Mikrobiologická analýza typických asijských fermentovaných potravin

Bc. Veronika Cabáková

Diplomová práce
2016

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav technologie tuků, tenzidů a kosmetiky
akademický rok: 2015/2016

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení:	**Bc. Veronika Cabáková**
Osobní číslo:	**T13399**
Studijní program:	**N2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor:	**Technologie tuků, detergentů a kosmetiky**
Forma studia:	**prezenční**
Téma práce:	**Mikrobiologická analýza typických asijských fermentovaných potravin**

Zásady pro vypracování:

Teoretická část

1. **Fermentace potravin**
2. **Biogenní aminy ve fermentovaných potravinách.**
3. **Technologie výroby vybraných asijských fermentovaných produktů.**

Praktická část

1. **Mikrobiologická analýza vybraných fermentovaných produktů.**
2. **Stanovení vlastností vybraných skupin mikroorganismů.**
3. **Stanovení biogenních aminů ve vybraných produktech.**

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

1. **SILLA SANTOS, M. H. Biogenic amines: their importance in foods. International Journal of Food Microbiology, 1996, 29, 213–231.**
2. **HALASZ, A.,BARATH, A.,SIMON-SARKADI, L., HOLZAPFEL, W. Biogenic amines and their production by microorganisms in food. Trends in Food Science & Technology, 1994, 5, 42–49.**
3. **VELÍŠEK, J. Chemie potravin 3; Ossis: Tábor, 1999.**
4. **CLEVELAND, J., MONTVILLE, T. J., NES, I. F., CHIKINDAS M. L. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. International Journal of Food Microbiology. 2001, 71, 1–20.**

Vedoucí diplomové práce: **doc. RNDr. Leona Buňková, Ph.D.**
Ústav inženýrství ochrany životního prostředí

Datum zadání diplomové práce: **20. ledna 2016**

Termín odevzdání diplomové práce: **18. května 2016**

Ve Zlíně dne 20. ledna 2016

doc. Ing. František Buňka, Ph.D.
děkan

UNIVERZITA TOMÁŠE BATI VE ZLÍNĚ
Fakulta technologická
L.S.

Ing. Martina Černeková, Ph.D.
ředitel ústavu

Příjmení a jméno: CABÁKOVÁ VERONIKA Obor: CHTTD

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

- beru na vědomí, že odevzdáním diplomové/bakalářské práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, bez ohledu na výsledek obhajoby [1)];
- beru na vědomí, že diplomová/bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému dostupná k nahlédnutí, že jeden výtisk diplomové/bakalářské práce bude uložen na příslušném ústavu Fakulty technologické UTB ve Zlíně a jeden výtisk bude uložen u vedoucího práce;
- byl/a jsem seznámen/a s tím, že na moji diplomovou/bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3 [2)];
- beru na vědomí, že podle § 60 [3)] odst. 1 autorského zákona má UTB ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- beru na vědomí, že podle § 60 [3)] odst. 2 a 3 mohu užít své dílo – diplomovou/bakalářskou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- beru na vědomí, že pokud bylo k vypracování diplomové/bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tedy pouze k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové/bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- beru na vědomí, že pokud je výstupem diplomové/bakalářské práce jakýkoliv softwarový produkt, považují se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Ve Zlíně 20.5.2016 .....

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ABSTRAKT

Tato diplomová práce se zabývá typickými fermentovanými asijskými potravinami (miso pasty, sójové omáčky, rýžový ocet, kimči a tempeh) vzhledem k jejich mikrobiální jakosti a výskytu biogenních aminů v souvislosti s dobou a teplotou skladování.

Teoretická část se věnuje problematice biogenních aminů se zaměřením na faktory ovlivňující jejich výskyt v potravinách. Dále jsou zde popsány jednotlivé fermentované asijské produkty, jejich výroba, konzumace a nutriční aspekty.

V praktické části byl proveden mikrobiologický výzkum s cílem zmapování výskytu a množství vybraných indikátorových skupin mikroorganizmů v průběhu skladování jednotlivých produktů při třech různých teplotách, konkrétně 8 °C, 23 °C a 30 °C. Bylo zjištěno, že nejvyšší nárůst sledovaných skupin mikroorganizmů byl při skladování produktů ve 23 °C a 30 °C a to hlavně u tempehu a miso past. U sójových omáček a rýžového octa byly zaznamenány jen velmi nízké počty mikroorganizmů po celou dobu skladování. V druhé části experimentu byla provedena analýza biogenních aminů pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie. Z provedené analýzy bylo zjištěno, že obsahy biogenních aminů v testovaných produktech byly nízké a tudíž neohrožující lidské zdraví.

Klíčová slova: fermentované asijské potraviny, mikroorganizmy, biogenní aminy, skladování

ABSTRACT

This thesis deals with the typical fermented asian food (miso paste, soy sauce, rice vinegar, kimchi and tempeh) due to their microbial quality and presence of biogenic amines in relation to time and temperature of storage.

The theoretical part describes biogenic amines, their occurrence in food due to different factors. There are also described the various asian fermented products, their production, consumption and nutritional aspects.

The experimental part is focused on microbiological research in order to determinate presence of selected indicator groups of microorganisms during storage of individual products at three different temperatures, namely 8 °C, 23 °C, 30 °C. It was found that the highest increase was observed in products which were stored in 23 °C and 30 °C especially in tempeh and miso paste. In soy sauce and rice vinegar were observed only very low amounts of microorganisms through the storage period. In the second part of the experiment, the biogenic amines were analyzed using high performance liquid chromatography. It was found that the levels of biogenic amines in tested products were low and therefore does not endanger human health.

Keywords: asian fermented food, microorganisms, biogenic amines, storage

Poděkování:

Ráda bych poděkovala své vedoucí diplomové práce doc. RNDr. Leoně Buňkové, Ph.D. za její cenné rady, trpělivost a pomoc při vzniku této práce.

Dále mé obrovské poděkování patří Ing. Ludmile Zálešákové, Bc. Veronice Kučabové, Mila Kharisma a Hanis Nuralawiah za jejich ochotu a pomoc v laboratoři. V neposlední řadě svému příteli, rodině a kamarádům, kteří mě po celou dobu studia podporovali.

Motto:

„Co tě nezabije, to tě posílí“

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

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

Ve Zlíně

.....

Podpis studenta

OBSAH

ÚVOD **11**
I TEORETICKÁ ČÁST **12**
1 FERMENTACE **13**
2 BIOGENNÍ AMINY **16**
2.1 VZNIK BIOGENNÍCH AMINŮ 16
2.1.1 Faktory ovlivňující produkci biogenních aminů 16
2.1.2 Nové metody kontroly vzniku biogenních aminů 19
2.2 ÚČINKY NA LIDSKÝ ORGANIZMUS 19
2.3 STANOVENÍ BIOGENNÍCH AMINŮ 21
2.4 LIMITY BIOGENNÍCH AMINŮ STANOVENÉ LEGISLATIVOU 22
3 ASIJSKÉ PRODUKTY **23**
3.1 FERMENTOVANÉ PRODUKTY ZE SÓJE 23
3.1.1 Sójové omáčky (Shoyu) 25
3.1.1.1 Tamari shoyu 26
3.1.1.2 Koikuchi shoyu 27
3.1.2 Sójová pasta – miso 27
3.1.2.1 Shiro miso 29
3.1.2.2 Mugi miso 29
3.1.2.3 Genmai miso 29
3.1.2.4 Hatcho miso 29
3.1.2.5 Nutriční aspekty miso past 29
3.1.3 Tempeh 30
3.1.3.1 Výroba tempehu 30
3.1.3.2 Využití mikroorganizmů při fermentaci tempehu 32
3.1.3.3 Nutriční aspekty a konzumace tempehu 33
3.2 RÝŽOVÉ OCTY 35
3.2.1 Výroba komesu a kurosu 35
3.2.2 Výroba kasusu 37
3.2.3 Vývoj mikroflóry rýžových octů 37
3.2.4 Nutriční aspekty rýžových octů 37
3.3 KIMČI 38
3.3.1 Výroba kimči 38
3.3.2 Vývoj mikroflóry kimči 39
3.3.3 Nutriční aspekty a konzumace kimči 41
II PRAKTICKÁ ČÁST **43**
4 CÍL PRÁCE **44**
5 MATERIÁL, POMŮCKY A METODY **45**
5.1 CHARAKTERISTIKA POUŽITÝCH MATERIÁLŮ 45
5.2 MIKROBIOLOGICKÁ ANALÝZA 46
5.2.1 Popis experimentu 51
5.3 ANALÝZA BIOGENNÍCH AMINŮ 52
5.3.1 Příprava pevných a polotuhých vzorků pro stanovení biogenních aminů 53

5.3.2 Příprava tekutých vzorků pro stanovení biogenních aminů 54
5.3.3 Chromatografické stanovení BA 54
6 VÝSLEDKY A DISKUZE 55
6.1 MIKROBIOLOGICKÁ ANALÝZA TEKUTÝCH A POLOTUHÝCH VZORKŮ 55
6.2 MIKROBIOLOGICKÁ ANALÝZA TUHÝCH VZORKŮ 60
6.3 CHROMATOGRAFICKÉ STANOVENÍ BIOGENNÍCH AMINŮ 64
6.3.1 Miso pasty 64
6.3.2 Tempeh 65
6.3.3 Kimči 69
6.3.4 Sójové omáčky 69
6.3.5 Komesu 73
ZÁVĚR 74
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY 76
SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK 83
SEZNAM OBRÁZKŮ 85
SEZNAM TABULEK 87
SEZNAM PŘÍLOH 88

ÚVOD

Fermentace je jednoduchý, ekonomicky výhodný a efektivní způsob uchování potravin využívaný na celém světě po staletí. Tento způsob úpravy potravin se využívá hlavně v asijské kuchyni, která se stává čím dál více populárnější a s ní i její tradiční fermentované výrobky. Svou oblibu si získaly hlavně díky skvělým chuťovým a nutričním vlastnostem. Navíc některé z těchto potravin pomáhají v boji proti různým onemocněním, působí jako antioxidanty, obsahují vitaminy a kvalitní proteiny. Obyvatelé těchto zemí se dožívají vysokého věku, přičemž této skutečnosti vědci přisuzují největší zásluhu právě díky stravě. Většina z těchto produktů jsou ze surovin, které jsou levné a snadno dostupné.

Biogenní aminy jsou nízkomolekulární dusíkaté látky nacházející se především ve fermentovaných potravinách s vyšším obsahem proteinů. V poslední době se staly předmětem mnoha spekulací a stále ještě neexistuje jednotná legislativní úprava přesně definující množství u jednotlivých zástupců, které by bylo považováno za mezní hodnotu. Tyto látky jsou sice přirozeným produktem metabolizmů probíhajících v lidském těle, avšak ve vyšších množstvích mohou způsobovat různé zdravotní problémy. Proto je třeba tyto látky a jejich obsahy monitorovat, aby se předcházelo těmto potížím. Každý jedinec je navíc individuálně citlivý k množství a typu biogenních aminů.

Tato diplomová práce je zaměřena na výzkum asijských fermentovaných potravin skladovaných v různém teplotním rozmezí po různě dlouhou dobu. V teoretické části je popsána problematika biogenních aminů se zaměřením na jejich fyziologické účinky a faktory ovlivňující jejich výskyt. Dále je zde zahrnuta výroba a charakteristika vybraných asijských fermentovaných potravin.

V praktické části byla v závislosti na teplotě a době skladování provedena mikrobiologická analýza vybraných asijských fermentovaných potravin a následně byly u těchto potravin pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie zkoumány obsahy biogenních aminů.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 FERMENTACE

Termín fermentace (kvašení) pochází z latinského slova „*fervere*“, které znamená vařit. Je to v podstatě jakýkoli proces, při kterém díky činnosti mikroorganizmů (kvasinky, plísně nebo bakterie) vzniká výsledný produkt. Jedná se o jednu z nejstarších a nejekonomičtějších metod bezpečného uchování potravin. Typickými výchozími surovinami jsou mléko, maso, zelenina nebo cereálie [1, 2].

Tradiční způsob fermentace v domácnosti je velmi jednoduchý a postačí základní vybavení na zpracování. Tyto výrobky, z důvodu nedostatku sterility a využití přirozeně se vyskytující mikroflóry, většinou obsahují smíšené mikrobiální populace. Původní fermentované potraviny vznikaly právě touto spontánní fermentací. Zhruba od 20. století se spolu s rychlým rozvojem oboru mikrobiologie vyvinuly definované startovací kultury. K vylepšení těchto kultur se začalo využívat genových transferových metod jako transdukce, konjugace, transformace a poslední dobou i genetického inženýrství [1, 2, 3].

Hlavní faktory, které ovlivňují průběh fermentace, jsou teplota, hodnota pH a anaerobní podmínky. Optimální teplotní rozmezí pro fermentaci rostlinných materiálů je 16–35 °C, avšak záleží také na použitých mikroorganizmech, které rostou při určité optimální teplotě [3].

- **Mikroorganizmy**

Při výrobě fermentovaných potravin se používá velké množství bakterií, kvasinek nebo plísní (viz Tab. 1 a Tab. 2). Tyto mikroorganizmy produkují široké množství metabolických produktů, které se uplatňují jako konzervanty, stabilizátory a látky ovlivňující texturu, chuť a barvu. Nejčastěji používané mikroorganizmy jsou *Saccharomyces cerevisiae*, *Lactococcus lactis* a *Streptococcus thermophilus* [1].

Tab. 1: Fermentované potraviny a jejich požadované ingredience [3]

Produkt	Výchozí surovina	Mikroorganizmy
Pivo	Cereálie	Kvasinky, mléčné bakterie
Víno	Hroznová šťáva	Kvasinky, mléčné bakterie
Ocet	Víno	Octové bakterie
Chleba	Obiloviny	Mléčné bakterie
Sójová omáčka	Sójové boby	Plíseň, mléčné bakterie
Kysané zelí, kimči	Zelí	Mléčné bakterie
Fermentované masné výrobky	Maso	Mléčné bakterie
Nakládaná zelenina	Okurky, olivy aj.	Mléčné bakterie
Sýr	Mléko	Kvasinky, mléčné bakterie, plíseň

Tab. 2: Vybrané mikroorganizmy používané k fermentaci potravin [3]

Rod	Druh	Použití
Aspergillus	*oryzae*	Sójové omáčky
Candida	*kefyr*	Fermentované mléčné výrobky
Lactococcus	*lactis* subsp. *lactis*	Sýr, maso, chleba, fermentované mléčné výrobky, zelenina, probiotika
Penicillium	*album*	Sýr, fermentované mléčné výrobky
Penicillium	*camemberti*	Sýr
Penicillium	*nalgiovense*	Maso
Penicillium	*roqueforti*	Sýr
Saccharomyces	*cerevisiae*	Pekařské kvasinky, víno, pivo, zelenina, probiotika
Streptococcus	*thermophilus*	Sýr, chleba, fermentované mléčné výrobky, zelenina, probiotika

Podle konečného produktu se rozlišuje několik druhů fermentace jako alkoholová (při které dochází k přeměně cukrů na alkohol a CO_2), octová (přeměna alkoholu na octovou kyselinu) a mléčná (přeměna cukrů na kyselinu mléčnou). Alkoholové fermentace se účastní hlavně *Saccharomyces cerevisiae* a plíseň *Aspergillus oryzae*. Octová fermentace má dvě fáze. První zahrnuje alkoholovou fermentaci následovanou oxidací etanolu přes acetaldehyd až na octovou kyselinu [3].

Během fermentace rostlinných materiálů jako zelí, okurek, olivy, sójové boby a káva je vyžadováno několik různých druhů mikroorganizmů při různých fázích fermentačního

procesu. Typickou výchozí surovinou pro octovou fermentaci je rýže, brambory nebo hrozny. Čisté kultury mikroorganizmů nejsou pro tento typ fermentace příliš používány. Avšak zajímavé je, že zástupce rodu *Acetobacter*, který je zodpovědný za tvorbu rýžového octa, vytvoří spontánně skoro čistou kulturu v průběhu jeho dlouhé doby výroby [3].

- **Výhody fermentovaných potravin**

  Oproti jiným technologiím zpracování potravin, fermentace zvyšuje obsah živin, minerálních látek a pozitivně ovlivňuje vůni a chuť. Tento proces také zlepšuje stravitelnost, zvyšuje nutriční hodnotu produktu obohacením o mikrobiální bílkoviny, vitaminy, lipidy, aminokyseliny a působí blahodárně na lidské zdraví. Mikrobiální kultury vytvářejí vitaminy skupiny B (riboflavin, kyselinu listovou, thiamin, biotin, niacin) a často také B_{12}, který jinak v potravinách rostlinného původu chybí. Mnohé z fermentovaných produktů působí antioxidačně, čili vychytávají volné radikály z těla buněk. Tyto potraviny pak mohou také pomáhat při redukci nebo detoxikaci určitých nežádoucích sloučenin jako jsou fytáty, polyfenoly a taniny [1, 2, 4, 5].

