s. 2; Roginski, Fuquay a McSweeney, 2002, s. 841).

Tabulka 3 Hodnoty jednotlivých biogenních aminů ve fázových vzorcích v průběhu výroby a skladování vzorků tvarohů

Kód vzorku*	obsah biogenních aminů [mg·l <sup>-1</sup> nebo mg·kg <sup>-1</sup> ]									
	histamin	fenylethylami	tyramin	tryptamin	putrescin	kadaverin	spermidin	spermin		
1	ND	ND	0,15 ± 0,01	ND	0,42 ± 0,01	ND	0,11 ± 0,01	ND		
2	ND	ND	0,16 ± 0,01	ND	0,57 ± 0,02	ND	0,16 ± 0,01	ND		
3	ND	ND	0,17 ± 0,01	ND	0,67 ± 0,03	ND	0,17 ± 0,01	ND		
4A	ND	ND	0,27 ± 0,01	ND	0,85 ± 0,01	ND	0,17 ± 0,01	ND		
4B	ND	ND	0,30 ± 0,01	ND	0,85 ± 0,02	ND	0,17 ± 0,02	ND		
5A	ND	ND	0,56 ± 0,04	ND	1,39 ± 0,07	ND	0,22 ± 0,01	ND		
5B	ND	ND	0,65 ± 0,08	ND	1,31 ± 0,04	ND	0,24 ± 0,01	ND		
6A	ND	ND	1,63 ± 0,08	ND	1,52 ± 0,11	ND	0,25 ± 0,01	ND		
6B	ND	ND	1,66 ± 0,07	ND	1,64 ± 0,05	ND	0,28 ± 0,01	ND		
7A	ND	ND	2,56 ± 0,12	ND	1,36 ± 0,05	ND	0,32 ± 0,01	ND		
7B	ND	ND	2,33 ± 0,11	ND	1,42 ± 0,10	ND	0,34 ± 0,01	ND		
8A	ND	ND	7,60 ± 0,27	ND	1,92 ± 0,10	ND	0,36 ± 0,01	ND		
8B	ND	ND	8,25 ± 0,08	ND	2,11 ± 0,15	ND	0,39 ± 0,01	ND		

\* Kódování vzorků je uvedeno v Tabulce 2

ND – nedetekován během stanovení koncentrací biogenních aminů

Obecně lze konstatovat, že produkce biogenního aminu histaminu a spermidinu u sledovaných izolátů byla zaznamenána velmi zřídka. Histamin byl pouze u 1 ze všech sledovaných kmenů ve významném množství ( $> 100 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ) (identifikován jako *Leuconostoc mesenteroides*).

Přibližně 30 % kmenů produkovalo tryptamin výrazněji ( $10 - 50 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ). Zbylých 37 kmenů bylo vyhodnoceno jako tryptamin-negativní kmeny. Při posuzování dekarboxylázové aktivity pro syntézu sperminu bylo zjištěno, že všechny sledované kmeny vykazovaly pozitivní dekarboxylázovou aktivitu pro vznik sperminu. K největší produkci docházelo u 11 % kmenů ( $50 - 100 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ).

U 41 % (v případě putrescinu) a 58 % kmenů (u koncentrací kadaverinu) nebyla zaznamenána žádná produkce putrescinu a kadaverinu. U 1 izolátu byla detekována poměrně velká produkce kadaverinu, přičemž byla překročena několikanásobně hranice  $100 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  (kmen 3.7 izolován z pasterovaného mléka ve standardizačním tanku). Tento kmen byl identifikován jako *Bacillus licheniformis*.

Při posuzování schopnosti dekarboxylace za vzniku putrescinu bylo zjištěno, 31 % izolátů bylo schopno syntetizovat putrescin v množství pouze do  $10,0 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ . U 21 % izolátů (17 kmenů) byla poměrně vyšší putrescin-pozitivní dekarboxylázová aktivita (koncentrace putrescinu vyšší než  $100 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ).

Fenyletylamin byl detekován v 53 % dekarboxylačních médiích inokulovaných sledovanými kmeny. 13 kmenů produkovalo fenyletylamin v množstvím vyšší než  $100 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ .

Koncentrace tyraminu byly v porovnání s hodnotami sperminu významně vyšší. 60 % kmenů vykazovala značnou tyramin-pozitivní dekarboxylázovou aktivitu, protože detekované koncentrace tohoto biogenního aminu převyšovaly hranici  $200,0 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ . U některých izolátů byla dokonce detekována koncentrace tyraminu vyšší než  $1000,0 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ .

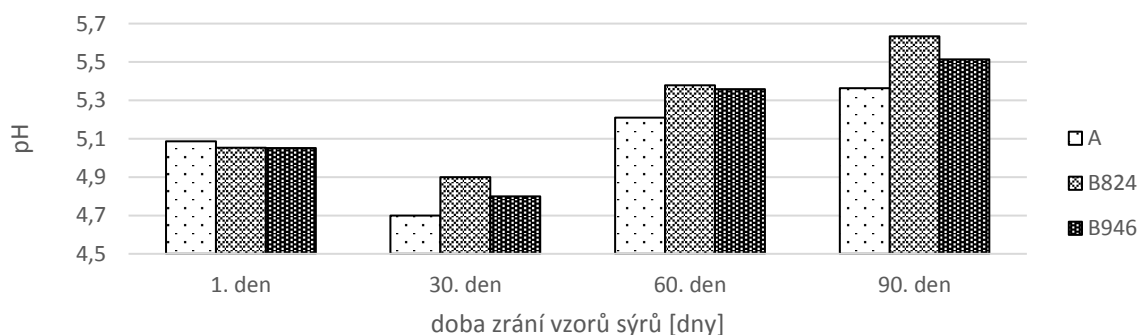
U všech kmenů, u nichž byla detekována schopnost produkce biogenního aminu kadaverinu, putrescinu, histaminu a tyraminu byly pomocí metody PCR amplifikovány produkty odpovídajících velikostí, které ukazují na přítomnost genů, který je kódován příslušný dekarboxylační enzym. V námi vybraných biogenních aminech jde o lyzin-dekarboxylázu, ornitin-dekarboxylázu, histidin-dekarboxylázu, tyrozin-dekarboxylázu (Buňková et al., 2011, 117; Burdychová a Komprda, 2007, s. 151; Ladero et al., 2012, s. 310).



## 6.2 Výsledky 2. experimentu

V rámci 2. experimentu byly porovnávány dekarboxylační aktivity dvou zákysových dekarboxyláza pozitivních bakterií rodu *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*. Kmeny byly obdrženy ze Sbírký mlékařských mikroorganismů Laktoflora – CCDM 824 (označení dále B<sub>824</sub>) a CCDM 946 (označení dále B<sub>946</sub>).

Během 90 dnů zrání všech vzorků sýrů nebyly zpozorovány mezi všemi vzorky žádné významné rozdíly v obsahu sušiny. Vývoj pH je znázorněn na Obr. 6. 30. den zrání sýrů byl u všech vzorků zpozorován mírný pokles hodnot pH, a s další dobou zrání hodnoty pH rostly u všech analyzovaných. Koncentrace NaCl byla stanovena 1. den 0,21 – 0,24 % (w/w) u všech analyzovaných vzorků A, B<sub>824</sub> a B<sub>946</sub>. Koncentrace NaCl byla nízká z důvodu, že vzorky byly odebrány po procesu prokysání, ale před samotným nasolením sýrů v solné lázni. Sýry byly soleny až po odběru vzorků sloužících pro analýzy. Od 30. dne byl obsah NaCl konstantní bez významných statistických rozdílů mezi jednotlivými vzorky.

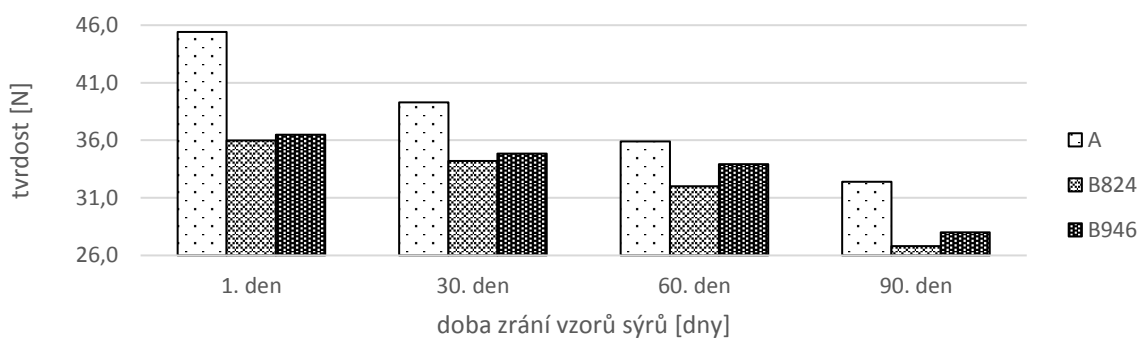


Obr. 6: Výsledky pH vzorků sýrů 2. experimentu (A bez přídavku sledovaného kmene, B<sub>824</sub> a B<sub>946</sub> s přídavkem dekarboxyláza pozitivních bakterií rodu *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 824 a CCDM 946).

Na základě výsledků analýzy základních parametrů lze konstatovat, že přídavek sledovaného kmene *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 824 a CCDM 946 v průběhu technologie výroby sýrů neměl žádný významný vliv na vybrané parametry (obsah sušiny, pH a obsah NaCl).

Vývoj tvrdosti všech sledovaných vzorků sýrů po celou dobu zrání a skladování znázorňuje Obr. 7. U kontrolních vzorků A byla ve všech odběrových dnech zpozorována vyšší tvrdost v porovnání s ostatními vzorky. Po celou dobu skladování byl u všech vzorků zpozorován klesající trend tvrdosti až do konce doby zrání. Konečné hodnoty tvrdosti byly  $32,4 \pm 0,6$  N pro kontrolní vzorky sýrů A,  $26,8 \pm 0,5$  N pro vzorky B<sub>824</sub> a  $28,0 \pm 0,8$  N u vzorku B<sub>946</sub> (inokulované kmenem *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 946).

Tento jev je dán tím, že během zrání sýrů dochází k řadě proteolytických reakcí bílkovin pomocí působení přítomné mikroflóry.



Obr. 7: Vývoj tvrdosti vzorků sýrů 2. experimentu v průběhu 90denního zrání (A bez přídavku sledovaného kmene, B<sub>824</sub> a B<sub>946</sub> s přídavkem dekarboxyláza pozitivních bakterií rodu *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 824 a CCDM 946).

Mikrobiologické analýze byly kromě vzorky laboratorně vyráběných sýrů podrobeny i vzorky zákysů. Bylo zjištěno, že v případě zákysů inokulovaných komerční mezofilní kulturou Laktoflora, Milcom, a.s. Česká republika, byly detekovány nižší počty mléčných koků ( $8,0 \pm 0,8 \log \text{KTJ} \cdot \text{ml}^{-1}$ ) ve srovnání se zákysy inokulovanými sledovanými dekarboxyláza pozitivními kmeny (pro B<sub>824</sub>  $8,2 \pm 0,4 \log \text{KTJ} \cdot \text{ml}^{-1}$  a pro B<sub>946</sub>  $8,4 \pm 0,7 \log \text{KTJ} \cdot \text{ml}^{-1}$ ).