  Fermentované potraviny se vyrábějí po celém světě a to hlavně díky jejich prodloužené skladovatelnosti, zmenšení objemu, kratšímu času vaření a již zmíněné vysoké nutriční hodnotě oproti nefermentovaným výrobkům. K prodloužení doby údržby dochází produkcí alkoholu, kyseliny mléčné nebo octové. Jsou to přírodní konzervanty uchovávající živiny a zabraňující kažení. V rozvojových zemích je tento postup obzvláště důležitý, protože teplota okolního prostředí přispívá k rychlé zkáze potravin a konzervárenské technologie, jako je mražení či chlazení, jsou zde těžko dostupné [1, 2, 4, 5].

2 BIOGENNÍ AMINY

Biogenní aminy (BA) jsou považovány za nízkomolekulární dusíkaté bazické látky odvozené od aminokyselin. Vyskytují se ve všech živých organizmech a jsou součástí různých metabolických a fyziologických procesů [6, 7, 8, 9].

Na základě jejich chemické struktury je lze rozdělit na [6, 7, 8, 9]:

- aromatické (tyramin – TYM, 2-fenyletylamin – PEA),
- alifatické (putrescin – PUT, kadaverin – CAD),
- heterocyklické (histamin – HIM, tryptamin – TRM),
- polyaminy (spermidin – SPD, spermin – SPM , případně agmatin – AGM).

Dále se rozlišují primární, sekundární nebo terciární biogenní aminy podle počtu arylových a alkylových skupin, které jsou navázány na atom dusíku [7].

2.1 Vznik biogenních aminů

Biogenní aminy vznikají dekarboxylací aminokyselin působením dekarboxyláz, a to několika různými způsoby. První z nich je aktivitou enzymů (dekarboxylázy), které se přirozeně vyskytují v potravinách. Další je pomocí transaminace aminokyselin a karbonylových sloučenin (aldehydů a ketonů). Nejvýznamnějším způsobem je však dekarboxylace pomocí exogenních enzymů, které jsou produkovány určitými mikroorganizmy [6, 10, 11].

Dekarboxylace je chemická reakce, při které je určitá aminokyselina rozkládána enzymem (dekarboxyláza) za vzniku odpovídajícího aminu, oxidu uhličitého a některých toxických primárních aminů majících nepříjemnou chuť. Díky tomuto mechanizmu vzniká histamin z aminokyseliny histidinu, tyramin z tyrozinu nebo kadaverin z lyzinu. Zástupcem toxických aminů je histamin nebo tyramin. [6, 7, 11].

2.1.1 Faktory ovlivňující produkci biogenních aminů

Pro tvorbu biogenních aminů je důležitá dostupnost volných aminokyselin v substrátu, přítomnost mikroorganizmů schopných aminokyseliny v substrátu dekarboxylovat, optimální podmínky pro bakteriální růst a aktivitu enzymu [6, 8, 10, 12, 13].

Větší výskyt BA lze předpokládat hlavně ve fermentovaných potravinách, kde díky přítomnosti některých bakterií mléčného kvašení dochází k dekarboxylaci aminokyselin [7].

Na jejich vzniku se podílejí především následující faktory.

Teplota

Teplota prostředí podstatně ovlivňuje množství BA. Při teplotách nižších než 5 °C a vyšších než 40 °C se utlumí růst mikroorganizmů a aktivita enzymů, které jsou zodpovědné za produkci BA, tudíž se jejich počet snižuje [7, 11, 13]. Bylo zjištěno, že histidin-, lyzin- i tyrozindekarboxyláza potřebuje ke své činnosti teploty nad 15 °C (optimum je kolem 30 °C) [14]. Pro produkci tyraminu je mezní hodnota 10 °C a nižší teploty inaktivují enzym tyrozindekarboxylázu, což znemožní jeho tvorbu. Avšak výzkum v této oblasti stále pokračuje a je jasné, že produkce BA vzhledem k rozličným teplotám je různá. Během vaření jsou hodnoty biogenních aminů stálé. Jakmile BA vzniknou je velmi obtížné je eliminovat. I přesto však může dojít k částečnému snížení jejich množství a to například tepelnou úpravou s redukujícími cukry při Maillardově reakci. Výsledná koncentrace v potravinách se však může měnit v důsledku skladovacích podmínek a ty by měly být kontrolovány [11, 15]. Pokud výrobky neosahují psychrotrofní bakterie, tak by teplota skladování měla být kolem bodu mrazu [7].

Koncentrace vodíkových iontů (pH)

Hodnota pH je důležitý faktor ovlivňující amino-dekarboxylázovou aktivitu. Každý mikroorganizmus má určité optimum pH hodnot kdy je schopen se rozmnožovat. Extrémní hodnoty mohou mikroorganizmy usmrtit. Ke stimulaci bakterií dochází v kyselém prostředí, kdy jsou produkovány dekarboxylázy. Při velmi kyselém prostředí vznikají bazické biogenní aminy jako součást obranných systémů buňky proti kyselému prostředí [7, 12].

Fermentovatelné cukry

Přítomnost fermentovatelných cukrů jako je glukóza zlepšuje jak růst, tak dekarboxylázovou aktivitu bakterií. Koncentrace glukózy v rozmezí 0,5–2,0 % (w/v) je označena jako optimální a pokud by přesáhla 3 % (w/v), tak zpravidla dojde k inhibici růstu bakterií [11, 15].

Doba skladování potravin

Je prokázána přímá závislost mezi obsahem biogenních aminů a délkou skladování. S rostoucí teplotou a dobou skladování roste i koncentrace aminů [11, 14].

Soli

V technologii výroby potravin se sůl používá k omezení nebo zastavení růstu patogenních mikroorganizmů. Tím se zabrání i kažení potravin během skladování a omezí se růstová rychlost bakterií produkujících dekarboxylázu [11]. Avšak existují i halotolerantní bakterie, kterým vyšší obsah soli vyhovuje. Také závisí na obsahu použité solicí směsi. Po přidání dusitanové soli se zpomalí nárůst biogenních aminů [7, 11]. Při fermentaci a skladování sójových produktů má koncentrace soli velký vliv na produkci BA. Produkce BA bakterií *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* byla inhibována zvýšením obsahu soli z 0 na 6 %. Osmoprotektivní účinek mají aminy histamin a tyramin, tudíž se zvyšující se koncentrací soli se zvyšuje i jejich množství. V tradičních čínských fermentovaných produktech ze sójových bobů byla objevena významná tvorba histaminu halotolerantními kmeny *Staphylococcus capitis* při 10% koncentraci soli [12, 14].

Startovací kultury

Startovací kultury jsou obecně mikroorganizmy, kterých se využívá k výrobě různých potravinářských výrobků díky jejich metabolické činnosti. Ovlivňují kvalitu výrobku, podílejí se na chuti, vůni a konzistenci fermentovaných potravin. Kromě pozitivních vlastností mají i nežádoucí, např. produkce toxických látek jako jsou BA. Buď mohou přímo dekarboxylovat aminokyseliny anebo ovlivnit vnější prostředí tak, aby se vytvořily vhodné podmínky pro jiné mikroorganizmy produkující BA. Také jsou však schopny potlačovat růst jiných mikroorganizmů tvořících biogenní aminy, a to produkcí antimikrobních látek nebo tzv. bakteriocinů, a tím redukovat jejich množství [7, 14, 16]. Výběr vhodného mikroorganizmu, který se použije jako startovací kultura, by proto měl projít analýzou pro zjištění produkce aminů [15].

Přístup kyslíku

Tento faktor je velmi proměnlivý jelikož na vzniku BA se mohou podílet aerobní, anaerobní nebo fakultativně anaerobní mikroorganizmy. Dekarboxylázová aktivita histidindekarboxylázy se inaktivuje v přítomnosti kyslíku [11, 15].

Tvorba biogenních aminů po bakteriální proteolýze se u jednotlivých mikroorganizmů liší. Dekarboxylační enzymy jsou nejčastěji produkovány rody *Bacillus, Clostridium, Citrobacter, Escherichia, Klebsiella, Proteus, Pseudomonas, Photobacterium* a *Shigella*, a bakteriemi mléčného kvašení, jako *Lactococcus, Lactobacillus, Pediococcus* a *Streptococcus*. Tyto mikroorganizmy mohou dekarboxylovat jednu nebo více aminokyselin na příslušné

biogenní aminy. Dekarboxylázová aktivita u tyrozinu a histidinu byla detekována např. u *E. coli* a zástupců rodu *Pseudomonas* [11, 15].

Biogenní aminy mohou být obvykle v potravinách kontrolovány striktním dodržením hygienických požadavků, jak co se týče výchozí suroviny a použitých materiálů, tak podmínek výroby, aby se co nejvíce inhiboval růst nežádoucích mikroorganizmů. K omezení produkce toxických aminů se ve fermentovaných potravinách doporučuje pomalá fermentace s vybranými startérovými dekarboxyláza-negativními kulturaci [12, 15].

2.1.2 Nové metody kontroly vzniku biogenních aminů

Tyto metody zahrnují použití hydrostatického tlaku, ozařování, balení, používání potravinových aditiv a konzervačních látek apod. Většina z těchto postupů nejsou nové, pokud jde o konzervaci potravin, ale nejsou běžně používány při kontrole biogenních aminů. Způsob, který není ještě v současné době uznaný jako metoda konzervace, je použití enzymu diaminooxidázy nebo bakterie produkující tento enzym [13].

2.2 Účinky na lidský organizmus

BA jsou důležité sloučeniny, které se vyskytují v živých organizmech jako metabolické meziprodukty a produkty, které vykazují biologickou aktivitu (viz Tab. 3) [8]. V malých množstvích jsou nezbytné pro celou řadu základních funkcí v organizmu (stabilizace membrán, regulace nukleových kyselin, syntéza bílkovin, apod.). Avšak ve vysokých koncentracích mohou působit toxicky [6, 16]. Mikroorganizmy prokazující dekarboxylázovou aktivity mohou být přidány do potraviny záměrně nebo se tam mohou dostat spontánně. Obecně platí, že běžná hladina BA v potravinách a nápojích nepředstavuje vážnější riziko pro spotřebitele, protože lidské střevo je schopno je metabolizovat pomocí detoxikačních enzymů. Nicméně nadměrný příjem nebo vyšší množství BA mohou způsobit nežádoucí psychoaktivní a vasoaktivní účinky (problémy s dýcháním, bolest hlavy, hypotenze nebo hypertenze, nevolnost, pocení, bušení srdce, apod.) Tyramin a histamin mohou vyvolat zmíněné účinky přímo [17, 18].

V lidském organizmu dochází po požití BA k jejich detoxikaci. Nejprve je absorbují střeva a poté se za pomoci vrátnicové žíly dostávají do jater k jejich metabolizaci a to buď pomocí enzymů aminooxidáz anebo konjugací. Aminooxidázy jako monoaminooxidáza, diaminooxidáza a enzym histamin-N-methyltransferáza působí katalyticky a rozkládají BA za vzniku aldehydů, amoniaku, kyselin a peroxidu vodíku [19].

Putrescin a kadaverin nevykazují přímé toxické účinky, ale v případě, že je jejich koncentrace vyšší, mohou inhibovat detoxikační enzymatický systém jiných aminů. Následně způsobí kolaps systému střeva a mohou se dostat až do krevního oběhu a tím způsobit spoustu nežádoucích účinků [20, 21]. Intestinální detoxikační systém může být také snížen užíváním antidepresiv, antihistaminik, alkoholu nebo genetickou dispozicí daného jedince [17, 19].

Tab. 3: BA, jejich prekurzory, další produkty a biologický význam [22]

Biogenní amin	Prekurzor	Další produkty AMK a transformace aminu	Biologický význam
histamin	histidin		lokální tkáňový hormon, snižuje krevní tlak, sekreci žaludeční šťávy, způsobuje alergické reakce a anafylaktický šok
kadaverin	lyzin		stabilizace makromolekul (nukleových kyselin), subcelulárních struktur (ribozomů), stimulace a diferenciace buněk, rostlinný hormon
putrescin	arginin ornitin nebo citrulin	*N*-methylputrescin, spermidin, spermin	stabilizace makromolekul (nukleových kyselin), subcelulárních struktur (ribozomů), stimulace a diferenciace buněk, rostlinný hormon
agmatin	arginin	putrescin, *N*-methylputrescin, spermidin, spermin	stabilizace makromolekul (nukleových kyselin), subcelulárních struktur (ribozomů), stimulace diferenciace buněk, rostlinný hormon
fenyletylamin	fenylalanin	tyramin, dopamin, adrenalin, noradrenalin	prekurzor tyraminu
tyramin	tyrozin	dopamin, adrenalin, noradrenalin, synefrin, hordenin	prekurzor dopaminu, lokální tkáňový hormon, zvyšuje krevní tlak a kontrakce hladkého svalstva
dopamin	DOPA (dihydroxyfenylalanin)	noradrenalin, adrenalin	mediátor sympatických nervů
tryptamin	tryptofan	serotonin, melatonin	lokální tkáňové a rostlinné hormony (katecholaminy), vliv na krevní tlak, peristaltiku střev a psychické funkce

Nedostatek neurotransmiteru dopaminu v mozku způsobuje Parkinsonovu chorobu, která je doprovázena typickým třesem. Některé třídy aminů, jako jsou indolaminy, katecholaminy a histamin, mají za úkol v těle plnit další důležité metabolické funkce především v ner-

vovém systému a při kontrole krevního tlaku. Histamin se váže přímo na receptory lokalizované na buněčných membránách v kardiovaskulárním systému a v sekrečních žlázách. Díky jeho schopnosti uvolňovat noradrenalin a adrenalin z nadledvin řídí činnost srdce. Histamin také dále působí jako mediátor při alergických reakcích. Například při potravinové alergii vyvolává průjem stimulací peristaltiky ve střevech, způsobuje svědění pokožky a vyvolává bronchiální astma [6].

BA, především polyaminy, mohou být prekurzory karcinogenních N-nitrososloučenin. Jsou schopny reagovat s dusitany za vzniku potenciálních karcinogenů (nitrosaminů). K významnému nárůstu těchto látek v moči dochází po konzumaci potravin s vysokým obsahem aminů a dusičnanů ve srovnání s potravinami s malým množstvím aminů [6, 19].

Uvádí se, že hraniční hodnoty histaminu, kdy se začínají projevovat příznaky toxicity, jsou při překročení 100 mg v 1 kg nebo 1 l potraviny. Avšak existuje i individuální citlivost k různým biogenním aminům a také záleží na přítomnosti dalších toxických látek, množství spotřebované potraviny apod. Proto se hranice toxicity biogenních aminů stanovuje velmi obtížně [18].

2.3 Stanovení biogenních aminů

Analýza biogenních aminů poskytuje informace o tom, zda je potravina čerstvá nebo znehodnocená a také jaká je její potenciální toxicita [7, 9]. Jejich stanovení je docela náročné a vybraná metoda musí splňovat požadavky na citlivost a přesnost. Podstatné je stanovit nejen celkový obsah BA, ale také množství jednotlivých zástupců [11].

Je možno je stanovit pomocí řady analytických technik, jako například kapalinovou chromatografií (HPLC), tenkovrstvou chromatografií (TLC), plynovou chromatografií (GC), kapilární elektroforézou (CE) a infračervenou spektroskopií [9, 10, 19].

U většiny metod se před detekcí provede extrakce vzorku vhodným extrakčním činidlem. Těmi jsou kyselina trichloroctová, kyselina chloristá a kyselina chlorovodíková [7]. Výběr činidla závisí na materiálu, ve kterém mají být biogenní aminy analyzovány. Při samotné extrakci v kyselém prostředí dochází k vyizolování aminů volných i vázaných na komponenty prvotní matrice [7, 14]. Obecně lze říci, že při analýze BA v potravinách je nezbytné daný vzorek napřed homogenizovat a poté lyofilizovat, extrahovat a popř. derivatizovat [19].

2.4 Limity biogenních aminů stanovené legislativou

Maximální přípustné koncentrace biogenních aminů lze stanovit velmi obtížně, jelikož citlivost vůči BA je značně individuální. Jak již bylo zmíněno, schopnost organizmu se detoxikovat závisí především na zdravotním stavu daného jedince, užívání některých léků, genetických predispozicích apod. Pro osoby spadající do rizikových skupin mohou i nízké dávky biogenních aminů způsobit zdravotní komplikace. Tito jedinci by se proto měli řídit podle přísných doporučení a omezit konzumaci daných potravin, nebo je úplně vyloučit ze svého jídelníčku [14].

V evropské unii jsou limity BA stanoveny Nařízením EP a Rady (ES) č. 2073/2005 O mikrobiologických kritériích pro potraviny. Zde jsou vymezeny požadavky na odběr vzorku, analytické metody a limity. Nařízení komise (ES) se zabývá pouze histaminem v produktech z rybolovu, kde je přípustné množství stanoveno na 100 mg/kg [9, 11, 19].

3 ASIJSKÉ PRODUKTY

Rostlinné fermentované potraviny pocházejí z asijských zemí, kde bylo vždy kvůli vysokému počtu obyvatel velmi problematické zajistit výživu živočišnými bílkovinami. Zejména výrobky ze sóje se podílejí vysokým procentem na celkovém množství bílkovin a jsou v mnoha případech alternativou čerstvého masa [2].

V roce 2007 byly v asijských produktech, pomocí kapalinové chromatografie s hmotnostním detektorem, stanoveny vitaminy B_2 a B_6 Výsledky tohoto stanovení jsou uvedeny v Tab. 4 a Tab. 5. Výzkum prokázal zvyšující se obsah těchto vitaminů v průběhu fermentace [2].

Tab. 4: Množství vitaminů ve fermentovaných asijských potravinách [2]

	Tamari	**Shoyu**	**Miso shiro**	**Hatcho miso**
B_2 [mg/100g]	2,067–3,384	3,345–8,927	5,056–17,214	4,552–11,784
B_6 [mg/100g]	0,421–1,88	0,508–1,044	0,388–0,616	0,531–0,967
	Tempeh natural	**Tempeh uzený**	**Tempeh smažený**	
B_2 [mg/100g]	3,863–12,393	3,489–13,098	2,244–15,137	
B_6 [mg/100g]	1,310–2,009	1,260–1,710	1,163–2,865	

Tab. 5: Obsah vitaminů v nezpracované rýži, pšenici a sóji [2]

	Rýže loupaná	**Rýže paraboiled**	**Rýže divoká**	**Sójové boby suché**	**Sójové boby povařené**	**Pšenice**
B_2 [mg/100g]	0,031	0,021	0,192	0,32	0,087	0,73
B_6 [mg/100g]	0,135	0,183	0,461	0,523	0,22	2,22

3.1 Fermentované produkty ze sóje

- **Sója**

Sója je již dlouho považovaná jako cenný zdroj vysoce kvalitních bílkovin (35–38 % v bobech), ze které může být vyrobeno velké množství výrobků. Kvalita sójového proteinu je nyní uznávána v podstatě jako rovnocenná s živočišnými bílkovinami. Z tohoto důvodu, v roce 2000 US Department of Agriculture (USDA), vydal rozhodnutí, které dovoluje kompletně nahradit maso sójou v National School Lunch Program. Před tímto rozhodnutím mohl sójový protein nahradit nejvýše 30 % živočišných bílkovin. V roce 1999, US Food and Drug Administration (FDA) schválilo zdravotní tvrzení, že konzumování sójové bíl-

koviny snižuje množství cholesterolu v krvi. Jediné doporučení ohledně konzumace sóji pochází právě od této zdravotní organizace, která doporučuje příjem 25 g/den pro snížení cholesterolu [23].

Ve srovnání s lipidy a sacharidy jsou proteiny nejdražší surovinou ve výrobě potravin. Sójový protein nabízí širokou škálu funkčních a nutričních produktů, ze kterých si mohou zpracovatelé potravin vybrat takový, aby vyhovoval právě jejich potřebám. Z těchto důvodů se tento typ proteinu stává velmi atraktivní, nutriční, funkční a ekonomickou složkou potravin [24].

Sója jako taková je obtížně stravitelná, ale fermentací se rozloží její proteiny na aminokyseliny, které lidské tělo již dokáže snadno strávit. Tímto byl umožněn vznik tradičních asijských potravin jako je tempeh, sójové omáčky nebo miso [5].

Podle údajů z roku 1998 je produkováno 150 milionů metrických tun sóji a jen cca 10 % z toho je využito pro lidskou výživu. Produkce sóji, jako potraviny, je v Číně 58 %, Jižní Koreji 23 %, Japonsku 17 % a v USA jen 1 % [25].

Fermentované výrobky ze sóje mohou obsahovat různě vysoké hladiny biogenních aminů, především však obsahují tyramin a histamin [14]. Obsahy BA v různých druzích potravin jsou uvedeny v Tab. 6 a v Tab. 7.

Tab. 6: Obsah tyraminu a histaminu ve vybraných skupinách potravin [14]

Potravina	Tyramin (mg / porce)	Histamin (mg / porce)
Ryby	1,8–9,0 / 70 g	0,6–11,5 / 70 g
Sýry	1,0–31,0 / 20 g	0,7–35,0 / 20 g
Maso a masné výrobky	1,7–11,0 / 20 g	0,6–5,5 / 20 g
Zelenina	12,2–33,0 / 200 g	5,0–23,0 / 200 g
Pivo a víno	0,5–3,6 / 100 ml	0,6–1,6 / 100 ml
Fermentované sójové výrobky	1,5–8,0 / 10g	0,8–21,0 / 10g

Koncentrace BA jako histaminu, tyraminu, kadaverinu, putrescinu a spermidinu indikují čerstvost potraviny. Stanovení těchto látek v nefermentovaných nebo čerstvých a zpracovaných potravinách je důležitým ukazatelem nejen kvůli jejich toxicitě, ale také proto, že je to užitečný faktor jakosti potraviny při kažení nebo zrání [12].

Tab. 7: Obsahy biogenních aminů [mg/g] v různých sójových produktech [12]

Potravina	TYM	TRM	HIS	PUT	CAD	PEA	SPM	SPD
Fermentovaná sója	–	–	4,620	12,340	6,340	–	–	–
Tempeh	4,3	15,6	4,1	116,9	–	–	–	11,6
Miso mg/kg	48,6	22,6	0,9	19,8	3,0	4,4	2,2	15,7
Sójová omáčka (tradiční typ) mg/kg	241,6	12,1	225,9	376,9	16,1	13,5	6,6	24,5
Sójová omáčka (moderní typ) mg/kg	594,5	36,6	129,8	56,8	6,1	40,8	1,0	6,3

(tyramin – TYM, tryptamin – TRM, histamin – HIS, putrescin – PUT, kadaverin – CAD, 2-fenyletylamin – PEA, spermin – SPM, spermidin – SPD)

3.1.1 Sójové omáčky (Shoyu)

Tyto produkty jsou speciálním kořením původem z Číny a Japonska, avšak hojně používané v celé jihovýchodní Asii. Vyrábí se s využitím mikroorganizmů, jako je plíseň *Aspergillius oryzae* nebo popřípadě *Aspergillus soyae*. Produktem jsou pak tmavě hnědé tekutiny se slanou, ostrou nebo nakyslou chutí, příjemným aroma, které připomíná masový bujón. Je to potravina bohatá na chuť umami, která se řadí k základním chutím jako je slanost nebo například kyselost. Sójové omáčky jsou sice charakteristické svou slanou chutí, ale mají nižší obsah sodíku než má kuchyňská sůl. Na trhu jsou k dostání i omáčky s ještě sníženým obsahem sodíku a ty jsou vhodnější ke konzumaci. V Japonsku je denní doporučené množství odhadované na 30 ml [2, 26].

Jejich využití je hlavně v dochucování pokrmů, polévek, zeleninových salátů, masných výrobků apod. Chuťové vlastnosti těchto výrobků se však můžou snížit, a to hlavně skladováním při vyšších teplotách, přístupem světla a vzduchu [2, 3, 23, 27].

Tyto omáčky se mohou lišit jak postupem výroby a použitými surovinami, tak i jejich původem. Rozlišují se omáčky ze sóje a jiných škrobovitých cereálií (rýže, pšenice, ječmen), jako je čínské jiangyou a japonské shoyu. Dále ty, které jsou vyrobeny jen ze sóje – korejský ganjang, japonské tamari a indonéský kecap [28, 29, 30].

Podle Japan Agricultural Standards (JAS) se rozlišuje se pět typů shoyu – Koikuchi (KS), Usuchi (US), Tamari (TS), Sai-Shikomi (SSS) a Shiro shoyu (SS), které jsou zobrazeny na

Obrázku 1 [30]. V posledních letech se KS, která představuje asi 85 % z celkové spotřeby v Japonsku, začala konzumovat po celém světě [30].

Obrázek 1: Typy sójových omáček [30]

- **Výroba**

Sójové boby jsou hydratovány, uvařeny vysokým tlakem nebo při vysoké teplotě a rozemlety, zatímco pšenice je jen opražena a rozemleta. Po této úpravě se smísí, přidá se kultura mikroorganizmů a směs se nechá inkubovat. Tímto vzniká tzv. koji a poté díky použité kultuře plísní dochází k produkci enzymů (proteáz), které přemění velké makromolekuly na jednodušší, sloužící jako živiny pro plísně a kvasinky. Dalším krokem je fermentace ve vhodné nádobě, kam se přidá zhruba 20% solný roztok. Získá se kaše, tzv. moromi, která se nechává zrát různě dlouhou dobu, většinou však alespoň 6-8 měsíců, kdy se zhruba 70–80 % sójových a popř. pšeničných proteinů degraduje na volné aminokyseliny. Postupně se začne vyvíjet chuť. Po fermentaci nastává zrání směsi, lisování, rafinace a na závěr pasterizace. Finální produkt se filtruje a plní do lahví [2, 28, 29].

- **Nutriční aspekty**

Mezi nejznámější fyziologické účinky shoyu patří snížení krevního tlaku, podpora žaludeční sekrece a protinádorové účinky. Dále bylo zjištěno, že má antioxidační efekt a protialergenní schopnost. Bylo prokázáno, že orální podávání polysacharidů pocházejících z buněčných stěn sójových bobů je účinné při léčbě pacientů s alergickou rýmou [26, 32].

3.1.1.1 Tamari shoyu

TS je vyrobena pouze ze sóje. Ve srovnání s KS má podstatně výraznější a také slanější chuť, tmavší barvu, vysoký obsah aminokyselin, minerálních látek a stopových prvků. Její viskozita je vysoká a kvůli poměrně kyselé chuti občas může být přislazována třtinovým cukrem. Je vhodná i pro lidi trpící celiakií [2, 29,30].

3.1.1.2 Koikuchi shoyu

Je to tradiční japonský typ sójové omáčky, která se vyrábí ze sóje a pšenice přibližně ve stejném poměru. Její viskozita je nižší než u tamari. Má jemnou slano-sladkou chuť a typickou tmavě červenou barvu [2, 29, 30].

Co se týče existence a růstu jiných mikrobů a bakterií, tak to obecně v sójových omáčkách není možné a to hlavně kvůli koncentraci soli vyšší než 16 %. V tomto prostředí se vyskytují jen tzv. shoyu kvasinky. Studie ukázaly baktericidní aktivitu těchto produktů proti střevní patogenní bakteriím jako jsou patogenní kmeny *E. coli, Vibrio cholerae* a *Salmonella* Typhi [31].

Shoyu obsahují relativně vysoké množství aminokyselin, které mohou být potencionálním zdrojem při vzniku biogenních aminů, viz Tab. 7 [2, 12].

3.1.2 Sójová pasta – miso

U sójových past, stejně jako u sójových omáček, záleží na použitých surovinách a místě původu. Existují čínské doujiang, korejské doenjang a kochujang, japonské miso a indonéské taoco [28]. Tato kapitola se zabývá pouze pastou miso, která byla předmětem analýz v praktické části diplomové práce.

Miso je tradiční fermentovaná pasta pocházející z Japonska a je známá již zhruba 1300 let. Je to velmi populární produkt ze sóje, rýže, případně ječmene a soli, který vzniká díky působení bakterií, plísní a kvasinek. Má různou barvu od žluté až po červenohnědou (viz Obrázek 2) a obvykle se jím dochucují polévky [2, 24, 31].

Výsledná chuť misa je způsobena zejména vyššími alkoholy vytvářejícími estery s mastnými kyselinami ze sóje. Běžně se dá setkat s více druhy těchto past [2].

Jeden šálek misa (zhruba 150 ml) obsahuje 1,2 g NaCl což je méně než jiná oblíbená japonská jídla. Mugi, genmai a hatcho miso obsahují nejvyšší množství soli (10–14 %) a díky tomuto faktu mohou být uskladněny i při pokojové teplotě. Avšak doporučuje se skladovat všechny typy misa na studeném a tmavém místě [26, 31].

- **Výroba**

Při procesu výroby dochází napřed ke zpracování suroviny, která se máčí a poté spaří a chladí. Dále nastává zaočkování kulturou *Aspergillus oryzae*, kdy vzniká koji. Poté se

koji smísí se solí a v některých případech se inokuluje i *Saccharomyces cerevisiae* a bakterie mléčného kvašení (BMK). Směs se nechá fermentovat a zrát. Nakonec dochází k promíchávání a pasteraci produktu. Čím delší je zrací proces, tím je barva misa tmavší [23, 26, 28, 31, 33, 34].

Obrázek 2: Různé druhy miso past (zleva nahoře shiro miso, vedle mugi miso, pod ním hatcho miso a genmai miso)

- **Mikrobiologie**

Pro inokulaci se vedle *A. oryzae* a *S. cerevisiae* používají i mikroorganizmy *Pediococcus halophilus*, *P. cerevisiae*, *Zygosaccharomyces rouxii*, *Candida* a *Enterococcus faecalis* [31, 33].

Analýzu výskytu biogenních aminů v miso pastách pomocí HPLC provedli na Korejské univerzitě Bo Young a Jae-Hyung Mah. Ve většině vzorků byly detekovány nízké hodnoty BA, nicméně některé vzorky obsahovaly HIS a TRM v množství přesahujícím hodnoty, které jsou bezpečné pro lidské zdraví. Variabilitu v obsazích BA lze vysvětlit přídavkem jiných surovin (rýže, ječmen) do miso past. Kontaminace během výrobního procesu je především bakteriemi jako *Bacillus subtilis* a *B. amyloliquefaciens*. Tyto bakterie jsou schopné produkce BA především TRM a SPM [34, 35].

3.1.2.1 Shiro miso

Je vyrobeno z velkého množství rýžového koji (60 %) a tudíž má světlou barvu a obsahuje větší množství sacharidů než jiné druhy (až 36 %). Díky dostatku cukrů fermentace trvá pouze 1–4 týdny. Na druhou stranu se sníží jeho trvanlivost a to na týden nebo maximálně dva týdny při pokojové teplotě, při chladírenských teplotách na dva měsíce. Používá se k přípravě polévek, světlých dressingů a marinád. Má jemnou chuť, měkkou konzistenci a malý obsah soli (5,5 %). Je to jedno z nejdražších miso past [2, 23, 28].

3.1.2.2 Mugi miso

Tento typ miso pasty se vyrábí z ječmene, sóji a ječného koji. Jeho fermentace trvá 12–36 měsíců a tudíž jeho výsledná barva je velmi tmavá a má výraznou slanou chuť. V současnosti mugi miso zahrnuje pouze 11 % z miso past prodávaných v Japonsku avšak jeho popularita stoupá [31].

3.1.2.3 Genmai miso

Je přezdívané jako červené nebo hnědé miso. Vyrábí se z hnědé rýže a jde o nejvíce prodávaný typ misa, které je přirozeně bezlepkové. Zraje přibližně 6–12 měsíců [31].

3.1.2.4 Hatcho miso

Hatcho miso je nejstarší typ miso past. Obsahuje pouze sójové boby a barevně je nejtmavší, jelikož zraje nejdéle (18–36 měsíců). K výrobě tohoto misa se kromě *Aspergillus oryzae* používá i *Aspergillus hatcho*. Jeho textura je nejtužší ze všech typů past, takže se může i krájet nožem. Obsahuje vyšší množství proteinu (21 %) a menší množství sacharidů (12 %) a vody (40 %) [31]. Výborně se hodí do zeleninových polévek nebo luštěnin [23, 28, 35].

3.1.2.5 Nutriční aspekty miso past

V hnědých miso pastách byly identifikovány melanoidiny, což jsou hnědé pigmenty vznikající neenzymatickým hnědnutím při Maillarově reakci. Díky tomu působí jako antioxidanty, čili snižují produkci peroxidů z mastných kyselin v těle a tím pomáhají v boji proti stárnutí. Věří se, že právě japonská dieta a metody přípravy jídla přispívají k dlouhověkosti těchto obyvatel. V roce 1981, Hirayama of Japan National Cancer Center provedlo epidemiologickou studii a zjistili, že konzumace miso polévky denně významně snižuje rakovinu žaludku, gastritidu a srdečních nemoci. Lidé, kteří nejedí miso, mají o 50 % větší riziko

úmrtí z rakoviny žaludku než ti, kteří jedí miso každý den [32, 33]. V roce 2003 Journal of the National Cancer Institute publikoval studii, kdy každodenní jezení miso polévky třikrát denně snížilo výskyt rakoviny prsu u žen až o 40 % [35].