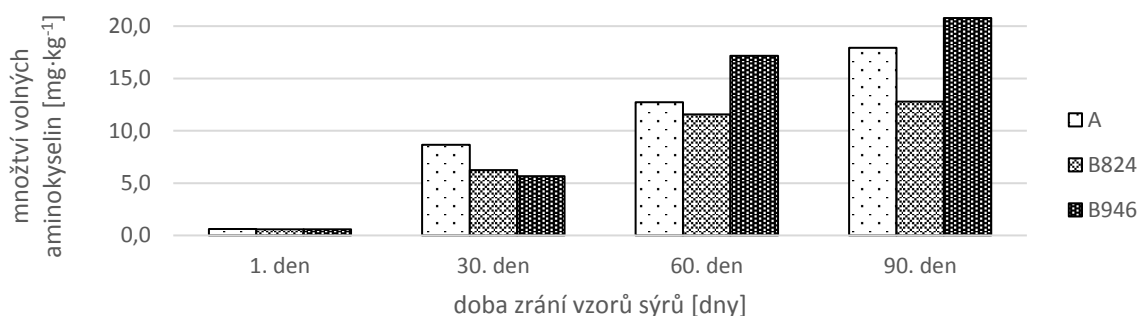
Celkový počet mikroorganismů u kontrolních vzorků A byl 1. den ode dne výroby nižší ( $8,0 \pm 0,9 \log \text{KTJ} \cdot \text{ml}^{-1}$ ) než u vzorků B<sub>824</sub> ( $8,4 \pm 0,7 \log \text{KTJ} \cdot \text{ml}^{-1}$ ) a B<sub>946</sub> ( $8,2 \pm 0,4 \log \text{KTJ} \cdot \text{ml}^{-1}$ ). Od 60. dne zrání kontrolních vzorků A byl zaznamenán klesající trend až do konce experimentu (90. dne), kde konečné hodnoty celkových počtů mikroorganismů byly  $7,3 \pm 0,5 \log \text{KTJ} \cdot \text{ml}^{-1}$ .

Obdobný klesající trend byl zaznamenán i u počtů mléčných koků u všech sledovaných vzorků. Konečné hodnoty se pohybovaly  $5,7 - 7,0 \log \text{KTJ} \cdot \text{ml}^{-1}$ . Současně bylo zpozorováno, že nejnižší počty mléčných koků se vyskytovaly u kontrolních vzorků sýrů A.

V průběhu zrání sýrů docházelo k pozvolnému nárůstu počtů laktobacilů u všech vzorků až do 90. dne. Poněkud mírně nižší počty laktobacilů byly detekovány u kontrolních vzorků sýrů A v porovnání se vzorky inokulované sledovaným mikroorganizmem (vzorky B<sub>824</sub> a B<sub>946</sub>).

Počty enterobakterií klesaly u všech vzorků modelových sýrů po celou dobu experimentu. Počty enterobakterií během 90 dnů zrání klesly téměř na polovinu původního počtu ( $2,3 - 2,7 \log \text{KTJ} \cdot \text{ml}^{-1}$ ). U skupiny enterokoků byly hodnoty po celou dobu zrání sýrů téměř konstantní a rovněž jako u předchozí skupiny nebyly zpozorovány žádné významné rozdíly mezi vzorky A, B<sub>824</sub> a B<sub>946</sub>.

Vývoj celkového obsahu všech sledovaných volných aminokyselin v průběhu zrání modelových vzorků sýrů je znázorněn na Obr. 8.



Obr. 8: Vývoj celkového obsahu volných aminokyselin v průběhu 90denního zrání (A bez přídavku sledovaného kmene, B<sub>824</sub> a B<sub>946</sub> s přídavkem dekarboxyláza pozitivních bakterií rodu *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 824 a CCDM 946).

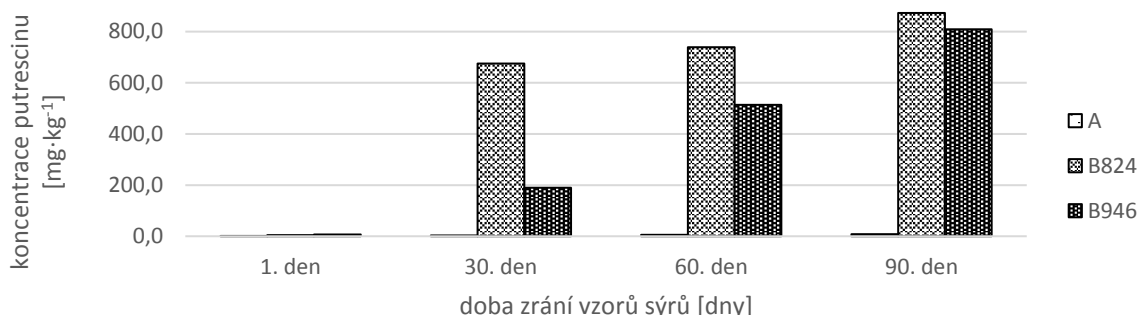
U všech analyzovaných vzorků byl zaznamenán téměř lineární nárůst koncentrace volných aminokyselin až do konce doby zrání (90. den). V průběhu 30 dnů ode dne výroby došlo k významnému navýšení obsahu volných aminokyselin, přičemž vyšší obsahy byly zaznamenány u kontrolních vzorků sýrů A ( $8,65 \pm 0,04 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) ve srovnání se vzorky B<sub>824</sub> a B<sub>946</sub> ( $6,25$  a  $5,68 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ).

Ze všech 30 sledovaných volných aminokyselin dosáhl leucin nejvyšších koncentrací u analyzovaných vzorků. V průběhu experimentu byl zaznamenán rostoucí trend koncentrace leucinu a jeho nejvyšší koncentrace byly detekovány ve vzorku B<sub>946</sub> ( $3,21 \pm 0,13 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ).

Sledováním obsahu argininu bylo zjištěno, že k jeho nárůstu došlo zejména v prvních 30 dnech zrání sýrů. Na konci doby zrání sýrů (90. den) byly obdrženy rozdílné výsledky obsahu argininu, přičemž nejvyšších hodnot bylo dosaženo ve vzorku A ( $0,51 \pm 0,01 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) a naopak nejnižší koncentrace byly detekovány u vzorky B<sub>824</sub>. Kolísavé koncentrace byly detekovány při stanovení obsahu ornitinu. 1. den bylo jeho množství ve všech vzorcích zanedbatelné. 90. den zrání sýrů u vzorků B<sub>946</sub> a A byl zaznamenán nárůst ( $0,18 \pm 0,01$  a  $0,69 \pm 0,01 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ). Stejně jako u předchozích vybraných volných aminokyselin u vzorku A rostla koncentrace tyrozinu v průběhu skladování vzorků a konečné hodnoty se blížily k hodnotě  $0,40 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ . Oproti tomu obsah tyrozinu v obou inokulovaných vzorcích (B<sub>824</sub> a B<sub>946</sub>) byl v zanedbatelném množství.

U bujónu obsahující kmen *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 824 byla koncentrace biogenních aminů  $1517,8 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ , u kmene *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 946 byly  $1138,2 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ . Bylo upozorováno, že u obou bujónů byl v nejvyšší míře obsažen tyramin. Provozní zákys inokulován pouze komerční kulturou obsahoval biogenní aminy v zanedbatelném množství. Oproti tomu zákysy připravené smícháním sterilovaného mléka a přídavkem kmenů *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 824 a CCDM 946 obsahovaly značně vyšší koncentrace biogenních aminů ( $165,5 \pm 0,3 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  a  $150,5 \pm 0,6 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ).

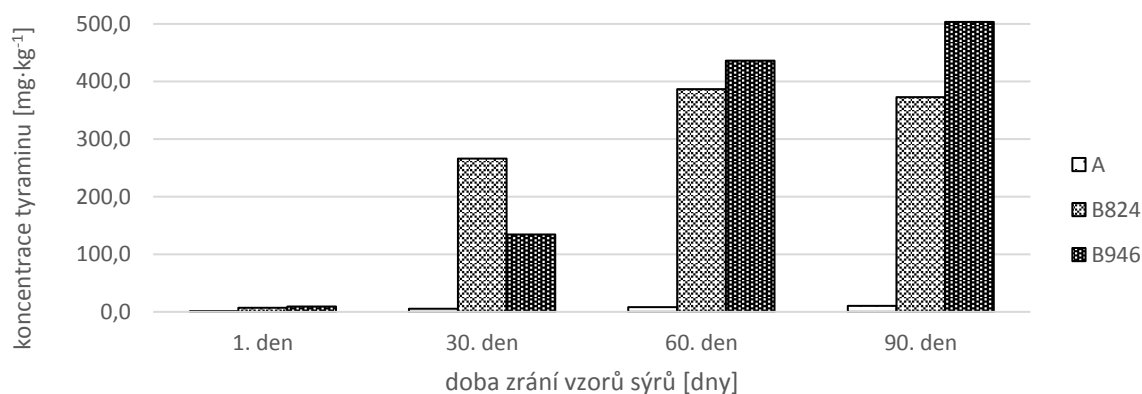
Nejvíce zastoupeným biogenními aminy u vzorků B<sub>824</sub> a B<sub>946</sub> byl putrescin a tyramin (Obr. 9 a 10).



Obr. 9: Vývoj koncentrace biogenního aminu putrescinu v průběhu 90denního zrání (A bez přidavku sledovaného kmene, B<sub>824</sub> a B<sub>946</sub> s přidavkem dekarboxyláza pozitivních bakterií rodu *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 824 a CCDM 946).

Obsah tyraminu a putrescinu u A vzorků byl po celou dobu zrání sýrů nevýznamný (< 10 mg·kg<sup>-1</sup>). V případě koncentrací putrescinu byl jejich vývoj mezi vzorky B<sub>824</sub> a B<sub>946</sub> zcela odlišný, nicméně po celou dobu zrání sýrů byl zaznamenán rostoucí trend.

Při porovnání koncentrací tyraminu ve vzorcích B<sub>824</sub> a B<sub>946</sub> bylo zjištěno, že již během 30 dnů byla u obou vzorků překročena hranice 100,0 mg·kg<sup>-1</sup>, u vzorku B<sub>824</sub> koncentrace tyraminu dosahovaly dokonce hodnoty 266,3 ± 0,5 mg·kg<sup>-1</sup>.