Dále pak bylo objeveno, že alkaloidy v miso pastě odstraňují těžké kovy z lidského těla a díky obsahu linolové mastné kyseliny, rostlinných sterolů a vitaminu E působí kardioprotektivně. Kromě toho tyto pasty obsahují velké množství aktivních enzymů pomáhajících se zažíváním a absorpcí dalších živin. Mikroorganizmy v těchto produktech (hlavně rod *Lactobacillus*) působí proti hnilobným bakteriím ve střevech a rozkládají škodlivé látky v těle [23, 33, 35]. Pravděpodobně nejznámější vlastností miso past je již zmíněný protirakovinotvorný a antimutagenní účinek. Další vlastností je snižování radioaktivity, kdy testy byly prováděny s obyvateli z oblastí napadenými jadernými bombami jako například Hiroshima a Nagasaki [23, 24, 32, 35].

Miso je dobrým zdrojem železa, vápníku, fosforu, sodíku, některých B vitaminů a proteinu. Protože sójové boby obsahují vysoké množství proteinu zahrnující všechny esenciální aminokyseliny nacházející se v rostlinných produktech, může být miso považováno za důležitý zdroj bílkovin pro veganskou dietu [35].

3.1.3 Tempeh

Tempe (indonéský výraz), také nazýván jako tempeh, je dalším z fermentovaných sójových produktů, který pochází z ostrova Jávy a je konzumován hlavně v Indonésii, Singapuru a Malajsii. Je to bílý „koláč“ z loupaných, hydratovaných (namočených) a částečně uvařených sójových bobů. Tradiční tempeh je balen do banánových listů a prodáván na trzích [3, 23, 33, 36, 37, 38]

3.1.3.1 Výroba tempehu

Pro výrobu tempehu je běžně je používána žlutá sója ale v některých oblastech se používá i černá varianta. Nejkvalitnější tempeh je vyroben výhradně ze sóje, ale levnější a méně kvalitnější tempeh může obsahovat papájové kousky, maniok, sójové mléko nebo tofu (tvaroh ze sóji), okaru (vedlejší produkt vznikající při výrobě sójového mléka) a vzácně také kokos [3, 24, 37].

Výroba tempehu probíhá v několika krocích:

1) Očištění a oloupání sójových bobů [3, 37]

Může probíhat suchým nebo mokrým způsobem, který se využívá hlavně v Indonésii. Při očištění se odstraňuje špína, plevel, hmyz, písek apod. [3, 25, 33, 38].

2) Namočení sójových bobů (hydratace a kyselá fermentace) [3, 37]

Tento krok probíhá přes noc a má několik funkcí. Je to především zvýšení obsahu vlhkosti zrn, které činí boby jedlými a umožní mikrobiální aktivitu v průběhu fermentace. Kyselá fermentace je v tropickém podnebí zahájena spontánně. Avšak při výrobě v jiném podnebí se doporučuje přidat mléčnou, octovou nebo jinou organickou kyselinu během namáčení a vaření. Dalším možným způsobem zahájení kyselé fermentace je inokulace *Lactobacillus plantarum, Leuconostoc mesenteroides* nebo jejich směsi, čímž se snižuje pH na hodnoty kolem 4 a dochází k zamezení růstu nežádoucích mikroorganizmů. Může se zde totiž objevit *Staphylococcus aureus* a *Clostridium botulinum*, které mohou produkovat toxiny. Dále se zde může nacházet *Bacillus cereus, Salmonela* sp., *Enterobacter aerogenes* a *E. coli* [3, 33, 38]. Laboratorní testy, při kterých byly do tempehu úmyslně přidávány kontaminující mikroorganizmy, ukázaly, že přídavek mléčných bakterií při kyselé fermentaci inhiboval růst *Bacillus cereus*, zástupců čeledi *Enterobacteriaceae* a *Listeria monocytogenes*. Nicméně u *Staphylococcus aureus* nedošlo k inhibici růstu, ale alespoň nebyl schopen produkovat měřitelné hodnoty enterotoxinů [25].

3) Částečné uvaření sójových bobů (po dobu 60 min) [3, 37]

Povařením se zničí kontaminující bakterie a inhibitor trypsinu a uvolní se některé živiny důležité pro růst startérové směsi [38].

4) Zchlazení a sušení bobů [3, 37]

Jedním ze způsobů zchlazení je rozprostření horkých fazolí na plech, aby pára mohla volně unikat a došlo k rychlejšímu ochlazení na cca 20–25°C a odstranění přebytečné vlhkosti [3, 33]. Další způsob je použití chladné vody nebo ventilátoru [25].

5) Inokulace [3, 37]

Sójové boby se inokulují zhruba 10^4 CFU/g (colony forming units) startérovou směsí obsahující hlavně *Rhizopus microsporus* var. *oligosporus*, *Rhizopus oryzae* a někdy *Mucor* spp. Nižší množství startérové kultury by způsobilo nepravidelný růst, delší fermentaci a vyšší šanci výskytu kontaminujících bakterií. Po smíchání bobů se směsí se musí zabezpečit pří-

stup kyslíku. K tomu se nejčastěji používají plastikové sáčky, které jsou proděravěny anebo banánové listy. Avšak příliš velká perforace obalového materiálu vede k vyschnutí sóji a tím i inhibici růstu plísně [2, 3, 23, 33, 36, 38].

6) Inkubace směsi [3, 37]

V tomto kroku se směs nechá inkubovat po dobu 38–40 hodin při teplotě 25–37°C. S vyšší teplotou se zvyšuje i nárůst plísně, avšak podmínky produkce mohou být různorodé. Hlavní je poskytnout dostatek, avšak ne přebytek, vlhkosti, kyslíku a tepla [2, 3, 33, 38].

7) Balení a distribuce [3]

Prodává se čerstvý nebo zmrazený v mnoha supermarketech a specializovaných obchodech se zdravou výživou [23].

Proces výroby se může lišit, podle místa kde je tato potravina produkována.

3.1.3.2 Využití mikroorganizmů při fermentaci tempehu

Fermentace tohoto produktu je velmi podobná fermentaci sýru. Plíseň roste nejen na povrchu bobů, ale také skrz ně a tím vytváří pevnou strukturu [3]. Při kvašení se zvyšuje odolnost k autooxidaci, odstraňuje se nepříjemná luštěninová chuť a dochází ke změkčení struktury bobů díky celulolytickým enzymům. Jak proces pokračuje, plísně rodu *Rhizopus* produkují enzymy – lipázy, proteázy a další. Díky těmto enzymům dochází k hydrolýze proteinů a lipidů, chuť se stává výraznější a bílá barva se stává stále tmavší díky produkci spor plísně. Nový produkt má velmi limitovanou expirační dobu a postupně se změnou barvy se vytváří i amoniový zápach [2, 3, 25, 39].

V Indonésii jsou používány startérové kultury (laghi, usaruh), které obsahují plísně *Rhizopus, Aspergillus, Mucor, Actinomucor, Amylomyces, Penicillium, Neurospora, Monascus,* také bakterie jako *Lactobacillus, Streptococcus, Leuconostoc, Acetobacter, Bacillus, Pediococcus* a kvasinky *Saccharomyces, Endomycopsis, Candida, Hansenula, Torulopsis*. Takže tempeh je produkt vznikající kombinací všech těchto kultur. Předpokládá se, že rozmanitější startérové kultury povedou k vývoji tempehu s lepšími funkčními účinky [3, 32, 33, 37].

Byl prokázán inhibiční efekt *Rhizopus oligosporus* na produkci karcinogenů (aflatoxinů) produkovaných plísněmi jako je *Aspergillus flavus* [32, 33]. Čerstvý tempeh obsahuje vy-

soké množství mezofilních bakterií, enterobakterií, stafylokoků a kvasinek. V průběhu skladování v lednici se zde objevují i psychrotrofní bakterie. Vzhledem k přídavku mléčných bakterií v průběhu hydratace sóji je zde přítomno vysoké množství těchto bakterií. Toto okyselení způsobí redukci přirozené mikroflóry, jako jsou enterobakterie (*Klebsiella pneumoniae*) a kvasinek [12].

Hodnoty biogenních aminů jako tyramin, putrescin a kadaverin u tohoto produktu mohou být nízké i vysoké, v závislosti na výrobním procesu, použité kultuře mikroorganizmů a skladovacích podmínkách. Také pak záleží na závěrečné úpravě tempehu (vaření, dušení nebo smažení v oleji) [12, 15].

3.1.3.3 Nutriční aspekty a konzumace tempehu

Čerstvý fermentovaný tempeh má čisté hříbkové aroma a po tepelné úpravě (nejčastěji smažení) se stává oříškové a pikantní díky přítomnosti volných mastných kyselin. Konzumuje se nakrájený na tenké plátky, pokapaný sójovou nebo rybí omáčkou a smažený. Také může být nakrájen na kousky a použit jako náhrada masa v polévce s brambory, pálivou paprikou a jinou zeleninou [24, 33, 36, 38, 40].

Tab. 8: Procentuální množství proteinu v tempehu a různých potravinách [38]

Potravina	Hmotnostní procenta
Sójová mouka (odtučněná)	51
Tempeh	43
Sójová mouka (celozrnná)	40
Suché sójové boby	35
Sýr	30
Ryby	22
Kuře	21
Hovězí (steak)	20
Hamburger	13
Vejce	13
Pšenice	12
Tofu	8
Hnědá rýže (nevařená)	8
Mléko	3

Tempeh má vysoký obsah proteinů (Tab. 8 a Tab. 9) a vlákniny. Obsahuje také, polynenasycené mastné kyseliny, ergosterol (prekurzor vitaminu D) a jsou zde přítomné isoflavono-

vé aglykony (jedna z forem isoflavonoidů) [40]. Isoflavony jsou klasifikovány jako fyto-estrogeny, protože se váží na estrogenové receptory, ale jsou to komplexní molekuly, které mají nehormonální účinek. Považují se za biologicky aktivní látky důležité pro lidské zdraví. Kvůli jejich vlastnostem jsou možnou alternativou ke konvenční hormonální terapii. Z tohoto důvodu mnoho žen v období menopauzy konzumuje právě sójové produkty, jako je tempeh, tofu nebo sójové mléko. Navíc snižují i riziko chronických nemocí, jako například kardiovaskulárních onemocnění, osteoporózy, rakoviny prostaty, prsu a střeva. Bylo zjištěno, že hladina aglykonů stoupá spolu s délkou fermentace [32, 33, 39, 40,].

Kromě vysoké nutriční hodnoty byla potvrzena i jeho antioxidační aktivita a dále pak je snadno stravitelný, [23, 32, 33, 35].

Tab. 9: Kvalita proteinu [NPU – čistá využitelnost bílkoviny] v tempehu a různých potravinách [38]

Potravina	**NPU [%]**
Vejce	94
Ryby	80
Tempeh, pšenice a sója	76
Cottage sýr	75
Sójové boby (čerstvé, zelené)	72
Hnědá rýže	70
Sýr	70
Pšeničné klíčky	67
Hovězí a hamburger	67
Ovesná kaše	66
Tofu	65
Kuře	65
Sójové boby (suché) a sójová mouka	61
Sójové klíčky	56
Arašídy	43
Čočka	30

Díky fermentaci se v tempehu zvyšuje obsah vitaminů B_{12}, B_2, B_6, kyseliny pantotenové, nikotinové a kyseliny listové. Následný výzkum ukázal, že vitamin B_{12} není produktem *Rhizopus*, jak se prve vědci domnívali, ale bakterie *Klebsiella pneumoniae* [3, 32, 33, 38]. Za běžných okolností 1 g sóji obsahuje méně než 1 ng tohoto vitaminu. Avšak v tempehu se nachází 0,4–6,2 μg/100 g. Denní doporučené množství B_{12} je 0,1–1,0 μg pro dospělé, což znamená, že konzumace 100 g tempehu denně splní tyto požadavky [33]. Z tohoto

důvodu se tato potravina doporučuje zařadit do jídelníčku i při prevenci chudokrevnosti [3].

3.2 Rýžové octy

Ocet je jeden z nejběžnějších a nejpoužívanějších zředěných roztoků kyseliny octové. Může vznikat z různých druhů surovin (víno, jablečný mošt, rýže atd.) pomocí různých druhů fermentačních metod. Podle typu výchozích materiálů se dělí do tří kategorií: zeleninové octy (rýžový, cibulový a rajčatový atd.), ovocné octy (jablečný, mangový, ananasový atd.) a živočišné octy (medový, syrovátkový). Jejich kvalita je dána mnoha faktory, zejména jakostí výchozí suroviny a rozmanitostí mikrobiální flóry použité při výrobě [41].

Rýžový ocet je tradiční dochucovadlo pocházející z doby cca 2000 př. n. l. z Číny, odkud se dále rozšířil do Japonska a Koreje. Je vyroben z fermentovaného rýžového vína (sake v Japonsku). Je chuťově jemnější a sladší než octy ze západních zemí. Rozlišují se tři typy [26, 42, 43]:

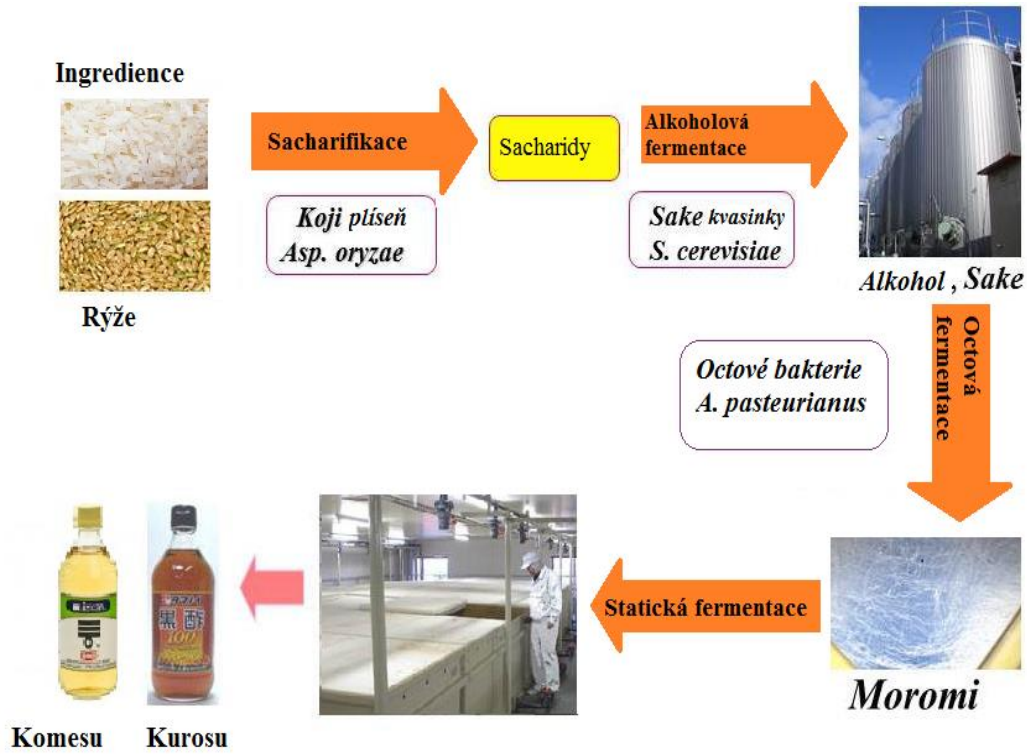
- **žlutý** (komesu) – vyráběný z bílé rýže, která je zbavena všech obalových vrstev obilky; je používaný hlavně v sladko-kyselých jídlech,
- **červený** (kasusu) – vytvořen z kalů sake; uplatňovaný při přípravě vařeného kraba v Číně, jeho kyselost je 4,2–4,5 %,
- **černý** (kurosu) – vyráběn z hnědé rýže, která obsahuje klíček a část povrchových vrstev; užívá se vnitřně jako nápoj s léčebnými účinky.

3.2.1 Výroba komesu a kurosu

Komesu je žlutý, téměř bezbarvý japonský rýžový ocet používaný v různých jídlech jako je sushi rýže, populárním salátu z mořských řas nebo k nakládání zeleniny [26, 42]. Je skoro bez chuti, jelikož obsahuje jen 4,2–4,5 % kyseliny. Vyrábí se z nelepkavé rýže „Japonica“ nebo dovážené „Indica“. Původně byl komesu vyráběn v Izumi (Osaka) a poté se rozšířil po celém Japonsku [42]. V dnešní době je běžně dostupný na trzích po celém světě.

Komesu a kurosu jsou vyrobeny stejným procesem (viz Obrázek 3) a to pomocí statické fermentace. Je to tradiční metoda, při které se směs nemíchá a ani není provzdušňována. Rýže se uvaří a inokuluje *Aspergillus oryzae*, čímž se vytvoří koji. Pak nastává sacharifikace. Rýže obsahuje polysacharid škrob, který se musí napřed přeměnit na jednodušší sacharidy, glukózu a maltózu. Je tedy degradován na jednoduché cukry díky enzymu amylá-

ze, která je produkovaná z koji. Po procesu sacharifikace je směs uložena v nádobách opatřených víkem, což je považováno za dostatečné opatření proti bakteriální kontaminaci. Zde dále dochází k alkoholové fermentaci, kdy se cukry přemění na alkohol pomocí *Saccharomyces cerevisiae* [26, 43]. Vzniká sake, které po příliš dlouhé fermentaci začne mít kyselou chuť. To je způsobeno přirozeně se vyskytujícími mléčnými nebo octovými bakteriemi metabolizujícími alkohol na kyselinu octovou. Tento proces se nazývá octová fermentace. Octové bakterie (nejčastěji *Acetobacter pasteurianus*) nemohou žít bez kyslíku, takže se drží na povrchu směsi tzv. moromi, kde po pár dnech vytvářejí tenkou vrstvu. Po skončení fermentace se tyto disky octových bakterií vyjmou a mohou se použít na další várku, čímž se urychlí celý proces zrání. Nakonec se moromi se přefiltruje a vzniklý ocet se plní do lahví [26, 43, 44].



Obrázek 3: Postup při výrobě rýžových octů komesu a kurosu [42]

Komesu musí obsahovat více než 40 g/l rýžových zrn a kurosu 180 g/l. Tyto octy jsou obecně vyráběny fermentací trvající déle než jeden měsíc. Syntetické rychle vyráběné octy, jsou zakázané značit jakou kvašené podle JAS [42, 45].

3.2.2 Výroba kasusu

Díky tomu, že je kasusu vyráběn z kalů sake, což je vlastně odpadový materiál, je tento ocet ekonomicky cenný produkt. Kasusu je také vyráběn statickou fermentací, avšak už zde není potřeba provádět alkoholové kvašení. K vytvoření moromi se použije extrakt z kalů sake, který se smíchá s alkoholem (finální obsah alkoholu je kolem 5 %) a poté se mírně okyselí octem. Nakonec se přidají disky octových bakterií a směs se nechá fermentovat [42].

3.2.3 Vývoj mikroflóry rýžových octů

V minulosti bylo sake v Číně vyráběno ze sladu a různých druhů koji. V dnešní době se pro výrobu sake používá koji *Aspergillus oryzae* nebo *Rhizopus* dohromady s různými druhy rýže. Němečtí vědci izolovali několik druhů *Rhizopus* z čínského sake a jeden z těchto druhů měl silnou sacharolytickou schopnost. Kromě *Aspergillus* a *Rhizopus* jsou také *Monascus* a *Mucor* známé jako koji vytvářející plísně. K produkci červeného octu je využíván *Monascus purpureus* [42].

V Japonsku je *A. oryzae* velmi často používán k sacharifikaci bílé rýže a sake kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* pro alkoholovou fermentaci. V některých případech se místo *A. oryzae* aplikují *A. awamori, A. usami* [42].

Hlavní druhy octových bakterií používaných při výrobě octa jsou *Acetobacter aceti, Acetobacter pasteurianus* nebo *Gluconacetobacter xylinus*. Identifikace všech druhů a jejich charakterizace je důležitá při stabilizaci fermentačního procesu. V posledních letech se k jejich identifikaci začaly používat metody molekulární biologie, jako je PCR (polymerázová řetězová reakce), RAPD (random-amplified polymorphic DNA) a REP element-PCR (repetitive sequence-based PCR). [42, 43]. Z výzkumu identifikace mikroorganizmů v průběhu fermentace, který provedli Nanda et al. (2001) vyplývá, že při tradiční výrobě octa se spontánně vytvoří téměř čistá kultura bez nutnosti přečištění. Tento objev potvrdil správnost tradiční metody. Je třeba zdůraznit, že všechny procesy kvašení by měly být dobře kontrolovány a také by se měla pro zásobování a čištění nádob používat jen čistá voda [43].

3.2.4 Nutriční aspekty rýžových octů

Kurosu se vyrábí z neloupané rýže a tudíž obsahuje vyšší množství aminokyselin a organických kyselin než ostatní octy. Nedávno bylo prokázáno, že extrakt z tohoto typu octa

efektivně potlačil oxidaci lipidů a tím se potvrdila jeho antioxidační vlastnost. Z pokusů provedených na laboratorních krysách vědci zjistili, že kurosu působí na snížení krevního tlaku. Dokonce vykazoval protinádorovou aktivitu u modelu myší kůže s karcinogenezí. Výsledkem byl tlumivý účinek na růst různých nádorových buněk [26, 44, 46].

Obecně jsou rýžové octy známé pro jejich účinky proti zánětům a hypertenzi [44].

3.3 Kimči

Kimči je typické korejské jídlo, které se připravuje z nakládané fermentované zeleniny jako pekingské zelí, ředkev, jarní cibulka a tuřín. Tato metoda umožní uchování čerstvosti a textury dané suroviny i v zimním období, kdy čerstvá zelenina není dostupná. Technologie výroby kimči sahá až do 3. století [3, 5, 47].

O původu kimči vede Korea s Japonskem mezinárodní spor. Japonci totiž vyvinuli produkt hodně podobný korejskému kimči, kde nahradili fermentaci přídavnými látkami jako je kyselina citronová. Tohle „pseudokimči“ má jemnější chuť a je levnější, jelikož nepotřebuje žádný čas k dozrávání. Nakonec Codex Alimentarius Commission (tvůrce mezinárodních potravinářských norem) vydal rozhodnutí, kde korejskou variantu označil za mezinárodní standard [5].

3.3.1 Výroba kimči

Čerstvé pekingské zelí je přepůleno nebo nasekáno na větší kousky a namočeno v roztoku se zhruba 10% koncentrací soli po dobu 2–7 hodin nebo přes noc. Poté je opláchnuto vodou a necháno okapat. Nejčastěji se do něj přidává česnek, červená paprika, zelená cibule, chilli papričky, sůl, rybí omáčka, zázvor, jeotgal (fermentované plody moře) v různých kombinacích, takže má obrovské množství variant, které mají své vlastní biochemické, nutriční a organoleptické vlastnosti [3, 5, 47, 48, 49]. Dále zde mohou být přidány další suroviny na základě ekonomické situace, sezónní a regionální dostupnosti anebo rodinné tradice. Těmito surovinami může být řeřicha, listy hořčice, hruška, jablko, piniové oříšky, kaštany, obiloviny, různé druhy ryb a masa [3]. Po smíchání všech ingrediencí je kimči natlačeno do hliněné nádoby uložené v zemi, kde díky kamenu vloženému dovnitř je směs pořád ponořena ve vlastní šťávě. Poté nastává anaerobní fermentace. Zde začínají pracovat bakterie mléčného kvašení, které produkují různé sloučeniny včetně organických kyselin (mléčné, octové), oxidu uhličitého, etanolu, vitaminů, bakteriocinů, prebiotik, aromatic-

kých látek, manitolu a aminokyselin, které přispívají k senzorickým a zdravotním benefitům kimči [3, 49, 50].

Fermentace je ovlivněna různými faktory, jako je teplota, koncentrace soli, délka zrání a přítomnost určitých ingrediencí [48, 50]. Teplota je nejdůležitější faktor při výrobě kimči. Je preferována nižší teplota (okolo 2–6 °C). Bakterie mléčného kvašení rostou více při vyšší teplotě, což má za následek rychlé snížení pH. Běžně se pH pohybuje mezi 4,2 až 4,5 [48, 49, 50, 51]. Koncentrace soli je dalším z faktorů ovlivňujícím fermentaci a mikroflóru kimči. Solení zelí bývá od 6 do 7 % po dobu 12 hodin nebo 15 % po dobu 3 až 7 hodin následované oplachem. Optimální koncentrace soli během fermentace je přibližně 3 %, což je příznivé pro růst BMK [48, 49].

3.3.2 Vývoj mikroflóry kimči

Spontánní kvašení bez použití startérových kultur vede k růstu různé mikroflóry při přípravě kimči, což velmi ztěžuje řízení fermentačního procesu. Dále na mikroorganizmy působí i vliv přidávaných ingrediencí, takže variací je opravdu mnoho a je skoro nemožné je všechny identifikovat a kontrolovat. Taxonomické studie izolovaných bakterií získaných z kimči ukazují, že bakterie mléčného kvašení včetně druhů *Leuconostoc* (*Le. mesenteroides, Le. kimchii, Le. citreum, Le. carnosum, Le. gasicomitatum, Le. inhae, Le. miyukkimchii* a *Le. gelidum*), druhů *Lactobacillus* (*Lb. brevis, Lb. curvatus, Lb. plantarum a Lb. sakei*) a dále *Lactococcus lactis, Pediococcus pentosaceus, Weissella confusa, W. cibaria, W. soli, W. kimchii* a *W. koreensis* jsou klíčové bakterie zodpovědné za fermentaci kimči [48, 49, 50, 51]. Kvasinky izolované z kimči byly identifikovány jako *Saccharomyces, Torulopsis, Debaryomyces, Pichia, Rhodotorula, Endomycopsis, Kluyveromyces, Cryptococcus, Trichospora*. Jako důsledek počátečního máčení v solance byl však v tomto produktu redukován počet kvasinek, aerobních bakterií a plísní [3].

Na začátku fermentace zde byly nalezeny dominantní *Weisella koreensis* a *Lactobacillus brevis* a ve fázi, kdy už je kimči přezrálé, převládal *Leuconostoc gelidum a Le. gasicomitatum*, kteří jsou více tolerantní ke kyselému prostředí než například *Le. mesenteroides* a *Le. citreum*, [47, 48, 49].

Použití dalších ingrediencí a koření působí na BMK v kimči protože jsou to vlastně potenciální zdroje jejich výskytu. Česnek může být jejich důležitým zdrojem, a jelikož obsahuje sacharidy a další živiny, tak může zvyšovat i jejich růst. Červená paprika jako koření ve

formě prášku zpomaluje fermentaci, podporuje růst *Weissella* spp. a naopak redukuje růst *Leuconostoc* a *Lactobacillus* [49].

Produkce bakteriocinů v kimči je důležitá, protože mohou zabránit kažení, přezrání a inhibovat růst patogenů z potravin. Použití *Leuconostoc* a *Lactobacillus* jako startovacích kultur inhibuje růst *E. coli* a gram-negativních bakterií v průběhu fermentace kimči [49]. Nedávno byla dokonce směs *Le. kimchii* patentována jako kosmetický konzervační prostředek. V patentu se uvádí, že tato směs působí proti gram-pozitivním, gram-negativním bakteriím a také plísním. [3, 55]

Bylo zjištěno, že po přidání *Le. mesenteroides* jako kimči startéru dochází k urychlení kvašení. Z těchto důvodů je zjevné, že kvalita kimči a jeho mikroflóra mohou být řízeny pomocí startovacích kultur [49].

Probiotické kultury používající se v jogurtu potřebují být zvláště odolné proti kyselým podmínkám jelikož pH těchto výrobků je většinou kolem 4,5 a nižší. Je hlavně požadováno, aby byly odolné vůči žaludečním kyselinám. Tyto požadavky by mohly splnit právě bakterie izolované z kimči [54].

Hlavní metabolickou činností mikroorganizmů je při fermentaci kimči tvorba laktátu, acetátu, oxidu uhličitého a manitolu. Nicméně další minoritní organické sloučeniny jako diacetyl, acetoin, acetaldehyd, sekundární alkoholy, estery a laktony jsou také produkovány ze sacharidů a mastných kyselin kimči mikroflórou. Aromatické sloučeniny, stejně jako hlavní metabolity, přispívají k typickým organoleptickým vlastnostem kimči [49].

Ve studii provedené Mheen a Kwon (1984) bylo objeveno, že v době kdy mělo kimči pH 4,2 a BMK dosáhly ve třetím dnu fermentace při 20 °C 0,6 % (v/v) bylo kimči nejchutnější [54].

- **Biogenní aminy**

Koncentrace biogenních aminů byla stanovena ve 24 komerčních vzorcích u osmi různých druhů kimči a množství těchto látek byla nižší než úroveň ohrožující lidské zdraví. Nejvyšší množství bylo 151 mg/kg kadaverinu ve vzorku kimči z pekingského zelí [33].

3.3.3 Nutriční aspekty a konzumace kimči

Kimči může být považováno za rostlinnou probiotickou potravinu, která má stejné zdravotní výhody jako jogurt z mléka s přídavkem probiotických bakterií. Výzkumy podložené zdravotní účinky jsou hlavně protirakovinné a proti obezitě. Dále pomáhá proti procesu stárnutí, vysokému krevnímu tlaku, cukrovce, ateroskleróze, snižuje hladinu cholesterolu, podporuje imunitu, nervový systému a zdraví pokožky [3, 33, 52]. Je dobrým zdrojem přírodních antioxidantů, jako jsou karotenoidy, vitaminy a flavonoidy [47, 53]. V kimči vyrobeném z pekingského zelí se v závislosti na stupni fermentace liší obsah vitaminů B a C. Maximální koncentrace těchto vitaminů byla zaznamenána v kimči zrajícím zhruba tři týdny. Avšak u kimči vyrobeného z jiných hlavních ingrediencí (okurek, ředkev) bylo detekováno maximální množství vitaminu C už 4–5. den zrání [3, 33].

Některé studie naznačují, že bakterie mléčného kvašení v kimči mají důležitou funkci v imunitním systému člověka tím, že mohou aktivovat specifické a nespecifické mechanizmy, což má za následek hlavně protinádorové účinky. Příjem *Lb. acidophilus* může snižovat přeměnu žlučových kyselin na sekundární žlučové kyseliny, které se považují jako promotéry nádorů. Tento kmen může být použit jako efektivní přírodní antioxidant a má ochranný účinek na buňky [54, 53]. Geny podílející se na syntéze vitaminů skupiny B (například riboflavinu a kyseliny listové) byly nalezeny v genomu *Le. mesenteroides* a *Lb. sakei*, což znamená, že BMK v kimči mohou produkovat vitaminy během fermentace. [49] Další z účinků pozitivně ovlivňujících zdraví spojených s BMK je např. antimutagenní aktivita, prevence zmírnění alergií a inhibice růstu *Helicobacter pylori* [33, 49].

V roce 2011 Jung et al. provedli výzkum s 22 obézními pacienty, kterým byla po dobu čtyř týdnů připravovaná jídla obsahující 300 g kimči denně. Jedna skupina pacientů konzumovala fermentované kimči (kvašené 10 dnů) a druhá skupina čerstvé (kvašené 1 den). Bylo zjištěno, že u obou skupin došlo k poklesu tělesné hmotnosti, ale snížení obsahu tělesného tuku bylo zaznamenáno jen u skupiny pacientů, kteří konzumovali právě fermentované kimči [53].

Podle Korejského potravinářského ústavu Korejci snědí více než 125 g kimči denně. Tvrdí se, že existuje až 200 druhů kimči, které jsou podomácku vyrobeny s použitím tradičních metod [5, 54]. Většinou se podává s dušenou rýží jako každé korejské jídlo [3, 52]. Čerstvé se může konzumovat jako salát často smíchaný se sezamovým olejem a cukrem [33].

V poslední době začali Korejci konzumovat přezrálé kimči, které se fermentuje při nízké teplotě 6 měsíců až 3 roky a má tak charakteristickou chuť. Z výzkumu provedeného Konkuk univerzitou v Soulu v roce 2011 vyplývá, že antioxidační aktivita u přezrálého kimči byla výrazně vyšší než u kimči fermentovaného méně než 7 dní. Výsledky této studie naznačují, že k navýšení této antioxidační aktivity došlo právě při kvašení a zrání. [47]. Toto přezrálé kimči se nejčastěji vaří s masem a vzniká tzv. jjigae [33].

Chuť kimči je ovlivněna hlavně obsahem jednoduchých cukrů, aminokyselin a organických kyselin. Hlavní cukry přítomné po fermentaci jsou glukóza a fruktóza. Tyto cukry jsou velmi důležité, protože také poskytují zdroj uhlíku pro mikroorganizmy. Jejich množství v první fázi kvašení klesá jen pomalu, ale po zhruba 16 až 32 dnech klesá velmi rychle. Dále zde bylo nalezeno značné množství manitolu, který vzniká redukcí fruktózy díky BMK v průběhu fermentace. Přítomnost manitolu dodává potravinám osvěžující chuť, navíc chrání před zubním kazem a je dobrou náhradou za cukr v diabetických potravinách [48].