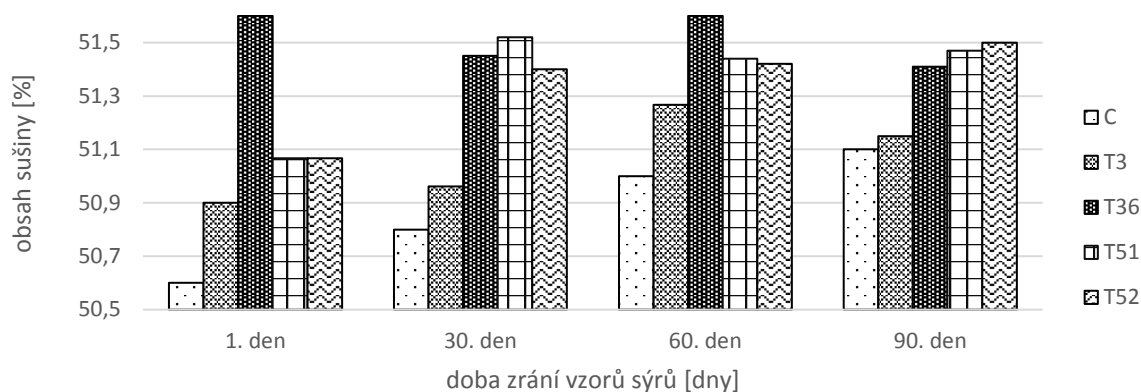
Obr. 10: Vývoj koncentrace biogenního aminu tyraminu v průběhu 90denního zrání (A bez přidavku sledovaného kmene, B<sub>824</sub> a B<sub>946</sub> s přidavkem dekarboxyláza pozitivních bakterií rodu *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 824 a CCDM 946).

Námi detekovaná koncentrace jak tyraminu, tak i putrescinu ve vzorcích B<sub>824</sub> a B<sub>946</sub> mohou být z toxikologického hlediska rizikové. Hodnoty obsahu tyraminu v od 30. dne atakovaly hranici 125,0 mg·kg<sup>-1</sup>, v některých případech ji dokonce několikanásobně překročily.

### 6.3 Výsledky 3. experimentu

Během 3. experimentu byla pozorována schopnost produkovat BA u vybraných mikroorganismů kmene *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* (DEPE T3 – označeno dále jako T<sub>3</sub> a DEPE T36 – označeno dále jako T<sub>36</sub>) a kmene *Lactobacillus paracasei* (DEPE T51 – označeno T<sub>51</sub> a DEPE T52 – označeno T<sub>52</sub>).

Z výsledků vyplývá, že po celou dobu zrání sýrů byly hodnoty sušiny  $51,0 \pm 0,5$  % (w/w) bez rozdílu mezi jednotlivými vzorky inokulovanými sledovanými kmeny a kontrolním vzorkem (Obr. 11).



Obr. 11: Výsledky obsahu sušiny 3. experimentu kontrolních vzorků C a vzorků s přidavkem dekarboxyláza pozitivních bakterií rodu *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* DEPE T3 a DEPE T36 a *Lactobacillus paracasei* DEPE T51 a DEPE T52.

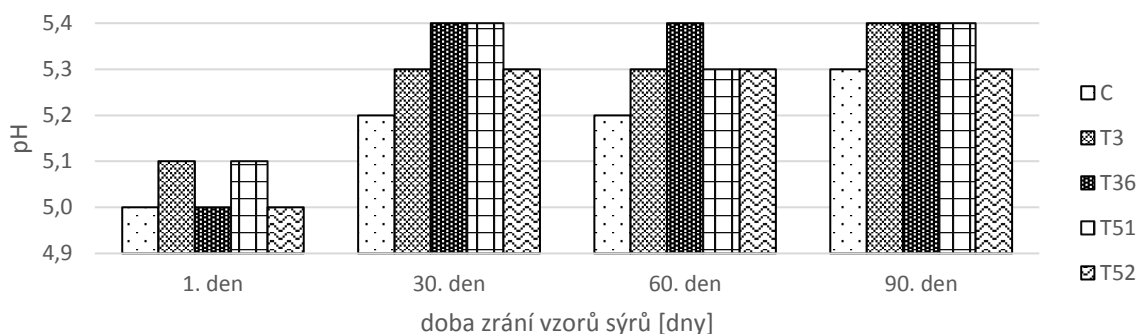
U hodnot pH byl zaznamenán nárůst hodnot zejména v období prvních 30 dnů zrání a do konce doby zrání hodnoty zůstaly neměnné (Obr. 12).

1. den byl obsah NaCl  $0,21 \pm 0,03$  % (w/w). Od 30. dne se hodnoty NaCl sýrů pohybovaly v rozmezí 1,9 – 2,1 % (w/w). Nízký obsah NaCl na počátku zrání je z důvodu toho, že analýza byla provedena před samotným solením modelových vzorků sýrů ponořením v solné lázni.

Z naměřených výsledků lze usoudit, že přidavek kmenů do jednotlivých modelových vzorků sýrů neměl žádný významný vliv na obsah sušiny, pH a obsah NaCl.

Bylo zjištěno, že počty laktobacilů byly vyšší ve všech zákysech inokulovaných sledovanými nezákazovými bakteriemi než u zákysu C vzorků. Naopak v případě počtu koků byly detekovány vyšší koncentrace u zákysu připraveného pro kontrolní výrobu C ( $8,3 \pm 0,3$  log KTJ·ml<sup>-1</sup>) v porovnání s modelovými vzorky sýrů inokulované sledovanými kmeny ( $7,2 \pm 0,2$  log KTJ·ml<sup>-1</sup>).

Během 30 dnů zrání modelových vzorků sýrů nebyly zaznamenány žádné významné rozdíly mezi jednotlivými vzorky u celkových počtů mikroorganismů. Od 60 dne byl zpozorován klesající trend, přičemž konečné hodnoty byly 5,23 – 7,28 log KTJ·g<sup>-1</sup> (nejvyšší celkové počty mikroorganismů u vzorků C).



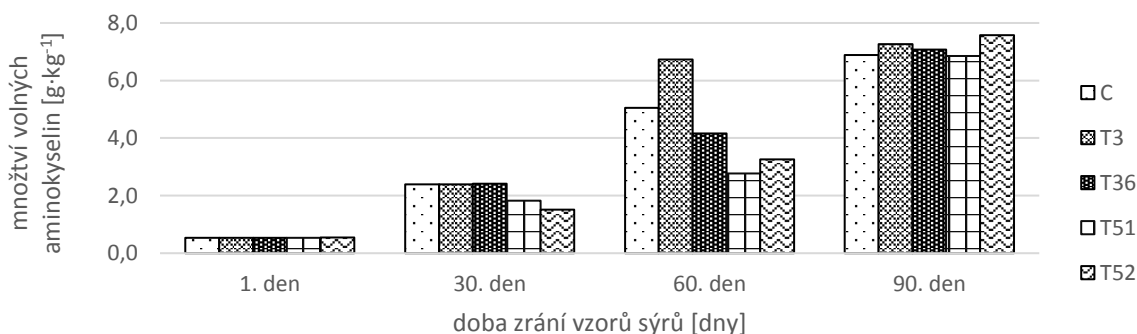
Obr. 12: Výsledky pH vzorků sýrů 3. experimentu kontrolních vzorků C a vzorků s přidavkem dekarboxyláza pozitivních bakterií rodu *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* DEPE T3 a DEPE T36 a *Lactobacillus paracasei* DEPE T51 a DEPE T52.

V případě počtu mléčných koků byl zaznamenán obdobný trend jako u CPM. Nejvyšší počty byly detekovány u C vzorků a do konce doby zrání sýrů jejich počty klesaly ( $5,80 \pm 0,26 \log \text{KTJ} \cdot \text{g}^{-1}$ ). V případě vzorků inokulovaných nezákysovémi bakteriemi byly hodnoty srovnatelné. Od 60. dne docházelo k pozvolnému poklesu jejich počtů až na hodnoty  $6,06 - 6,96 \log \text{KTJ} \cdot \text{g}^{-1}$ .

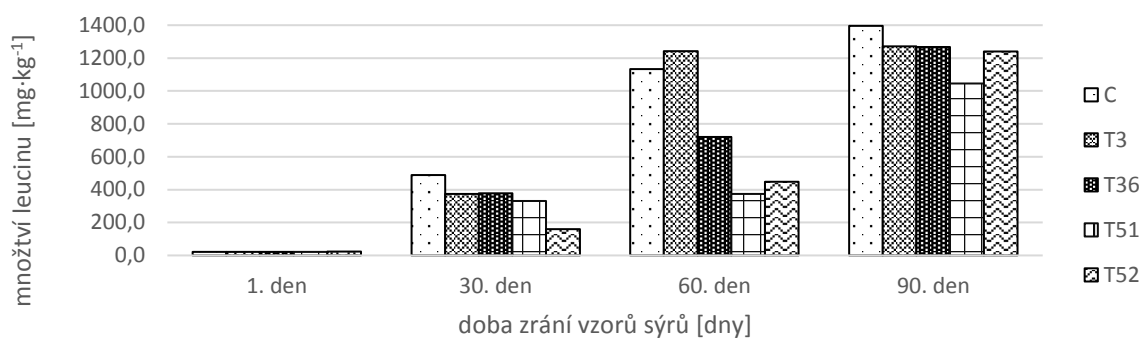
Počty laktobacilů se zvyšovaly v průběhu zrání sýrů. Rovněž bylo zjištěno, že nižší počty laktobacilů byly u kontrolních vzorků ( $5,80 \pm 0,26 \log \text{KTJ} \cdot \text{g}^{-1}$ ). 90. den ode dne výroby počty laktobacilů byly  $7,49 - 7,89 \log \text{KTJ} \cdot \text{g}^{-1}$ .

Enterokoky v průběhu zrání kolísaly a na konci doby zrání byly detekovány obdobné hodnoty ( $4,57 - 5,72 \log \text{KTJ} \cdot \text{g}^{-1}$ ) jako počty detekované první den zrání modelových vzorků sýrů. V případě enterobakterií počty po celou dobu zrání klesaly bez rozdílů mezi všemi analyzovanými vzorky ( $2,26 - 3,48 \log \text{KTJ} \cdot \text{g}^{-1}$ ).

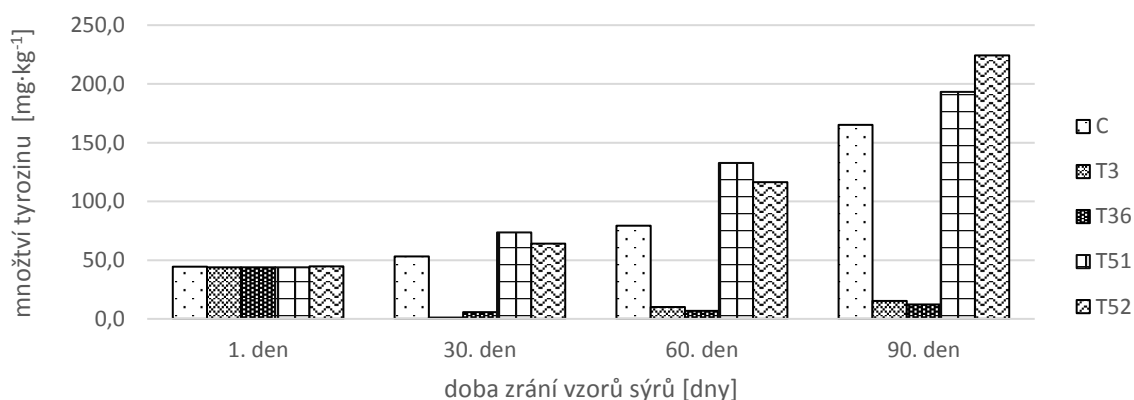
Celkový obsah aminokyselin a jeho změny v průběhu zrání jednotlivých modelových vzorků sýrů je znázorněn na Obr. 13. První den zrání sýrů byly celkové obsahy aminokyselin téměř identické ( $5,45 \pm 0,05 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ).