Kimči stává globálně populární nejen díky jeho chuti, ale hlavně kvůli jeho zdravotním účinkům. Trh s touto potravinou se neustále zvyšuje, v roce 2012 byl výdělek zhruba 2 300 milionu USD. Společnosti začaly uznávat nutnost průmyslové výroby a startérové kultury se staly předmětem mnoha spekulací [49]. Účelem těchto startérů do kimči je hlavně zlepšení senzorických vlastností, prodloužení doby skladovatelnosti a dosažení funkčnosti a jednotné kvality [50]. Jsou tedy prováděny genetické manipulace nebo mutagenní procedury poskytující těmto startérům nové fyziologické funkce nebo vlastnosti, které by měly vést k jejich zlepšení a funkčnosti. Nicméně tyto manipulace mají v potravinářském průmyslu některá omezení včetně sympatií či antipatií spotřebitelů ke geneticky modifikovaným organizmům (GMO) [49].

II. PRAKTICKÁ ČÁST

4 CÍL PRÁCE

Cílem této práce byla mikrobiologická analýza a monitoring biogenních aminů ve vybraných asijských fermentovaných produktech v daném časovém období a při daných teplotních podmínkách.

V teoretické části bylo potřeba popsat:

- Fermentaci potravin
- Vznik biogenních aminů, zdravotní rizika spojená s jejich konzumací
- Vymezit faktory ovlivňující tvorbu biogenních aminů
- Charakterizovat asijské produkty a vyhodnotit možný vznik BA

V praktické části bylo nezbytné:

- Provést mikrobiologickou analýzu vybraných asijských fermentovaných produktů
- Stanovit obsahy biogenních aminů v jednotlivých vzorcích
- Sledovat změny v množství a zastoupení BA ve vzorcích v průběhu skladování
- Na základě zjištěných dat formulovat závěr

5 MATERIÁL, POMŮCKY A METODY

5.1 Charakteristika použitých materiálů

Celkem bylo použito 11 druhů fermentovaných asijských produktů různé konzistence. Každý výrobek byl zakoupen třikrát, jelikož byl skladován při třech různých teplotách. V Tab. 10 jsou vzorky vyjmenovány a označeny kódem, pod kterým se budou v dalším textu označovat.

Tab. 10: Charakteristika použitých vzorků

Výrobek	Konzistence	Kód	Složení
Genmai miso	polotuhá	MG	sójové boby, hnědá rýže, mořská sůl, voda fermentační kultura
Hatcho miso	polotuhá	MH	sójové boby, voda, mořská sůl, pražená ječmenná mouka, fermentační kultura
Mugi miso	polotuhá	MM	sójové boby, ječmen, voda, mořská sůl, fermentační kultura
Shiro miso	polotuhá	MS	rýže, voda, sójové boby, mořská sůl, sladký bramborový sirup, alkohol, fermentační kultura
Koikuchi shoyu	tekutá	KS	voda, sójové boby, pšenice, mořská sůl, fermentační kultura
Tamari shoyu	tekutá	TS	sójové boby, mořská sůl, destilované Sake, fermentační kultura
Komesu	tekutá	K	ocet z rýžového alkoholu, voda
Kimči	tuhá	KIM	čínské zelí, hrubá sůl, ředkev vodní, řeřicha, jarní cibulka, lístky hořčice, ústřice, koření: mleté červené papričky, solená šťáva z ančoviček, solené krevety, cukr, česnek, zázvor
Tempeh marinovaný	tuhá	TM	sójové boby, ušlechtilá plíseň, slunečnicový olej, sójová omáčka
Tempeh natural	tuhá	TN	sójové boby, mořská sůl, fermentační kultura
Tempeh party	tuhá	TP	sójové boby, ušlechtilá plíseň, slunečnicový olej, sójová omáčka, česnek
Tempeh indonesia	tuhá	TI	sójové boby, mořská sůl, fermentační kultura

S těmito vzorky byla provedena jak mikrobiologická analýza, tak i kvantitativní a kvalitativní analýza biogenních aminů. Se vzorkem tempeh indonesia byl proveden pouze mikrobiologický výzkum v Indonésii. Tento vzorek byl zakoupen v místní výrobně, kde byl tempeh vyráběn ve špatných hygienických podmínkách (viz Obrázek 4) a poté prodáván na místních trzích.

Obrázek 4: Výrobna tempehu v Indonésii

5.2 Mikrobiologická analýza

V experimentální části byla provedena mikrobiologická analýza s cílem zjistit počet mikroorganizmů na příslušných selektivních půdách v průběhu skladování při různých teplotních podmínkách.

- **Použité agary:**

PCA – Plate Count Agar (HiMedia)

Používá se pro stanovení počtu mikroorganizmů ve vodě a potravinách.

Složení:

Enzymatický hydrolyzát kaseinu ..... 5,0 g/l

Kvasničný extrakt ..... 2,5 g/l

Glukóza ..... 15,0 g/l

Agar ..... 15,0 g/l

Konečné pH (25 °C) 7,0 ± 0,2

Příprava:

Bylo naváženo 23,5 g směsi do 1000 ml destilované vody. Po rozpuštění byla směs sterilizována v autoklávu při teplotě 121 °C po dobu 15 minut a poté za aseptických podmínek rozlita na Petriho misky. Kultivace probíhala při 30 °C po dobu 48h.

CHYGA - Chloramfenicol Yeast Glucose Agar (HiMedia)

Je určen k detekci a stanovení počtu kvasinek a plísní v potravinách. Kvasničný extrakt a glukóza podporují růst kvasinek a plísní, zatímco chloramfenikol potlačuje růst kontaminujících bakterií.

Složení:

Kvasničný extrakt ..... 5,0 g/l

Glukóza ..... 20,0 g/l

Chloramfenikol ..... 0,1 g/l

Agar ..... 15,0 g/l

Konečné pH (25 °C) 6,6 ± 0,2

Příprava:

Bylo naváženo 41,1 g směsi do 1000 ml destilované vody. Po rozpuštění byla směs sterilizována v autoklávu při teplotě 121 °C po dobu 15 minut a poté za aseptických podmínek rozlita na Petriho misky. Kultivace probíhala při 23 °C po dobu 120h.

MRS – De Man Rogosa Sharpe Agar (HiMedia)

Používá se pro detekci mléčných tyčinek rodu *Lactobacillus*.

Masový pepton ..... 10,0 g

Hovězí extrakt ..... 10,0 g

Kvasničný extrakt ..... 4,0 g

Dextróza ..... 20,0 g

Hydrogenfosforečnan (di)draselný ..... 2,0 g

Polysorbát 80 ..... 1,0 g

Citran sodný ..... 5,0 g

Octan sodný ..... 5,0 g

Heptahydrát síranu hořečnatého ..... 0,1 g

Tetrahydrát síranu manganatého ..... 0,05 g

Agar ..... 15,0 g

Konečné pH (25 °C) 6,5 ± 0,2

Příprava:

Bylo naváženo 67,15 g směsi do 1000 ml destilované vody. Po rozpuštění byla směs sterilizována v autoklávu při teplotě 121 °C po dobu 15 minut a poté za aseptických podmínek rozlita na Petriho misky. Kultivace probíhala anaerobně v termostatu (10 % CO_2) při 30 °C po dobu 48h.

ENDO Agar (HiMedia)

Používá se pro detekci laktóza-pozitivních a laktóza-negativních enterobakterií.

Složení:

Masový pepton ..... 10,0 g/l

Laktóza ..... 10,0 g/l

Siřičitan sodný ..... 2,5 g/l

Hydrogenfosforečnan (di)draselný ..... 3,5 g/l

Bazický fuschin ..... 0,5 g/l

Agar ..... 15,0 g/l

Konečné pH (25 °C) 7,5± 0,2

Příprava:

Bylo naváženo 41,5 g směsi do 1000 ml destilované vody. Po rozpuštění byla směs sterilizována v autoklávu při teplotě 121 °C po dobu 15 minut a poté za aseptických podmínek rozlita na Petriho misky. Kultivace probíhala při 30 °C po dobu 48h.

MSA – Mannitol Salt Agar (HiMedia)

Používá se jako selektivní médium k izolaci patogenních stafylokoků.

Složení:

Masový extrakt ..... 1,0 g/l

Pepton ..... 10,0 g/l

Chlorid sodný ..... 75 g/l

D-mannitol ..... 10,0 g/l

Fenol červeň ..... 0,025 g/l

Agar ..... 15,0 g/l

Konečné pH (25 °C) 7,4± 0,2

Příprava:

Bylo naváženo 111,02 g směsi do 1000 ml destilované vody. Po rozpuštění byla směs sterilizována v autoklávu při teplotě 121 °C po dobu 15 minut a poté za aseptických podmínek rozlita na Petriho misky. Kultivace probíhala při 30 °C po dobu 48h.

Fyziologický roztok (0,9 % roztok NaCl)

Chlorid sodný ..... 9,0 g

Voda ..... 1000 ml

Příprava:

Bylo naváženo 9 g směsi do 1000 ml destilované vody. Po rozpuštění byla směs sterilizována v autoklávu při teplotě 121 °C po dobu 15 minut.

VJ – Vogel and Johnson Agar (HiMedia)

Používá se pro izolaci stafylokoků.

Složení:

Trypton ..... 10,0 g/l

Kvasničný extrakt ..... 5,0 g/l

Mannitol ..... 10,0 g/l

Hydrogenfosforečnan draselný ..... 10,0 g/l

Chlorid lithný ..... 5,0 g/l

Glycin..... 10,0 g/l

Fenol červeň ..... 0,025 g/l

Agar ..... 15,0 g/l

Konečné pH (25 °C) 7,2± 0,2

Příprava:

Bylo naváženo 61,02 g směsi do 1000 ml destilované vody. Po rozpuštění byla směs sterilizována v autoklávu při teplotě 121 °C po dobu 15 minut. Po zchlazení na 45–50 °C bylo přidáno 20 ml 1% teluričitanu draselného a poté bylo kultivační médium za aseptických podmínek rozlito na Petriho misky. Kultivace probíhala při 30 °C po dobu 48h.

EMB – Eosin Methylene Blue Agar (HiMedia)

Používá se pro izolaci a diferenciaci koliformních bakterií.

Složení:

Pepton ..... 10,0 g/l

Hydrogenfosforečnan draselný ..... 2,0 g/l

Laktóza ..... 5,0 g/l

Sacharóza ..... 5,0 g/l

Eosin - Y ..... 0,4 g/l

Methylenová modř ..... 0,065 g/l

Agar ..... 13,5 g/l

Konečné pH (25 °C) 7,2± 0,2

Příprava:

Bylo naváženo 35,96 g směsi do 1000 ml destilované vody. Po rozpuštění byla směs sterilizována v autoklávu při teplotě 121 °C po dobu 15 minut. Po zchlazení na 45–50 °C bylo přidáno 20 ml 1% teluričitanu draselného a poté za aseptických podmínek rozlito na Petriho misky. Kultivace probíhala při 30 °C po dobu 48h.

Pro výzkum tempehu indonesia byly v Indonésii použity půdy PCA, MRS, VJ a EMB.

- **Použité pomůcky a vybavení**

Automatické pipety, špičky, Petriho misky, laboratorní váhy, odměrný válec, zkumavky, skleněné hokejky, stochamacher, vortex, kahan, Flow box Clean Air, Autokláv Systec 2540 EL, termostat, destilovaná voda

5.2.1 Popis experimentu

Mikrobiologická analýza byla rozdělena do dvou částí, přičemž v první části bylo pracováno s tekutými a polotuhými výrobky a v druhé s tuhými (viz Tab. 10). Produkty byly skladovány při třech různých teplotách, a to 8° C, 23° C a 30° C po dané časové období.

S tekutými a polotuhými výrobky bylo provedeno celkově pět odběrů vždy po uplynutí určené doby. U těchto produktů výrobce deklarovali dlouhou dobu použitelnosti (mnohdy rok i více), proto byly odběry provedeny v následujících dnech: první den, ihned po zakoupení těchto produktů a dále 8., 15., 29. a 57. den v průběhu skladovaní. U miso past bylo asepticky odebráno 5 g vzorku do sterilního sáčku a zředěno fyziologickým roztokem v poměru 1:9. Ihned poté byly vzorky homogenizovány ve stromacheru po dobu alespoň 2 min. Získaný homogenizát byl podle potřeby ředěn (desítkové ředění) do zkumavek s fyziologickým roztokem. U tekutých výrobků bylo asepticky odebráno 5 ml produktu do zkumavek s fyziologickým roztokem a směs byla rozmíchána na vortexu. Potom bylo také provedeno desítkové ředění.

S tuhými výrobky, které měly kratší dobu použitelnosti (řádově dny až týdny), byly provedeny čtyři odběry, a to 1., 2., 4. a 5. den v průběhu skladování. Tyto produkty podléhaly rychlé zkáze, proto se odběry zvolily v krátkém časovém úseku. Homogenizace a ředění těchto vzorků probíhalo stejně jako u polotuhých výrobků.

Z vybraného ředění bylo 200 µl inokula naočkováno na příslušný agar a rozetřeno sterilní hokejkou rovnoměrně po celém povrchu půdy. Z každého vzorku byly analyzovány tři po sobě jdoucí ředění. Naočkované misky byly poté otočeny dnem vzhůru, uloženy do termostatů s příslušnou teplotou a ponechány kultivaci.

Tempeh indonesia (TI) byl skladován při 8 °C a 23 °C a bylo s ním bylo provedeno celkově 5 odběrů, a to v 1., 2., 3., 4. a 7. den. V daný den bylo vždy asepticky odebráno 10 g vzorku a pomocí třecí misky a vortexu došlo k jeho rozmělnění spolu s 90 ml fyziologického roztoku. Tento homogenizát byl dále podle potřeby desítkově naředěn do sterilních zkumavek. Z vybraného ředění bylo pipetováno 100 µl inokula na příslušný agar a rozetřeno sterilní hokejkou. Z každého odběru byly analyzovány tři po sobě jdoucí ředění. Poté probíhala kultivace naočkovaných misek v termostatu.

Po uplynutí příslušné kultivační doby byly misky vyjmuty a spočítány rostoucí kolonie mikroorganizmů. Následně se tyto kolonie přepočítaly pro každé ředění pomocí CFU vzorce:

$$CFU/_{ml} = \frac{prům.\ počet\ kolonií}{ředění} \cdot \frac{1000}{pipetovaný\ objem}$$

Nakonec se kolonie z misek nabraly kličkou a křížovým roztěrem byly rozizolovány na PCA. Tyto izoláty se použijí na případnou pozdější identifikaci mikroorganizmů.

5.3 Analýza biogenních aminů

V první části bude popsána úprava vzorků pro následné vyhodnocení biogenních aminů pomocí chromatografie.

❖ **Použité chemikálie**

- 0,6 M $HClO_4$ (Sigma-Aldrich)
- 1,7-heptandiamin v koncentraci 500 mg/l (Sigma-Aldrich)
- dansylchlorid o koncentraci 5 g/l v acetonu (Merck)
- roztok prolinu (Sigma-Aldrich)
- heptan (Sigma-Aldrich)
- acetonitril (Sigma-Aldrich)
- 0,5 M $NaHCO_3$ (Merck)
- Na_2CO_3 (Merck)
- K_2CO_3 (Merck)

❖ **Použité pomůcky a vybavení**

- Automatické pipety Biohit
- Zkumavky eppendorf
- Vialky
- Třepačka Biosan
- Odstředivka EBA 21 (Hettich)
- Lyofilizátor ALPHA 1-4 LSC (CHRIST)
- Hlubokomrazící box MDF-U3286S (Sanyo)
- Analytické váhy A&D GH-200 EC
- Laboratorní sklo (nálevky, kádinky atd.)

- Filtrační papír

5.3.1 Příprava pevných a polotuhých vzorků pro stanovení biogenních aminů

1) Na analytických vahách bylo naváženo cca 15 g z každého vzorku do předem zvážených hliníkových misek. Hodnoty byly zapsány, misky překryty hliníkovou fólií a vloženy do hlubokomrazícího boxu, kde zůstaly zamrazeny alespoň 24 h. Poté byly vzorky lyofilizovány. Po skončení tohoto procesu byly vyjmuty z lyofilizátoru a rozmělněny na prášek. Takto zpracované vzorky byly uchovávány v znovuuzavíratelných plastových sáčcích v mrazícím zařízení až do jejich další analýzy.

2) Z lyofilizovaných a rozmělněných vzorků byl pomocí analytických vah navážen 1 g do 15 ml zkumavky (u vzorku kimči bylo naváženo pouze 0,5 g do 50 ml zkumavky) a přidáno 10 ml 0,6 M $HClO_4$. Zkumavky byly řádně protřepány, aby se veškerý obsah promíchal a umístěny na třepačku po dobu 30 minut. Následně byly zkumavky odstředěny po dobu 20 minut při 6000 otáčkách.

3) Supernatant z každé zkumavky byl odlit do odpovídající odměrné baňky o obsahu 25 ml. K sedimentu bylo přidáno 7 ml 0,6 M $HClO_4$, vzorky byl opět protřepány a umístěny na 30 minut na třepačku. Pak byly odstřeďovány po dobu 20 min při 6000 otáčkách a supernatant byl odlit do odměrných baněk. K sedimentu bylo přidáno 7 ml 0,6M $HClO_4$ a zkumavky byly po protřepání umístěny na třepačku a poté do ostředivky. Supernatant byl přelit do odměrných baněk a ty byly doplněny 0,6 M $HClO_4$ po rysku. Suspenze z odměrných baněk byla přefiltrována přes filtrační papír.

4) Byl odpipetován 1 ml vzorku do derivatizačních nádob, přičemž od každého vzorku byla připravena 3 paralelní stanovení. Bylo přidáno 100 µl vnitřního standardu (1,7-heptandiamin v koncentraci 500 mg/l), 1,5 ml karbonátového pufru o pH 11,1 – 11,2 a 2 ml čerstvě připraveného roztoku dansylchloridu o koncentraci 5 g/l v acetonu.

5) Derivatizační nádoby byly dobře uzavřeny a třepány v temnu po dobu 20 hodin.

6) Po uplynutí dané doby byly ke vzorkům přidány 3 ml heptanu a 3 minuty dobře ručně protřepány. Z ustálené heptanové vrstvy byl odpipetován 1 ml do vialky a následně byl odpařen do sucha proudem dusíku při 60 °C. Nakonec byl suchý odparek zředěn 1,5 ml acetonitrilu. Takto připravené vialky byly do další analýzy uchovány v mrazícím zařízení při teplotách -18 °C.

5.3.2 Příprava tekutých vzorků pro stanovení biogenních aminů

Z původních produktů bylo po protřepání vždy odpipetováno 10 ml. Z tohoto množství bylo dále odpipetováno 6 x 600 µl do příslušných eppendorfkových zkumavek a přidáno 600 µl 0,6 M $HClO_4$. Z každého produktu bylo tedy připraveno 6 stanovení. Vzorky byly uloženy v hlubokomrazícím zařízení po dobu alespoň 24 h. Poté se postupovalo stejně jako u pevných a polotuhých vzorků s tím, že se vynechal proces lyofilizace a extrakce. To znamená, že se pokračovalo až od bodu 4 odpipetováním 1 ml vzorku z připravených eppendorfkových zkumavek.

5.3.3 Chromatografické stanovení BA

Předchozím postupem bylo získáno 393 vzorků (3 paralelní stanovení u 131 vzorků), které byly nachystány k analýze pomocí kapalinové chromatografie. Tyto vzorky byly bezprostředně před vlastní analýzou přefiltrovány přes stříkačkový filtr s porozitou 0,22 µm a dávkovány na kolonu (Agilent Zorbax Eclipse C18, 50 mm x 3 mm, průtok 0,45 ml/min, pórovitost 1,8 µm) a promývány mobilní fází s gradientovou elucí (viz Tab. 11). Chromatografický systém byl tvořen binární pumpou a autosamplerem (Agilent Technologies 1260 Infinity, USA) s degaserem, UV/VIS-DAD detektorem (λ = 254 nm) a termostatem (Agilent Technologies, USA).

Tab. 11: Gradientový eluční program separace biogenních aminů

Čas [min]	10% acetonitril [%]	100% acetonitril [%]
0,0	41	59
0,1	41	59
1,9	37	63
3,5	18	82
4,0	0	100
9,5	0	100
11,5	41	59
15,5	41	59

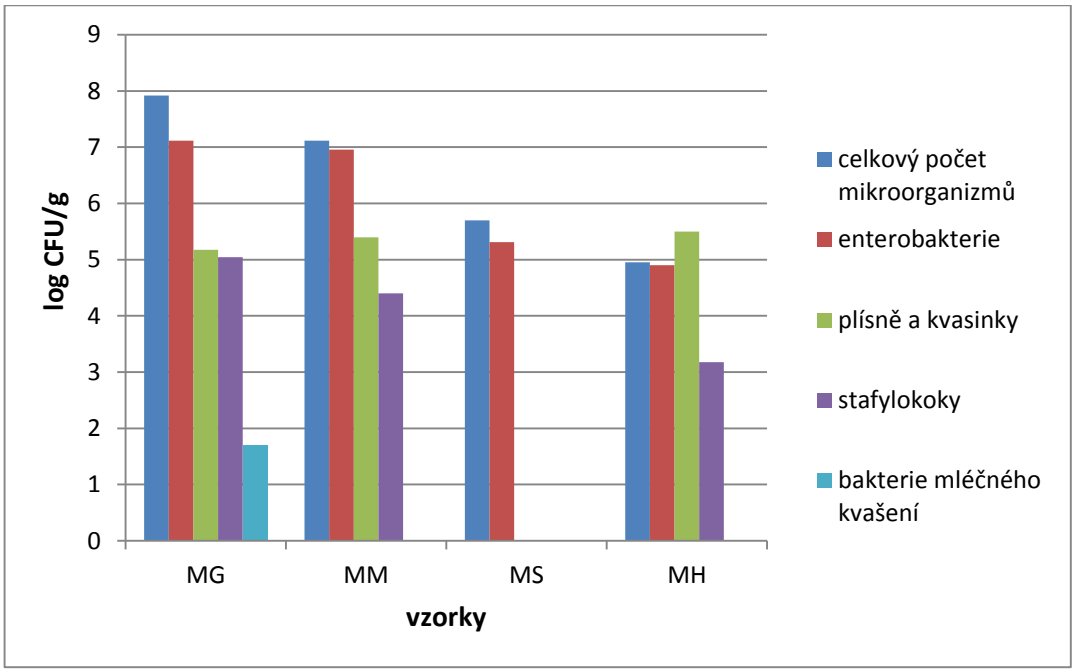
Výsledky byly následně vyhodnoceny pomocí softwaru CLARITY. Za pomoci standardů (tryptamin, fenyletylamin, putrescin, kadaverin, histamin, tyramin, spermidin a spermin) byly stanoveny obsahy jednotlivých biogenních aminů ve zkoumaných výrobcích.

6 VÝSLEDKY A DISKUZE

6.1 Mikrobiologická analýza tekutých a polotuhých vzorků

V tabulkách, které jsou vloženy do přílohy I, jsou uvedeny počty kolonií přepočtených jako CFU/ml (CFU/g) podle daného ředění.

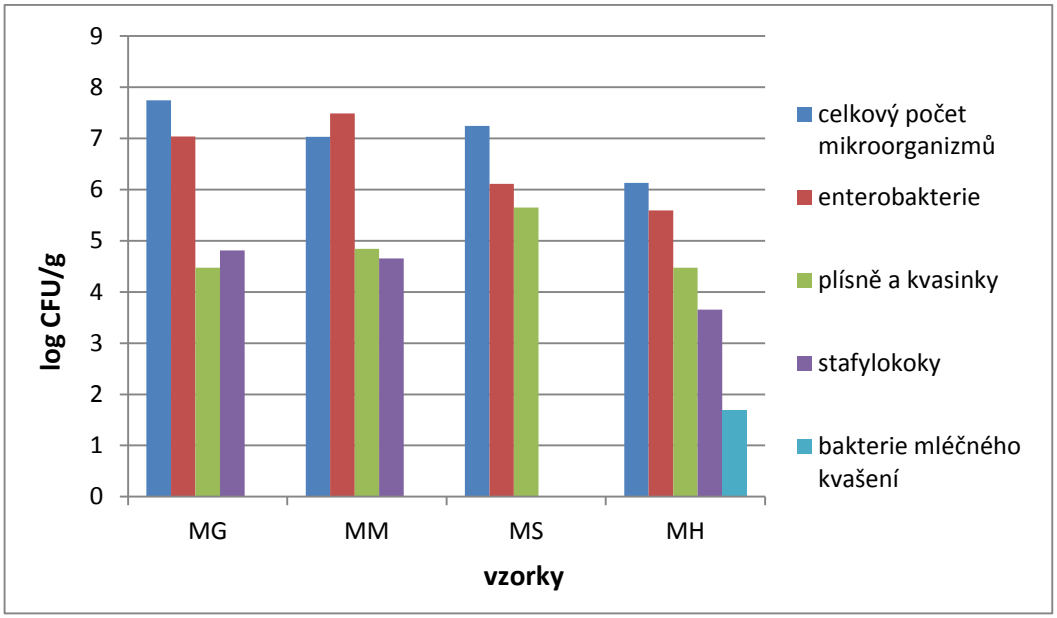
Z výsledků bylo patrné, že celkový počet mikroorganizmů, enterobakterií i kvasinek a plísní byl nejvyšší v 15. den odběru vzorků skladovaných hlavně při teplotách 23 °C a 30 °C. Z důvodů objektivního porovnání byly však do grafu přidány i počty kolonií z půd MSA (počet stafylokoků) a MRS (počet bakterií mléčného kvašení), (viz Obrázek 4 a Obrázek 5).



Obrázek 5: Počty sledovaných skupin mikroorganizmů (log CFU/g) u polotuhých vzorků (pasty miso) skladovaných při teplotě 30°C po dobu 15. dnů

(MG – miso genmai, MM – miso mugi, MS – miso shiro, MH – miso hatcho)

Nejvyšší celkový počet mikroorganizmů, enterobakterií a stafylokoků byl 15. den odběru u vzorků skladovaných při teplotě 30 °C zaznamenán u vzorku miso genmai (Obrázek 5). Počty kvasinek a plísní byly srovnatelné u všech analyzovaných vzorků miso past. Bakterie mléčného kvašení byly zpozorovány v tento den odběru jen u miso genmai, a to v poměrně nízkém počtu (ve srovnání s ostatními analyzovanými skupinami mikroorganizmů).



Obrázek 6: Počty sledovaných skupin mikroorganizmů (log CFU/g) u polotuhých vzorků (pasty miso) skladovaných při teplotě 23°C po dobu 15. dnů

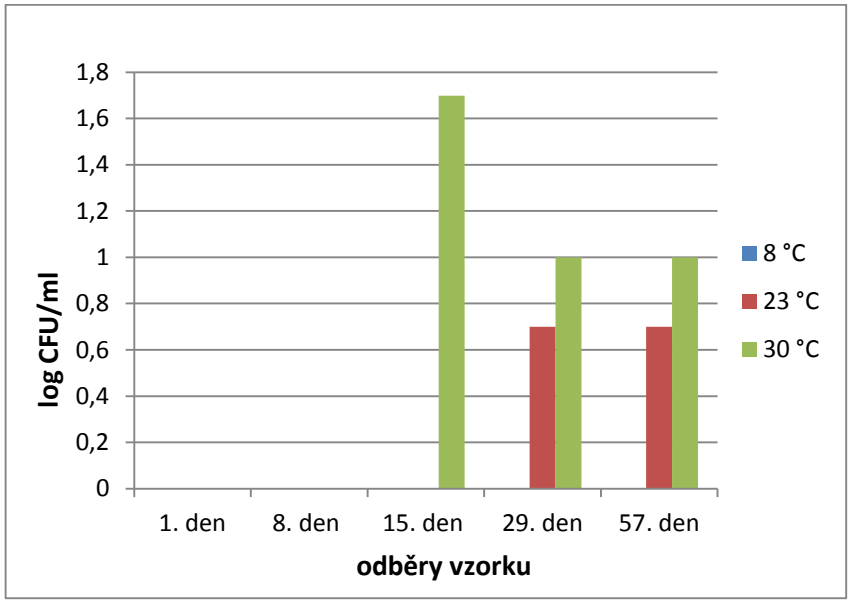
(MG – miso genmai, MM – miso mugi, MS – miso shiro, MH – miso hatcho)

Nejvyšší celkový počet mikroorganizmů a stafylokoků byl 15. den odběru u vzorků skladovaných při teplotě 23 °C zaznamenán, podobně jako u produktů skladovaných při teplotě 30 °C, u vzorku miso genmai (Obrázek 5). Bakterie mléčného kvašení byly v tento den detekovány jen u miso hatcho. U miso shiro, jako u jediného vzorku, nebyl zpozorován nárůst stafylokoků (viz Obrázek 5).

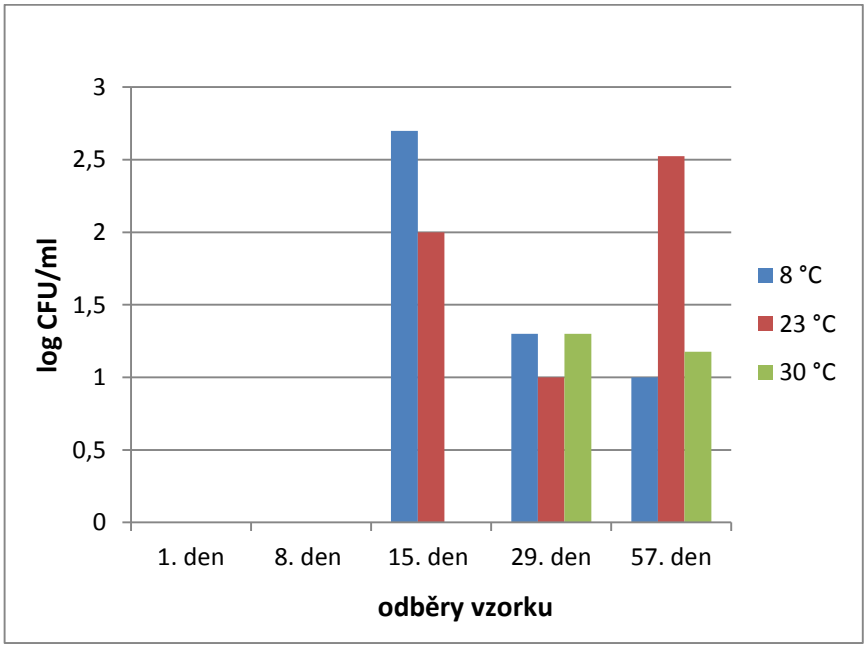
Z provedené mikrobiologické analýzy lze říci, že miso genmai se projevilo jako nejméně odolné vůči většině sledovaných mikroorganizmů. Byly zde zaznamenány nejvyšší počty fakultativně anaerobních mezofilních mikroorganizmů, stafylokoků i bakterií mléčného kvašení. V mugi miso byly zaznamenány nejvyšší počty enterobakterií a v miso shiro nejvyšší počty kvasinek a plísní. Nejnižší sledované počty mikroorganizmů byly zpozorovány v miso hatcho, což je pravděpodobně způsobeno nejvyšší koncentrací soli ze všech miso past, která inhibuje nebo zpomaluje růst mnohých mikroorganizmů.

U tekutých vzorků K (komesu), TS (tamari shoyu), KS (koikuchi shoyu) byl zaznamenán růst mikroorganizmů v průběhu skladování na půdě PCA (celkový počet mezofilních fakultativně anaerobních mikroorganizmů; viz Obrázek 7, 8 a 9). Na jiných mikrobiologických půdách, s výjimkou CHYGA (kvasinky a plísně; viz Příloha I), nebyly nalezeny žádné kolonie.

Při vyhodnocení vzorku tamari shoyu (TS) je patrné, že růst MO byl zaznamenán až od 15. dne u vzorků skladovaných při nejvyšší testované teplotě (30 °C). V následujících odběrových dnech byl růst fakultativně anaerobních mezofilních mikroorganizmů na půdě PCA pozorován u vzorků skladovaných při teplotách 28 °C a 30 °C (viz Obrázek 7).