Obr. 13: Vývoj celkového obsahu volných aminokyselin 3. experimentu vzorků C a vzorků s přidavkem nezákysové bakterií rodu *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* DEPE T3 a DEPE T36 a *Lactobacillus paracasei* DEPE T51 a DEPE T52



Obr. 14: Vývoj obsahu leucinu v 3. experimentu vzorků C a vzorků s přidavkem nezákysových bakterií rodu *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* DEPE T3 a DEPE T36 a *Lactobacillus paracasei* DEPE T51 a DEPE T52



Obr. 15: Vývoj obsahu tyrozinu v 3. experimentu kontrolních vzorků C a vzorků s přidavkem dekarboxyláza pozitivních bakterií rodu *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* DEPE T3 a DEPE T36 a *Lactobacillus paracasei* DEPE T51 a DEPE T52

60. den zrání vzorků byl zaznamenán významný nárůst celkového obsahu volných aminokyselin zejména u vzorků T<sub>3</sub>, zatímco u ostatních vzorků došlo k významnému nárůstu hodnot od 60. do 90. dne zrání modelových vzorků sýrů.

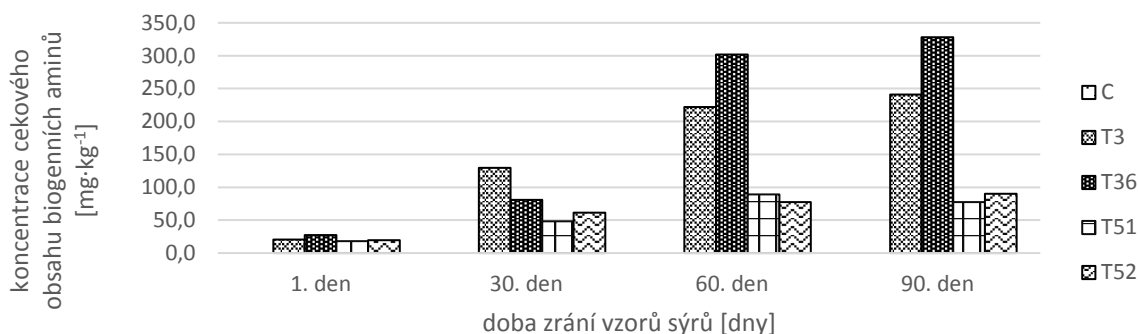
Po celou dobu zrání byl u leucinu zaznamenán rostoucí trend ve všech vzorcích (Obr. 14). Na počátku zrání sýrů byly hodnoty leucinu bez významných rozdílů mezi jednotlivými vzorky. Nejvyšší koncentrace leucinu na konci doby zrání byly detekovány u kontrolních vzorků sýrů ( $1396,4 \pm 63,9 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ).

Obsah tyrozinu (Obr. 15) na konci doby zrání sýrů T51 a T52 se pohyboval v rozmezí  $165,2 - 224,3 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ . U vzorků T3 a T36 byl 30. den zaznamenán významný pokles koncentrace tyrozinu.

Mléko před prokysáním, které bylo inokulováno komerční kyselou kulturou obsahovalo pouze  $2,5 \pm \text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ). Provozní zákysy inokulované sledovanými kmeny obsahovaly biogenní aminy ve výši  $99,68 \pm 3,9 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  (T<sub>3</sub>),  $86,2 \pm 3,3 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  (T<sub>36</sub>),  $14,66 \pm 0,6 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  (T<sub>51</sub>) a  $14,97 \pm 0,7 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  (T<sub>52</sub>).

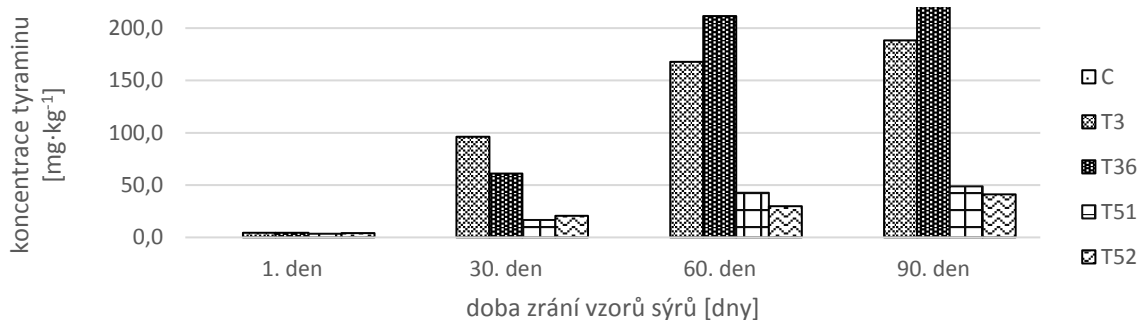
Obr. 16 znázorňuje vývoj celkového obsahu biogenních aminů v průběhu zrání všech modelových vzorků sýrů. U kontrolních vzorků C nebyly po celou dobu zrání sýrů detekovány žádné obsahy biogenních aminů.

U všech vzorků inokulovaných nezákysovými kmeny byl zpozorován rostoucí trend celkového obsahu BA. Rovněž bylo zpozorováno, že nejvyšší dekarboxylázová aktivita byla prokázána u vzorků inokulovaných kmenem *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* DEPE T36.



Obr. 16: Vývoj celkového obsahu biogenních aminů v 3. experimentu kontrolních vzorků C a vzorků s přidavkem dekarboxyláza pozitivních bakterií rodu *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* DEPE T3 a DEPE T36 a *Lactobacillus paracasei* DEPE T51 a DEPE T52

U 4 sledovaných kmenů byly počáteční koncentrace tyraminu nízké ( $3,5 - 4,5 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ). Do konce zrání došlo k největšímu růstu obsahu tyraminu zejména v případě vzorků T<sub>36</sub>, kde konečné koncentrace dosáhly hodnoty  $222,1 \pm 10,8 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ . Produkce tyraminu byla zaznamenána i u druhého kmene *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* (DEPE T3).



Obr. 17: Vývoj obsahu biogenního aminu tyraminu v 3. experimentu kontrolních vzorků C a vzorků s přidavkem dekarboxyláza pozitivních bakterií rodu *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* DEPE T3 a DEPE T36 a *Lactobacillus paracasei* DEPE T51 a DEPE T52

Lze konstatovat, že tyramin-pozitivní dekarboxylázová aktivita ve srovnání kmenů *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* DEPE T3 a DEPE T36 je vyšší u *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* DEPE T36, zatímco dekarboxylázová aktivita mezi kmeny *Lactobacillus paracasei* DEPE T51 a DEPE T52 je srovnatelná.



## 7. PŘÍNOS PRÁCE PRO VĚDU A PRAXI

Z provedené literární rešerše, a především ze získaných výsledků, lze vysledovat následující přínosy pro vědní obor:

- byla stanovena dekarboxylázová aktivita početných kmenů, které se v různých fázích výroby a skladování nachází v tvarozích, což je informace, která nebyla v literatuře dostupná;
- byl popsán vývoj obsahu biogenních aminů dekarboxyláza pozitivními kmeny vybraných zákysových a nezákysových bakterií mléčného kvašení v reálných podmínkách přírodních sýrů;
- bylo zjištěno, že některé zákysové bakterie (*Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 824 a *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 946) významným způsobem produkují biogenní aminy ve zrajících přírodních sýrech;
- bylo zjištěno, že rovněž vybrané nezákysové bakterie mléčného kvašení (*Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* DEPE T3, *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* DEPE T36, *Lactobacillus paracasei* DEPE T51 a *Lactobacillus paracasei* DEPE T52) významnou měrou přispívají k výskytu biogenních aminů v reálných systémech přírodních sýrů;
- v reálném komplexním systému přírodních sýrů byl srovnán vývoj obsahu biogenních aminů výše uvedenými zákysovými i nezákysovými bakteriemi mléčného kvašení.

Z provedené literární rešerše, a především ze získaných výsledků, lze vysledovat následující přínosy pro praxi:

- v tvarozích samotných se sice nacházely malé koncentrace biogenních aminů, ale přítomná mikroflóra má velký potenciál produkovat biogenní aminy. Toto je zásadní pro zdravotní nezávadnost produktů, kam se tvaroh využívá jako surovina, a evokuje to potřebu preventivně sledovat tyto procesy v praxi;
- bylo zjištěno, že v praxi využívané zákysové kultury mohou významně produkovat biogenní aminy. Tímto zjištěním lze opět podpořit potřebu aktivního sledování dekarboxylázové aktivity mikroorganismů, které se do potravin z technologických důvodů přidávají;
- výrobním podnikům lze rovněž doporučit, aby sledovaly obsahy biogenních aminů ve svých produktech;
- zachycené kmeny nezákysových bakterií (pokud podniky taková sledování provádí) by měly být mimo jiné vyšetřovány na dekarboxylázovou aktivitu, aby mohl být odhadnut jejich příspěvek k obsahu biogenních aminů konkrétního výrobku u konkrétního producenta.

## 8. ZÁVĚR

Přírodní sýry patří mezi fermentované potraviny, které mohou zrát od několika dnů po několik měsíců, v některých případech i let. Sýry představují komplexní systém, v němž díky zrání dochází k řadě biochemickým reakcím. V průběhu těchto reakcí dochází k formování finální textury sýrů, které je pro danou skupinu typická. Při složitých biochemických reakcích dochází ke vzniku velkého množství sensoricky aktivních látek, které se následně podílejí na finální chuti a vůni sýra. Tyto biochemické reakce jsou důsledkem přítomnosti zákysových a nezákysových mikroorganismů v sýrech. Zákysové bakterie jsou ty, které se přidávají v průběhu technologie výroby sýrů, zatímco nezákysové bakterie se do sýrů dostaly v průběhu technologického procesu, ale významnou měrou se podílí na biochemických procesech v průběhu zrání sýrů a na charakteristických vlastnostech daného sýra. U těchto bakterií (ať už zákysových nebo nezákysových) může být ve vyšší míře pozorovaná pozitivní dekarboxylázová aktivita a ve finálních výrobcích, sýrech, může být kumulován vysoký obsah biogenních aminů. Značné koncentrace biogenních aminů mohou být nositelem rizika vzniku otrav a nežádoucích vlivů na lidský organizmus.

Na základě výsledků experimentální části této dizertační práce lze učinit následující závěry:

- tvarohy (v jednotlivých fázích výroby i u finálních produktů) vytváří prostředí pro výskyt dekarboxyláza pozitivních mikroorganismů;
- nejvíce produkovaným biogenním aminem u kmenů izolovaných ze vzorků tvarohů byl tyramin. K jeho produkci docházelo u 42 % všech izolovaných kmenů;
- tyramin-pozitivní dekarboxylázová aktivita v podmínkách *in vitro* byla zpozorována u kmenů *Enterococcus faecalis*, *Serratia fonticola*, *Bacillus licheniformis*, *Pseudomonas jessenii*, ale také u bakterií rodu *Lactococcus*;
- u 19 kmenů z celkem 79 izolovaných (v rámci jednotlivých fází výrobního procesu i u finálních produktů) byla zjištěna také značná produkce putrescinu a kadaverinu. K významným producentům výše uvedených biogenních aminů patří například kmeny *Bacillus licheniformis*, *Pseudomonas jessenii*, *Acinetobacter johnsonii*, *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus plantarum*, *Enterobacter cloacae*, *Lactobacillus paracasei* a *Lactococcus lactis*);
- na základě předchozích studií bylo selektováno 6 kmenů (*Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 824 a *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 946, *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* DEPE T3 a DEPE T36, *Lactobacillus paracasei* DEPE T51 a DEPE T52) zákysových i nezákysových bakterií mléčného kvašení, které jsou dekarboxyláza pozitivní. S těmito kmeny byly realizovány výroby modelových vzorků přírodních sýrů holandského typu;

- v kontrolních vzorcích (bez přídavku dekarboxyláza pozitivních mikroorganismů) byly detekovány v průběhu 90denního zrání při teplotě  $10 \pm 1$  °C zanedbatelná množství biogenních aminů;
- v modelových vzorcích přírodních sýrů holandského typu dekarboxylovaly zákysové bakterie mléčného kvašení (konkrétně dekarboxyláza pozitivní kmeny *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 824 a *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 946) volné aminokyseliny za vzniku významných koncentrací biogenních aminů (zejména tyramin a putrescin), a to v průběhu 90denního zrání při teplotě  $10 \pm 1$  °C;
- byla prokázána vyšší tyramin-dekarboxylázová aktivita u *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 946 než u kmene *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 824 za stejných podmínek;
- rovněž sledované nezákysové bakterie mléčného kvašení (konkrétně dekarboxyláza pozitivní kmeny *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* DEPE T3 a DEPE T36, *Lactobacillus paracasei* DEPE T51 a DEPE T52) produkovaly v reálných vzorcích přírodních sýrů významná množství biogenních aminů v průběhu 90denního zrání při teplotě  $10 \pm 1$  °C;
- nezákysové bakterie mléčného kvašení (vybrané dekarboxyláza pozitivní kmeny *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* DEPE T3 a DEPE T36, *Lactobacillus paracasei* DEPE T51 a DEPE T52) dekarboxylovaly volné aminokyseliny za vzniku významně vysokých koncentrací biogenních aminů v průběhu celého 90denního zrání sýrů (dekarboxylace především tyraminu);
- vyšší tyramin-dekarboxylázová aktivita za stejných podmínek byla prokázána u dvou bakterií rodu *Lactobacillus paracasei* DEPE T51 a DEPE T52 než u bakterií rodu *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* DEPE T3 a DEPE T36.

Z výše uvedeného plyne jednoznačný význam sledování obsahu biogenních aminů v přírodních sýrech i u bakterií, které se do sýrů přidávají prostřednictvím čistých mlékařských kultur. Zjištění obsahů biogenních aminů u konkrétního výrobce a identifikace původce pak může přispět k redukci těchto látek ve finálních produktech a v konečném důsledku ke zvýšení bezpečnosti přírodních sýrů.

## **9. SUMMARY**

### **9.1 Current state of solved issues**

Cheeses have their characteristic organoleptic properties (especially taste and flavor), which are the result of biochemical reactions series, because they produce significant sensory substances (Calzada et al., 2013, pp. 4817; El-Zahar, El-Zager and Ramadan, 2014, pp. 73; Fox et al., 2000, pp. 12-15, 2004, pp. 103-140, Roginski, Fuquay and McSweeney, 2002, p. 795). These biochemical reactions ongoing since the first hours of cheeses production (most of these reactions takes a place during the pressing and salting of cheeses), but the most of biochemical changes occur only during maturation of cheeses. During the maturation of the cheeses, inter alia, biogenic amines can be formed at significantly high concentrations (Church, McCance & Widdowson, 2002, p. 110, Fox et al., 2000, p. 15, McSweeney 2004, p. 128, Roginski, Fuquay and McSweeney, 2002, p. 799).

Biogenic amines (BA) are low molecular weight nitrogen compounds that are produced by decarboxylation of the relevant amino acids by the action of microorganisms (MO) with positive decarboxylase activity. The occurrence of BA in low concentrations is natural in all animals, plants, and microorganisms, where it fulfills a number of important physiological functions (Brown, Stevens and Haas, 2001, p. 638, Buňková et al., 2013, 548; Dadáková, Křížek a Pelikánová, 2009, p. 365; El-Zahar, El-Zager and Ramadan, 2014, p. 74; Önal, 2007, p. 1475). On the other hand, the consumption of higher amounts of BA can have a significant negative effect on the organism (Buňková et al., 2009, pp. 534, 2010, p.880, El-Zahar, El-Zager and Ramadan, Sivec and Mayer, 2013, p. 191; Innocente et al., 2007, pp. 1285; Li et al., 2014, pp. 355).

### **9.2 Aims of the thesis**

The aim of this dissertation thesis was to monitor the decarboxylase activity of selected strains of microorganisms in the real model samples system of cheeses. By means of HPLC usage, the formation and final concentration of eight biogenic amines (tryptamine, phenylethylamine, putrescine, cadaverine, histamine, tyramine, spermidine and spermine) were observed during the maturation of natural cheeses. In order to achieve the basic aim of the dissertation thesis was to fulfill the following partial goals:

- monitoring of biogenic amines content in curds at different stages of the production process;
- detection of biogenic amine production capability by microorganisms gained from natural cheeses;
- based on the previous aims, select the production strains of micro-organisms, both the lactic acid fermentation and non-lactic acid bacteria;

- production of model samples of natural cheeses with addition of starter bacteria with the decarboxylase positive activity and monitoring the development of biogenic amine concentration during maturing of cheeses;
- the production of laboratory samples of Dutch-type cheeses with the addition of nonstarter decarboxylase bacteria by positive activity and monitoring the development of biogenic amine concentration during maturing of cheeses;
- studying the development of other parameters of decarboxylase-positive cheeses model samples of compared to control samples of cheeses (cheeses without added decarboxylase of the positive strain), textural profile analysis, microbiological analysis, pH and parameters of basic sensory analysis (dry matter, NaCl content);
- results evaluation and formulation of conclusions.

### 9.3 Experimental part

To meet these goals, dissertation thesis was divided into 3 experiments parts. The aim of the first part was to monitor the development of the biogenic amine content of curds. The curds samples were taken at different stages of production and storage technology. Decarboxylase activity was evaluated for microorganisms isolated from these samples. However, the isolation and identification of micro-organisms was not the subject of this thesis. Isolated microorganisms were delivered by a cooperating working place. Apart from mentioned isolates, two collections of isolates commonly found in natural cheeses were used to test decarboxylase activity. Decarboxylase activity was evaluated by cultivation of samples in modified broths, which constituted optimal conditions for the growth of microorganisms, so by this they promoted their ability to produce biogenic amines.

Model samples of cheeses were inoculated with selected strains of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 824 (cheese labeled B824) and CCDM 946 (cheeses labeled B946). For these model cheese samples, the ability to produce biogenic amines for 90 days aging at  $10 \pm 1$  ° C was monitored. The measured results were monitored with the samples of the cheeses that were produced

The aim of the third experiment part was to monitor the production of biogenic amines of nonstarter bacteria in a real Dutch-type cheese sample system that was selected on the basis of the monitoring of decarboxylase activity in the first experiment. To meet the objective of the third experiment part, natural cheeses were produced that were individually inoculated with *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* DEPE T3 (cheeses labeled T<sub>3</sub>), *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* DEPE T36 (cheeses with the label T<sub>36</sub>), *Lactobacillus paracasei* DEPE T52 (cheeses with the label T<sub>52</sub>) and *Lactobacillus paracasei* DEPE T51 (cheeses with the label T<sub>51</sub>) (Figure 16). The control samples of the cheeses produced for this experiment were labeled as samples C.

## 9.4 Contribution to the science and practice

From the literary research carried out and, above all, from the results obtained from experimental part, the following benefits can be pointed to the scientific area:

- the decarboxylase activity of numerous strains, which are found in various curds during their production and storage was defined; this information was not available before;
- the development of the biogenic amine decarboxylase contents of the positive strains of selected starter and nonstarter lactic acid bacteria in the real conditions of natural cheeses has been described;
- it was found that some bacteria (*Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 824 and *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 946) significantly produce biogenic amines in ripening natural cheeses;
- also it was found selected nonstarter bacteria (*Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* DEPE T3, *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* DEPE T36, *Lactobacillus paracasei* DEPE T51 a *Lactobacillus paracasei* DEPE T52) play significant role to the occurrence of biogenic amines in real systems of natural cheeses;
- in a real complex system of natural cheeses, the development of the biogenic amine contents by the above-mentioned starter and nonstarter bacteria of lactic fermentation was compared.

From the literary research carried out, and above all from the results obtained, the following benefits can demonstrate some advantages for practice:

- although small concentrations of biogenic amines were found in the curd themselves, the present microflora has a great potential to produce biogenic amines. This is essential for health of the products where curd is used as a raw material, and evokes the need to prevent these processes being monitored in practice;
- it has been found that in practice starter cultures can significantly produce biogenic amines. This finding can again support the need for active monitoring of the decarboxylase activity of micro-organisms added to food for technological reasons;
- manufacturing companies may also be recommended to monitor the contents of biogenic amines in their products;
- captured strains of nonstarter bacteria (if such monitoring is carried out during production process) should, inter alia, be investigated for decarboxylase activity in order to estimate their contribution to the biogenic amine content of the particular product for the particular producer.

## 9.5 Results

Based on the results of the experimental part of this dissertation, the following conclusions can be presented:

- curds (in the production and final stages of production) create an environment for the presence of decarboxylase of positive microorganisms;
- tyramine was the most produced biogenic amine in strains isolated from curd samples. Its production occurred in 42% of all isolated strains;
- tyramine-positive decarboxylase activity under *in vitro* conditions has been observed in *Enterococcus faecalis*, *Serratia fonticola*, *Bacillus licheniformis*, *Pseudomonas jessenii*, and also in *Lactococcus*;
- 19 strains out of a total of 79 isolates (both in the production and final stages of the production process) also found significant production of putrescine and cadaverine was observed. Significant producers of the above-mentioned biogenic amines include, for example *Bacillus licheniformis*, *Pseudomonas jessenias*, *Acinetobacter johnsonii*, *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus plantarum*, *Enterobacter cloacae*, *Lactobacillus paracasei* and *Lactococcus lactis*);
- 6 strains based on previous study were selected (*Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 824 and *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 946, *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* DEPE T3 and DEPE T36, *Lactobacillus paracasei* DEPE T51 and DEPE T52) of starter and nonstarter bacteria fermentation that is decarboxylase positive. With these strains, production of model samples of Dutch-style natural cheeses was carried out;
- negligible quantities of biogenic amines were detected in the control samples (without the addition of decarboxylase of positive micro-organisms) during the 90-day maturation at  $10 \pm 1$  ° C;
- free amino acids have been decarboxylated by lactic acid bacteria in the model samples of Dutch-style natural cheeses (in particular the decarboxylase positive strains of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 824 and *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 946) to form significant concentrations of biogenic amines (especially tyramine and putrescin); during a 90-day maturation at a temperature of  $10 \pm 1$  ° C;
- higher tyramine decarboxylase activity was demonstrated in *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 946 than in the *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 824 under the same conditions;
- also monitored nonstarter bacteria of lactic fermentation (i.e. decarboxylase activity of positive strains *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* DEPE T3 and DEPE T36, *Lactobacillus paracasei* DEPE T51 and DEPE T52) have also produced significant amounts of biogenic amines in the course of 90-day maturation at temperatures in real samples of natural cheeses  $10 \pm 1$  ° C;
- nonstarter lactic acid bacteria (selected decarboxylase positive strains *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* DEPE T3 and DEPE T36, *Lactobacillus paracasei* DEPE T51 and DEPE T52) decarboxylated free amino

acids to produce significantly high concentrations of biogenic amines throughout the 90-day maturation of cheeses (decarboxylation of tyramine in particular);

- higher tyramine decarboxylase activity under the same conditions was demonstrated in two *Lactobacillus paracasei* genes DEPE T51 and DEPE T52 than in bacteria of the genus *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* DEPE T3 and DEPE T36.

From the above, there is definitely importance of monitoring the content of biogenic amines in natural cheeses as well as in bacteria that are added to the cheeses through pure milk cultures. Determination of the biogenic amines content of a particular manufacturer and identification of the agent can then contribute to the reduction of these substances in the final products and finally to increase safety of natural cheeses.



## 10. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

AGRESTI, Alan, 1984. *Analysis of ordinal categorical data*, New York: John Wiley & Sons, 287 s., ISBN 978-0470082898.

ANCÍN-AZPILICUETA, Carmen, Ana GONZÁLES-MARCO a Nerea JIMÉNEZ-MORENO, 2008. Current knowledge about the presence of amines in wine. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 48 (3), s. 257-275. ISSN: 0975-8402.

ANONYM, 2011. Scientific Opinion on risk based control of biogenic amine formation in fermented foods. *EFSA Journal*. 9 (10) 1-93. ISSN 1831 – 4732.

BÁČOVÁ, Petra. *Spotřeba potravin roste*. In: Český statistický úřad. [online] 8. prosinec 2016, [cit. 29. březen 2018]. Dostupné z: <https://www.czso.cz/csu/czso/spotreba-potravin-roste>

BioCyc Database Collection: *The Pathway Tools Software* [online], In: BioCyc. Poslední aktualizace 2016 [cit. 1. dubna 2018]. Dostupné z <http://biocyc.org>.

BOVER CID, Sara, M. Jesús MIGUÉLEZ-ARRIZADO, Biserka BECKER, Wilhelm H. HOLZAPPEL a M. Carmen VIDAL-CAROU, 2008. Amino acid decarboxylation by *Lactobacillus curvatus* CTC273 affected by the pH and glucose availability. *Food Microbiology*, 25 (2), 269-277. ISSN: 0740-0020.

BROWN, Ritchie E., David R. STEVENS a Helmut L. HAAS, 2001. The physiology of brain histamine. *Progress in Neurobiology*, 63 (6). 637 – 672- ISSN: 0301-0082.

BUŇKA František, Vendula PACHLOVÁ a Lenka NENUŠILOVÁ, 2013a. Texture properties of Dutch-Type cheese as a function of its location and ripening. *International Journal of Food properties*, 16 (5), 1016-1027. ISSN: 1094-2912.

BUŇKA František, Vendula PACHLOVÁ, Lenka PERNICKÁ, Iva BUREŠOVÁ, Stanislav KRÁČMAR a Tomáš LOŠÁK, 2013a. The dependence of Peleg's coefficients on selected conditions of a relaxation test in model samples of Edam cheese. *Journal of Texture Studies*. 44 (3), 187-195. ISSN: 0022-4901.

BUŇKOVÁ, Leona, František BUŇKA, Michaela HLOBILOVÁ, Zuzana VAŇÁTKOVÁ, Dana NOVÁKOVÁ a Vladimír DRÁB, 2009. Tyramine Production of Technological Important Strains of *Lactobacillus*, *Lactococcus* and *Streptococcus*. *European Food Research and Technology*. 229 (3), 533-538. ISSN 1438-2377.

BUŇKOVÁ, Leona, František BUŇKA, Gabriela MANTLOVÁ, Andrea ČABLOVÁ, Ivo SEDLÁČEK, Pavel ŠVEC, Vendula PACHLOVÁ a Stanislav KRÁČMAR, 2010. The Effect of Ripening and Storage Conditions on the Distribution of Tyramine, Putrescine and Cadaverine in Edam-cheese. *Food Microbiology*. 27 (7), 880-888. ISSN 0740-0020.

- BUŇKOVÁ, Leona, František BUŇKA, Eva POLLAKOVÁ, Tereza PODEŠVOVÁ a Vladimír DRÁB, 2011. The Effect of Lactose, NaCl and an Aero/anaerobic Environment on the Tyrosine Decarboxylase Activity of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* and *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. *International Journal of Food Microbiology*, 147 (2), 112-119. ISSN 0168-1605.
- BUŇKOVÁ, Leona, Gabriela ADAMCOVÁ, Kateřina HUDCOVÁ, Helena VELICHOVÁ, Vendula PACHLOVÁ, Eva LORENCOVÁ a František BUŇKA, 2013. Monitoring of Biogenic Amines in Cheeses Manufactured at Small-scale Farms and in Fermented Dairy Products in the Czech Republic. *Food Chemistry*. 141 (1), 548-551. ISSN 0308-8146.
- BURDYCHOVÁ, Radka a Tomáš KOMPRDA, 2007. Biogenic Amine-forming Microbial Communities in Cheese. *Federation of European Microbiological Societies*. 276 (2), 149-155. ISSN1574-6976.
- CALZADA, Javier, Ana Del OLMO, Antonia PICON, Pila GAYA a Manuel NUÑEZ, 2013. Proteolysis and Biogenic Amine Buildup in High-pressure Treated Ovine Milk Blue-veined Cheese. *Journal of Dairy Science*. 96 (8), 4816-4829. ISSN 1525-3198.
- CHURCH, Susan, Robert A. McCANCE a Elsie M. WIDDOWSON, 2002. *The Composition of Foods*, 6<sup>th</sup>ed. London: Royal Society of Chemistry. 538 s. ISBN 978-0-85404-428-3.
- DADÁKOVÁ, Eva, Martin KŘÍŽEK a Tamara PELIKÁNOVÁ, 2009. Determination of Biogenic Amines in Foods using Ultra-performance Liquid Chromatography (UPLC). *Food Chemistry*. 116 (1), 365-370. ISSN 0308-8146.
- DANG, Andy, Joseph J. PESEK a Maria T. MATYSKA, 2013. The use of Aqueous Normal Phase Chromatography as an Analytical Tool for Food Analysis: Determination of Histamine as a Model System. *Food Chemistry*. 141 (4), 4226-4230. ISSN 0308-8146.
- EL-ZAHAR Kahled, Ahmed M. A. EL-ZAGER a Mohamed F. RAMADAN, 2014. Levels of Biogenic Amines in Cheeses and Their Impact on Biochemical and Histological Parameters in Rats. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*. 57 (1), 73-81. ISSN 2234-344X.
- EN ISO 5534:2004. Cheese and processed cheese - Determination of the Total Solids Content (Reference method). Praha: Český normalizační institut, 2005.
- FIECHTER, Gregor, Gerald SIVÉC a Helmut K. MAYER, 2013. Application of UHPLC for the Simultaneous Analysis of Free Amino Acids and Biogenic Amines in Ripened Acid-curd Cheeses. *Journal of Chromatography B*. 927 (1), 191-200. ISSN 1570-0232.
- FOX, Patrick F., 1993. *Cheese - Chemistry, Physics and Microbiology*, volume 1. 2<sup>nd</sup>ed., London: Chapman & Hall. 601 s. ISBN 978-1-4613-6138-1.

FOX, Patrick F. a Paul L. H. McSWEENEY, 1998. *Dairy chemistry and biochemistry*. 1<sup>st</sup> ed., Berlin: Springer Science & Business Media. 478 s. ISBN 978-0-4127-2000-0.

FOX, Patrick F., Timothy P. GUINEE, Timothy COGAN a Paul L. H. McSWEENEY, 2000. *Fundamentals of Cheese Science*. Gauthersburg: Aspen Publication. 638 s. ISBN 0-8342-1260-9.

FOX, Patrick F., Paul L. H. McSWEENEY, Timothy M. COGAN a Timothy P. GUINEE, 2004. *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, volume 1. 3<sup>rd</sup>ed., Amsterdam: Elsevier Applied Science. 617 s. ISBN 978-0-1226-3652-3.

FRÖHLICH-WYDER, Marie T., Dominik GUGGISBERG, René BADERTSCHER, Daniel WECHSLER, Annerös WITTER a Stefan IRMLER, 2013. The Effect of *Lactobacillus Buchneri* and *Lactobacillus Parabuchneri* On the Eye Formation of Semi-hard Cheese. *International Dairy Journal*. 33 (2), 120-128. ISSN 0958-6946.

GARDINI, Fausto, Franca ROSSI, Lucia RIZZOTTI, Sandra TORRIANI, Luigi GRAZIA, Cristiana CHIAVARI, Fabio COLORETTI a Giulia TABANELLI, 2012. Role of *Streptococcus Thermophilus* PRI60 in Histamine Accumulation in Cheese. *International Dairy Journal*. 27 (1-2), 71-76. ISSN 0958-6946.

GenomeNet: *KEGG - Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* [online]. In: Japan - NPO Bioinformatics Japan. Poslední aktualizace 1. března 2018 [cit. 29. března 2018]. Dostupné z: <http://www.genome.jp/>

GENOVESE, Federica, Jean D. COÏSSON, Avishek MAJUMDER, Alessandro PESSIONE, Birte SVENSSON, Susanne JACOBSEN a Enrica PESSIONE, 2013. An exoproteome Approach to Monitor Safety of a Cheese-isolated *Lactococcus Lactis*. *Food Research International*. 154 (1), 1072-1079. ISSN 0963-9969.

GROSSIORD, Benoit, Elaine E. VAUGHAN, Evert LUESINK a Willem M. VOS, 1998. Genetics of Galactose Utilisation via the Leloir Pathway in Lactic Acid Bacteria. *Le Lait*. 78 (1), 77-84. ISSN 1297-9694.

HALÁSZ, Anna, Ágnes BARÁTH, Livia SIMON-SARKADI a Wilhelm HOLZAPFEL, 1994. Biogenic Amines and their Production by Microorganisms in Food. *Trends Food Science and Technology*. 5 (2), 42-48. ISSN 0924-2244.

INNOCENTE, Nadia, Marialuisa BIASUTTI, Maria PADOVESE a Sabrina MORET, 2007. Determination of Biogenic Amines in Cheese using HPLC Technique and Direct Derivatization of Acid Extract. *Food Chemistry*. 101 (3), 1285-1289. ISSN 0308-8146.

KALÁČ, Pavel, 2014. Health Effects and Occurrence of Dietary Polyamines: A Review for the Period 2005–Mid 2013. *Food Chemistry*. 161 (1), 27-39. ISSN0308-8146.

- KIM, Min-Ju a Keun-Sung KIM, 2014. Tyramine production among lactic acid bacteria and other species isolated from kimchi. *Food Science and Technology*. 56 (2), 406-413. ISSN 0023-6438.
- KOMPRDA, Tomáš, 2004. *Obecná hygiena potravin*. Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně. ISBN 80-7157-757-X.
- KOMPRDA, Tomáš, Radka BURDYCHOVÁ, Vlastimil DOHNAL, Olga CWIKOVÁ, Pavla SLÁDKOVÁ a Hana DVOŘÁČKOVÁ, 2008. Tyramine production in Dutch-type semi-hard cheese from two different producers. *Food Microbiology*, 25, s. 219-227. ISSN: 0740-0020.
- KŘÍŽEK, Martin, Kateřina MATĚJKOVÁ, František VÁCH a Eva DADÁKOVÁ, 2014. Biogenic Amines Formation in High-pressure Processed Pike Flesh (*Esox lucius*) during Storage. *Food Chemistry*. 151 (1), 466-471. ISSN 0308-8146.
- LADERO, Victor, María FERNÁNDEZ, Isabel CUESTA a Miguel A. ALVAREZ, 2010. Quantitative Detection and Identification of Tyramine-producing Enterococci and Lactobacilli in Cheese by Multiplex qPCR. *Food Microbiology*. 27 (7), 933-939. ISSN 0740-0020.
- LADERO, Victor, Elena CAÑEDO, Marta PÉREZ, María C. MARTÍN, María FERNÁNDEZ a Miguel A. ALVAREZ, 2012. Multiplex qPCR for the Detection and Quantification of Putrescine-producing Lactic Acid Bacteria in Dairy Products. *Food Control*. 27 (2), 307-313. ISSN 0956-7135.
- LI, Guoliang, Lihua DONG, Aihong WANG, Wenli WANG, Na HU a Jinmao YOU, 2014. Simultaneous Determination of Biogenic Amines and Estrogens in Foodstuff by an Improved HPLC Method Combining with Fluorescence Labeling. *LWT – Food Science and Technology*. 55 (1), 355-361. ISSN 0023-6438
- LINARES, Daniel M., Beatriz Del RIO, Victor LADERO, Noelia MARTÍNEZ, María FERNÁNDEZ, Cruz M. MARTÍN a Miguel A. ALVAREZ, 2012. Factors influencing biogenic amines accumulation in dairy product. *Frontiers in Microbiology*, 180, 1-10 [2014-2-12]. ISSN: 1664-302X
- LOIZZO, Monica, R., Francesco MENICHINI, Nevio PICCI, Francesco PUOCI, Umile G. SPIZZIRRI a Donatella RESTUCCIA, 2013. Technological Aspects and Analytical Determination of Biogenic Amines in Cheese. *Trends in Food Science and Technology*. 30 (1), 38-55. ISSN 0924-2244
- LUKAVCOVÁ, Tereza. *Spotřeba potravin - 2016*. In: Český statistický úřad [online], [cit. 20. května 2018]. Dostupné z: <https://www.czso.cz/csu/czso/spotreba-potravin-2016>

MAYER, Helmut K., Gregor FIECHTER a Ernest FISCHER, 2010. A New Ultra-pressure Liquid Chromatography Method for the Determination of Biogenic Amines in Cheese. *Journal of Chromatography A*. 1217 (19), 3251-3257. ISSN 0021-9673.

McSWEENEY, Paul L. H. a Maria J. SOUSA, 2000. Biochemical Pathway for the Production of Flavour Compounds in Cheese during Ripening. *Le Lait*. 80 (1), 293-324. ISSN 1297-9694.

McSWEENEY, Paul L. H., 2004. Biochemistry of Cheese Ripening. *International Journal of Dairy Technology*. 57(2-3), 127-144. ISSN 1471-0307.

NOUT Martinus J. R., 1994. Fermented Foods and Food Safety. *Food Research International*. 27 (3), 291-298. ISSN 0963-9969.

NOVELLA-RODRÍGUEZ, Sonia, M. Teresa VECIANA-NOGUÉS, Artur ROIG-SAGUÉS, Antonio TRUJILLO-MESA a M. Carmen VIDAL-CAROU, 2004. Evaluation of biogenic amines and microbial counts throughout the ripening of goat cheeses from pasteurized and raw milk. *Journal of Dairy Research*, 71, 245-252. ISSN: 1469-7629.

OBTULOVÍČ, Peter, 2002. *Bioštatistika*. Nitra: Slovenská poľnohospodárska univerzita. 131 s. ISBN 978-8-08-069104-2.

ÖNAL, Armağan, 2007. A Review: Current Analytical Methods for the Determination. *Food Chemistry*. 103 (4), 1475-1486. ISSN 0308-8146.

ÖNAL, Armağan, Serife E. K. TEKKELI a Cem ÖNAL, 2013. A Review of the Liquid Chromatographic Methods for the Determination of Biogenic Amines in Foods. *Food Chemistry*. 138 (1), 509-515. ISSN 0308-8146.

PACHLOVÁ, Vendula, František BUŇKA, Leona BUŇKOVÁ, Eva WEISEROVÁ, Pavel BUDINSKÝ, Milan ŽALUDEK a Stanislav KRÁČMAR, 2011. 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*. 46 (1), 101-108. ISSN 1471-0307.

PACHLOVÁ, Vendula, František BUŇKA, Radka FLASAROVÁ, Petra VÁLKOVÁ a Leona BUŇKOVÁ, 2012. The Effect of Elevated Temperature on Ripening of Dutch-type cheese. *Food Chemistry*, 132 (4), 1846-1854. ISSN 0307-8146.

PACHLOVÁ, Vendula, František BUŇKA, Sabina PURKRTOVÁ, Šárka HAVLÍKOVÁ a Irena NĚMEČKOVÁ, 2016. Biogenic amines and their producers in Akawi white cheese. *International Journal of Dairy Technology*, 69 (3), 1-7. ISSN 1471-0307.

PLEVA, Pavel, Leona BUŇKOVÁ, Andrea LAUKOVÁ, Eva LORENCOVÁ, Vlastimil KUBÁŇ a František BUŇKA, 2012. Decarboxylatio Activity of

Enterococci Isolated from Rabbit Meat and Staphylococci Isolated from Trout Intestines. *Veterinary Microbiology*. 159 (3-4), 438-442. ISSN 0378-1135.

ROGINSKI, Hubert, John W. FUQUAY a Patrick F. FOX, 2002. *Encyclopedia of Dairy Sciences*. London: Academic Press. 2799 s. ISBN 0-12-227235-8.

SAMKOVÁ, Eva, Eva DADÁKOVÁ A Tamara PELIKÁNOVÁ, 2013. Changes in Biogenic Amine and Polyamine Contents in Smear-ripened Cheeses During Storage. *European Food Research and Technology*. 237 (3), 309-314. ISSN1438-2385.

SANTOS, Silla M. H., 1996. Biogenic Amines: Their Importance in Foods. *International Journal of Food Microbiology*. 29 (2-3), 213-231. ISSN 0168-1605.

SCHIRONE, Maria, Rosanna TOFALO, Giuseppe FASOLI, Giorgia PERPETUINI, Aldo CORSETTI, Anna C. MANETTA, Aurora CIARROCCHI a Giovanna SUZZI, 2013. High Content of Biogenic Amines in Pecorino Cheeses. *Food Microbiology*. 34 (1), 137-144. ISSN 0740-0020.

SMĚLÁ, Dana, Pavla PECHOVÁ, Tomáš KOMPRDA, Bořivoj KLEJDUS a Vlastimil KUBÁŇ, 2004. Chromatographic Determination of Biogenic Amines in Dry Salami During the Fermentation and Storage (in Czech). *Chemical Papers*. 98 (1), 432-437. ISSN 1336-9075.

VODIČKOVÁ, Renata. *Spotřeba potravin - 2015*. In: Český statistický úřad [online], [cit. 29. března 2018]. Dostupné z: <https://www.czso.cz/csu/czso/spotreba-potravin-2015#>

YVON, Mireille a Liesbeth RIJNEN, 2001. Cheese Flavour Formation by Amino Acid Catabolism. *International Dairy Journal*. 11 (4-7), 185-201. ISSN 0958-6946.

ZULJAN, Frederico Alberto, Pablo MORTERA, Sergio Hugo ALARCÓN, Victor Sebastián BLANCATO, Martin ESPARIZ A Christian MAGNI, 2016. Lactic acid bacteria decarboxylation reactions in cheese. *International Dairy Journal*. 62 (1), 53–62. ISSN 0958-6946

ZWIETERING, Marcel H., Ida JONGENBURGER, Wolf M. ROMBOBUTS a Klaas van't RIET, 1990. Modeling of the bacterial growth curve. *Applied and Environmental Microbiology*. 56 (6), 1875-1881. ISSN 0099-2240.

## 11. SEZNAM OBRÁZKŮ

<i>Obr. 1: Rozdělení dizertační práce, popis jednotlivých experimentů a jejich cílů.</i>	15
<i>Obr. 2: Postup přípravy provozního zákysu pro kontrolní výrobu vzorků A a C bez přídavku sledovaného kmene.</i>	17
<i>Obr. 3: Postup přípravy provozních zákysů pro výrobu sýrů označení B a T – zákys s běžnou komerční kulturou a zákys obsahující sledovaný kmen.</i>	18
<i>Obr. 4: Technologie výroby modelových vzorků sýrů.</i>	18
<i>Obr. 5: Způsob solení a zrání modelových vzorků sýrů holandského typu pro 2. a 3. experiment.</i>	19
<i>Obr. 6: Výsledky pH vzorků sýrů 2. experimentu (A bez přídavku sledovaného kmene, B<sub>824</sub> a B<sub>946</sub> s přídavkem dekarboxyláza pozitivních bakterií rodu <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> CCDM 824 a CCDM 946.</i>	24
<i>Obr. 7: Vývoj tvrdosti vzorků sýrů 2. experimentu v průběhu 90denního zrání (A bez přídavku sledovaného kmene, B<sub>824</sub> a B<sub>946</sub> s přídavkem dekarboxyláza pozitivních bakterií rodu <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> CCDM 824 a CCDM 946.</i>	25
<i>Obr. 8: Vývoj celkového obsahu volných aminokyselin v průběhu 90denního zrání (A bez přídavku sledovaného kmene, B<sub>824</sub> a B<sub>946</sub> s přídavkem dekarboxyláza pozitivních bakterií rodu <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> CCDM 824 a CCDM 946).</i>	26
<i>Obr. 9: Vývoj koncentrace biogenního aminu putrescinu v průběhu 90denního zrání (A bez přídavku sledovaného kmene, B<sub>824</sub> a B<sub>946</sub> s přídavkem dekarboxyláza pozitivních bakterií rodu <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> CCDM 824 a CCDM 946).</i>	27
<i>Obr. 10: Vývoj koncentrace biogenního aminu tyraminu v průběhu 90denního zrání (A bez přídavku sledovaného kmene, B<sub>824</sub> a B<sub>946</sub> s přídavkem dekarboxyláza pozitivních bakterií rodu <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> CCDM 824 a CCDM 946).</i>	27
<i>Obr. 11: Výsledky obsahu sušiny 3. experimentu kontrolních vzorků C a vzorků s přídavkem dekarboxyláza pozitivních bakterií rodu <i>Lactobacillus curvatus</i> subsp. <i>curvatus</i> DEPE T3 a DEPE T36 a <i>Lactobacillus paracasei</i> DEPE T51 a DEPE T52.</i>	28
<i>Obr. 12: Výsledky pH vzorků sýrů 3. experimentu kontrolních vzorků C a vzorků s přídavkem dekarboxyláza pozitivních bakterií rodu <i>Lactobacillus curvatus</i> subsp. <i>curvatus</i> DEPE T3 a DEPE T36 a <i>Lactobacillus paracasei</i> DEPE T51 a DEPE T52.</i>	29
<i>Obr. 13: Vývoj celkového obsahu volných aminokyselin 3. experimentu vzorků C a vzorků s přídavkem nezákysových bakterií rodu <i>Lactobacillus curvatus</i> subsp. <i>curvatus</i> DEPE T3 a DEPE T36 a <i>Lactobacillus paracasei</i> DEPE T51 a DEPE T52</i>	29

<i>Obr. 14: Vývoj obsahu leucinu v 3. experimentu vzorků C a vzorků s přidavkem nezákysových bakterií rodu Lactobacillus curvatus subsp. curvatus DEPE T3 a DEPE T36 a Lactobacillus paracasei DEPE T51 a DEPE T52 .....</i>	30
<i>Obr. 15: Vývoj obsahu tyrozinu v 3. experimentu kontrolních vzorků C a vzorků s přidavkem dekarboxyláza pozitivních bakterií rodu Lactobacillus curvatus subsp. curvatus DEPE T3 a DEPE T36 a Lactobacillus paracasei DEPE T51 a DEPE T52 .....</i>	30
<i>Obr. 16: Vývoj celkového obsahu biogenních aminů v 3. experimentu kontrolních vzorků C a vzorků s přidavkem dekarboxyláza pozitivních bakterií rodu Lactobacillus curvatus subsp. curvatus DEPE T3 a DEPE T36 a Lactobacillus paracasei DEPE T51 a DEPE T52 .....</i>	31
<i>Obr. 17: Vývoj obsahu biogenního aminu tyraminu v 3. experimentu kontrolních vzorků C a vzorků s přidavkem dekarboxyláza pozitivních bakterií rodu Lactobacillus curvatus subsp. curvatus DEPE T3 a DEPE T36 a Lactobacillus paracasei DEPE T51 a DEPE T52 .....</i>	31



## **12. SEZNAM TABULEK**

Tabulka 1 Kódování vzorků odebrané v průběhu výroby a skladování tvarohů	16
Tabulka 2 Přehled doby kultivace médií pro jednotlivé skupiny mikroorganismů (Buňková et al., 2009, s. 535; 2010, s. 881; Pleva et al. 2012, s. 439) .....	20
Tabulka 3 Hodnoty jednotlivých biogenních aminů ve fázových vzorcích v průběhu výroby a skladování vzorků tvarohů .....	22

### 13. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AgDI	Agmatin deiminázová dráha
AMK	Aminokyseliny
BA	Biogenní aminy
BAI	„Biogenic Amine Index“ ukazatel kažení potravin
BMK	Bakterie mléčného kvašení
CCDM	Sbírka mlékařských mikroorganismů Laktoflora
CPM	Celkový počet mikroorganismů
KTJ	Kolonie tvořících jednotek
MO	Mikroorganismus
MRS agar	Mann, Rogosa & Sharpe agar
ODC	Ornitin dekarboxylázová dráha
PCA	Plate count agar
PCR	„Polymerase Chain Reaction“ Polymerázová řetězová reakce
SB agar	Slanetz-Bartley agar

## 14. PUBLIKAČNÍ AKTIVITY AUTORA

### *Příspěvky v impaktovaných časopisech*

PACHLOVÁ, Vendula, František BUŇKA, **Radka FLASAROVÁ**, Petra VÁLKOVÁ a Leona BUŇKOVÁ, 2012. The Effect of Elevated Temperature on Ripening of Dutch Type Cheese. *Food Chemistry*. 132 (4), 1846-1854. ISSN 0308-8146.

BUŇKA, František, Pavel BUDINSKÝ, Blanka ZIMÁKOVÁ, Marek MERHAUT, **Radka FLASAROVÁ**, Vendula PACHLOVÁ, Vlastimil KUBÁŇ a Leona BUŇKOVÁ, 2013. Biogenic Amines Occurrence in Fish Meat Sampled from Restaurants in Region of Czech Republic. *Food Control*. 31 (1), 49-52. ISSN 0956-7135.

**FLASAROVÁ Radka**, Vendula PACHLOVÁ, V., Leona BUŇKOVÁ, Anna MENŠÍKOVÁ, Nikola GEORGOVÁ, Vladimír DRÁB V. a František, BUŇKA, 2016. Decarboxylase activity of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* strains in the model system of Dutch-type cheese. *Food Chemistry*. 194 (1), 68-75. ISSN: 0308-8146.

### *Příspěvky v recenzovaných časopisech*

BUDINSKÝ, Pavel, František BUŇKA, Blanka ZIMÁKOVÁ, Marek MERHAUT, Karel VALOUCH, Kateřina ŠRÁMKOVÁ, **Radka FLASAROVÁ**, Vendula PACHLOVÁ a Leona BUŇKOVÁ, 2012. Výskyt biogenních aminů v rybím mase v restauracích. *Výživa a potraviny*. 4 (1), 88-91. ISSN 1211-846X.

### *Příspěvky v zahraničních recenzovaných časopisech*

BUŇKA, František, Barbora IVIČIČOVÁ, Leona BUŇKOVÁ, **Radka FLASAROVÁ** a Stanislav KRÁČMAR, 2012. Biogenic Amines Content in Selected Wines during Winemaking. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Science*. 1 (4), 785-793. ISSN 1338-5178.

BUŇKA, František, Ludmila ZÁLEŠÁKOVÁ, **Radka FLASAROVÁ**, Vendula PACHLOVÁ, Pavel BUDINSKÝ a Leona BUŇKOVÁ, 2012. Biogenic Amines Content in Selected Commercial Fermented Products of Animal Origin. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Science*. 2 (1), 209-218. ISSN 1338-5178.

### *Příspěvky ve sbornících z konferencí*

PACHLOVÁ, Vendula, **Radka FLASAROVÁ**, František BUŇKA a Leona BUŇKOVÁ, 2012. Vývoj vybraných parametrů sýrů holandského typu

v průběhu jeho zrání za zvýšené teploty. In *Konference Mléko a Sýry*. Praha: VŠCHT.

**FLASAROVÁ Radka**, František BUŇKA, Vendula PACHLOVÁ, Anna MENŠÍKOVÁ, Nikola GEORGOVÁ a Leona BUŇKOVÁ, 2014. Dekarboxylázová aktivita vybraných zákysových bakterií mléčného kvašení v modelovém přírodním sýru. In *Konference Mléko a Sýry*. Praha: VŠCHT.

## 15. ODBORNÝ ŽIVOTOPIS AUTORA

### OSOBNÍ ÚDAJE

Jméno a příjmení: Ing. Radka Flasarová, Ph.D.  
Datum narození: 6. 12. 1986  
Adresa: Korytná 358, Korytná, 687 52  
E-mail: flasarova1@seznam.cz

### VZDĚLÁNÍ

2002 – 2006 **Gymnázium J. A. Komenského, Uherský Brod**

2006 – 2009 **UTB ve Zlíně, Fakulta technologická**  
bakalářské studium; obor Chemie a technologie potravin

2009 – 2011 **UTB ve Zlíně, Fakulta technologická**  
navazující magisterské studium; obor Chemie potravin a bioaktivních látek

2011 – doposud **UTB ve Zlíně, Fakulta technologická**  
doktorské studium; obor Technologie potravin

### ZAMĚSTNÁNÍ

2011 – 2015 **UTB ve Zlíně, Fakulta technologická**  
Výzkumná a organizační činnost v rámci projektu Národní agentury zemědělského výzkumu „Systém jištění kvality a bezpečnosti mlékárenských výrobků vhodnými metodami aplikovatelnými v praxi“ QJ1210300

2015 – 2016 **UTB ve Zlíně, Fakulta technologická**  
technickohospodářský pracovník pro laboratoře živočišného původu

2016 – doposud **FRUJO, a.s.**  
vedoucí vývojového oddělení společnosti Frujo, a.s.

### ŘEŠENÉ PROJEKTY

2011 – IGA/18/FT/11/D (člen řešitelského týmu) -

2012 – 2016 – Projekt Národní agentury zemědělského výzkumu „Systém jištění kvality a bezpečnosti mlékárenských výrobků vhodnými metodami aplikovatelnými v praxi“ QJ1210300 ve funkci výzkumná a organizační činnost

2012 – IGA/FT/2012/026 (člen řešitelského týmu) – Vliv aplikace směsí fosforečnanových solí na texturní vlastnosti vybraných produktů živočišného původu

2013 – IGA/FT/2013/010 (člen řešitelského týmu) – Ternární směsi fosforečnanových a citronanových solí při výrobě tavených sýrů

2014 – IGA/FT/2014/001 (hlavní řešitel) – Aplikace fosforečnanu a hydrokoloidů do vybraných potravin

2015 – IGA/FT/2015/004 (člen řešitelského týmu) – Studium funkce vybraných  
přidatných a biologicky aktivních látek v potravinách

### **ÚČAST NA KONFERENCÍCH**

- 1/2012 Konference Mléko a sýry, Praha, VŠCHT
- 2/2012 Konference Biotechnology and Quality of Raw Materials and Foodstuffs,  
Mojmírovce
- 3/2014 Konference Mléko a sýry, Praha, VŠCHT

### **ZAHRANIČNÍ STÁŽE**

- 3-6/2013 Zahraniční pracovní stáž v UCC College Cork pod vedením prof. Paul L.  
H. McSweeney Ph.D. DSc.

### **JAZYKOVÉ ZNALOSTI**

- Anglický jazyk Pokročilá znalost – aktivně
- Německý jazyk Středně pokročilá znalost

### **OSTATNÍ DOVEDNOSTI**

- Práce s PC OS Windows, MS Office, TextureLite, Clarity CDS  
(Chromatography data station), LC solution software,  
ACDLABS/ChemSketch, OpenOffice Draw
- Práce s přístroji TA.XT Plus (Stable Micro Systems, UK) (2011 – 2016), HPLC  
Agilent Technologies s UV a FLD detekcí (USA) (2011 – 2016),  
HPLC Shimadzu s UV detekcí (USA) (2013-2016), od prosince  
2014 rozšířený o RI detektor

Ing. Radka Flasarová, Ph.D.

**Biogenní aminy ve vybraných skupinách přírodních sýrů**

Biogenic amines in selected cheese groups

Teze dizertační práce

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

Náklad: vyšlo elektronicky  
Sazba: Ing. Radka Flasarová, Ph.D.  
Publikace neprošla jazykovou ani redakční úpravou.

Rok vydání 2018  
Pořadí vydání: První

ISBN 978-80-7454-785-0