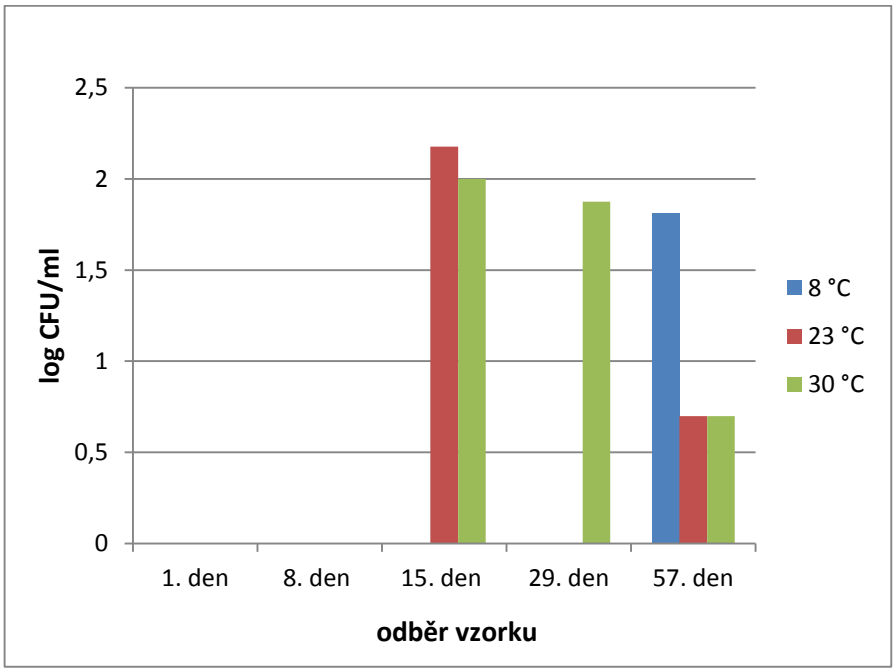


Obrázek 7: Celkový počet mikroorganizmů (log CFU/ml) u tamari shoyu sledovaný na půdě PCA v průběhu 57denního skladování při různých teplotách



Obrázek 8: Celkový počet mikroorganizmů (log CFU/ml) u koikuchi shoyu sledovaný na půdě PCA v průběhu 57denního skladování při různých teplotách

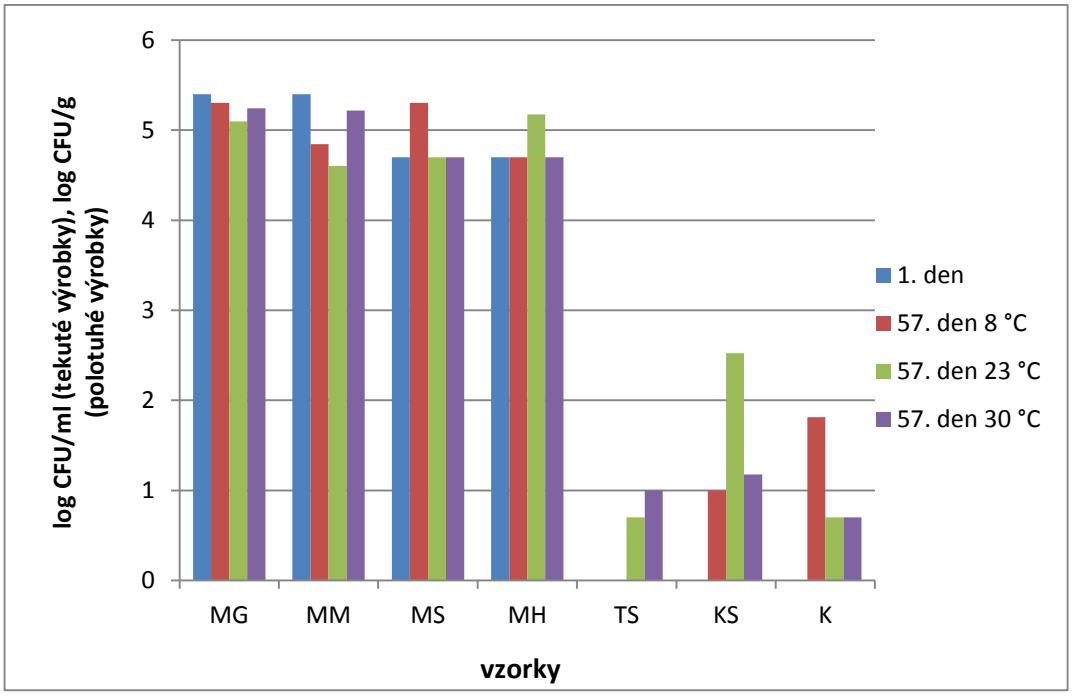
U vzorku koikuchi shoyu (KS) byl pozorován velmi nepravidelný růst MO od 15. dne skladování při teplotách 8 °C i při 23 °C. V průběhu dalšího skladování byla přítomnost mikrooganizmů zaznamenána u všech vzorků skladovaných ve všech teplotních rozmezích (viz Obrázek 8).



Obrázek 9: Celkový počet kolonií mikroorganizmů (log CFU/ml) u vzorku komesu sledovaný na půdě PCA v průběhu 57denního skladování při různých teplotách

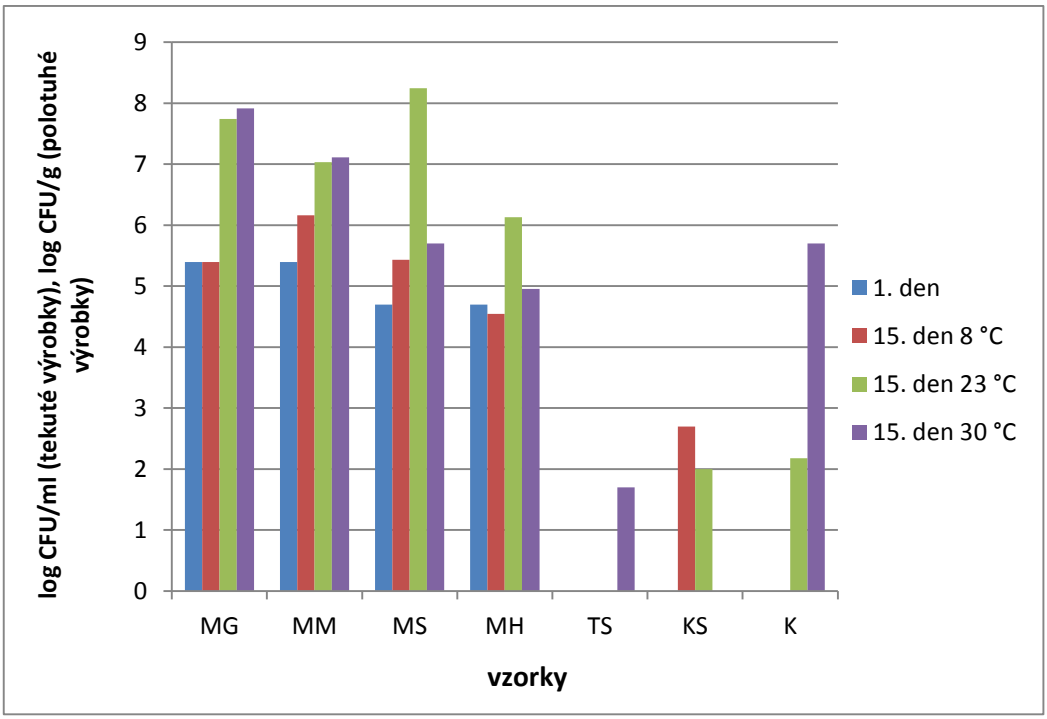
U vzorku rýžového octa komesu byly na kultivační půdě PCA zaznamenány kolonie mikroorganizmů od 15. dne skladování, a to při vyšších teplotách (23 °C i 30 °C). 57. den skladování již byly nalezeny kolonie MO u všech tří vzorků skladovaných v různých teplotních podmínkách (viz Obrázek 9).

Při porovnání počtu mikroorganizmů v tekutých a polotuhých asijských fermentovaných produktech ihned po jejich zakoupení (první den skladování) s posledním, tedy 57. dnem, skladování, bylo zjištěno, že celkový počet fakultativně anaerobních mezofilních mikroorganizmů se u polotuhých vzorků téměř nezměnil. U tekutých vzorků nebyl ihned po zakoupení zaznamenán žádný nárůst kolonií. Největší mikrobiální stabilita byla u těchto výrobků pozorována u tamari shoyu jelikož se nárůst kolonií mikroorganizmů projevil jen při skladování při vyšších teplotách (23 °C a 30 °C) (viz Obrázek 10).



Obrázek 10: Porovnání celkového počtu mikroorganizmů u polotuhých a tuhých vzorků po zakoupení a 57. den skladování při různých teplotách

(MG – miso genmai, MM – miso mugi, MS – miso shiro, MH – miso hatcho, TS – tamari shoyu, KS – koi-kuchi shoyu, K – komesu)

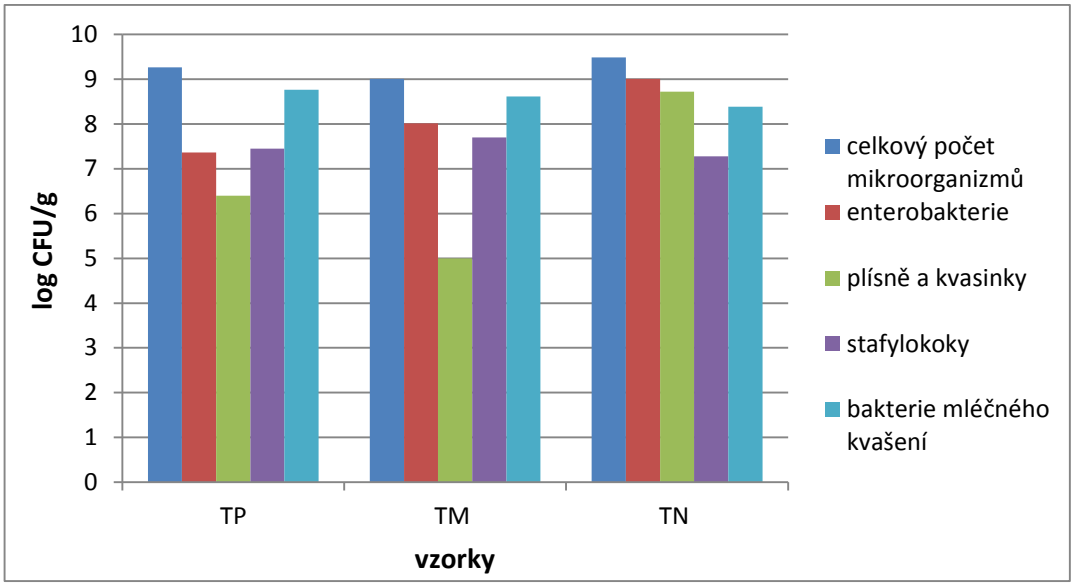


Obrázek 11: Porovnání celkového počtu mikroorganizmů u polotuhých a tuhých vzorků po zakoupení a 15. den skladování při různých teplotách

Z Obrázku 10 a Obrázku 11 lze také porovnat počty vybraných skupin mikroorganizmů v 15. den skladování a 57. den skladování polotuhých a tuhých vzorků. Jak již bylo zmíněno výše, tak 15. den skladování byly u všech vzorků zaznamenány nejvyšší celkové počty mikroorganizmů. U miso past lze zpozorovat zvýšení v tomto dni hlavně u těch vzorků, které byly skladovány při vyšších teplotách (23 °C a 30 °C). U tekutých vzorků se při zohlednění skladovacích teplot mikroflóra rozvíjela jinak než u polotuhých. V 57. den skladování se vždy objevil růst mikroorganizmů u další ze skladovacích teplot, nežli tomu bylo v 15. den. U tamari shoyu to bylo při 23 °C, u koikuchi shoyu při 30 °C a u komesu při 8 °C.

6.2 Mikrobiologická analýza tuhých vzorků

Nejvyšší počty vybraných skupin mikroorganizmů byly u tempehu zaznamenány 4. den odběru u vzorků skladovaných při teplotě 30 °C. Byl pozorován zejména růst mezofilních fakultativně anaerobních mikroorganizmů na půdě PCA, enterobakterií (ENDO agar) a stafylokoků na půdě MSA (Obrázek 12). Počty kvasinek a plísní (půda CHYGA) a bakterií mléčného kvašení (MRS) byly proměnlivé v závislosti na skladovací teplotě. Jejich hodnoty jsou zahrnuty v grafu z důvodu porovnání s ostatními skupinami mikroorganizmů. U vzorku tempeh párty byl na půdách PCA (celkový počet mikroorganizmů), ENDO (enterobakterie) a CHYGA (kvasinky a plísně) zaznamenán nejvyšší nárůst kolonií u výrobku skladovaného při 8 °C. Z Obrázku 12 je patrné, že ve vzorku tempeh natural byly zpozorovány nejvyšší hodnoty mezofilních fakultativně anaerobních mikroorganizmů, enterobakterií, plísní a kvasinek 4. den skladování při 30 °C. Počty stafylokoků a bakterií mléčného kvašení v tomto vzorku byly jen nepatrně nižší než u tempehu párty a tempehu marinovaný.



Obrázek 12: Počty sledovaných skupin mikroorganizmů (log CFU/g) u tuhých vzorků (tempehy) skladovaných při teplotě 30 °C po dobu 4. dnů

(TP – tempeh párty, TM – tempeh marinovaný, TN – tempeh natural)

U vzorku tempeh párty byla na půdě ENDO nalezena *E. coli*, respektive koliformní bakterie (tmavě červené kolonie s kovovým leskem) již po 2 dnech skladování při teplotě 8 °C (1500 CFU/g), 23 °C (1000 CFU/g) i 30 °C ($8*10^5$ CFU/g). V těchto produktech byla *E. coli* (koliformní bakterie) detekována i 4. den skladování při teplotě 30 °C ($2*10^6$ CFU/ml).

U vzorku tempeh natural bylo na půdě ENDO nalezeno $5*10^4$ CFU/g *E. coli* (koliformních bakterií) již po dvou dnech skladování při 30 °C.

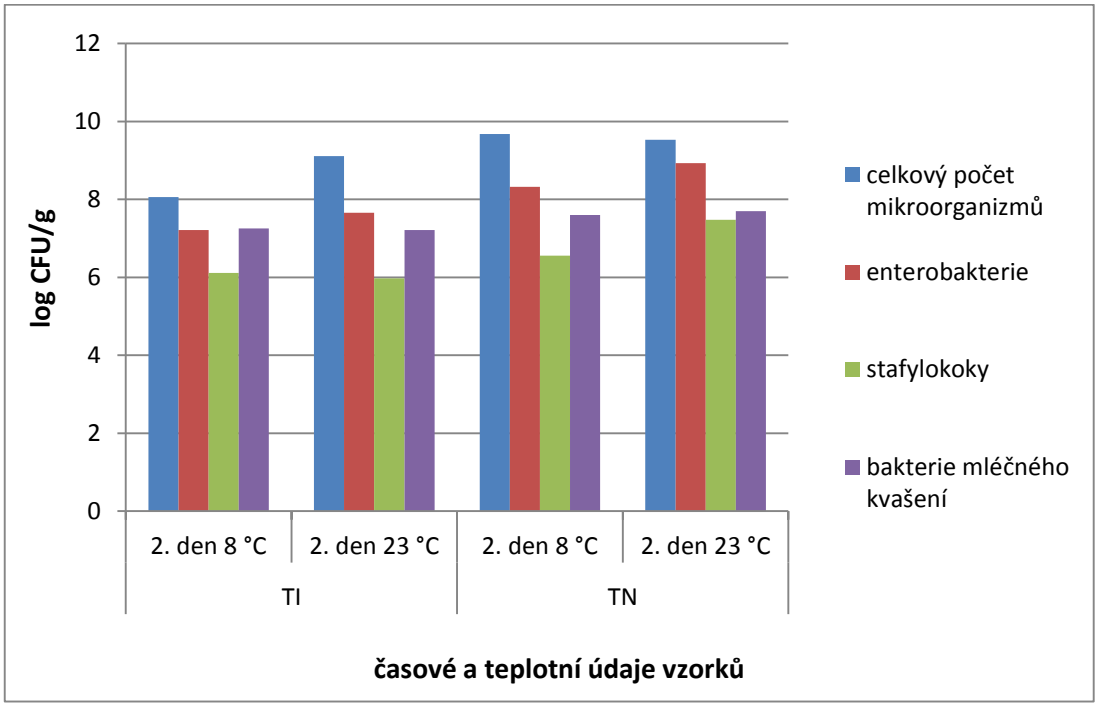
U vzorku TI (tempeh indonesia) byla nalezena *E. coli* (koliformní bakterie) již 2. den skladování a poté i v následujících dnech (3. a 4. den) během skladování při teplotách 8 °C i 23 °C. Počty kolonií bohužel nebyly spočítány, ale po porovnání fotografií pořízených v Indonésii (viz Příloha III) a výsledků získaných v laboratoři v ČR, jejich množství bylo vyšší než u vzorku tempeh párty.

Dále byly porovnávány vzorky tempeh natural a tempeh indonesia, které měly obdobné složení. Bylo provedeno srovnání počtů kolonií sledovaných skupin mikroorganizmů u vzorků odebraných 2. den a 4. den, které byly skladovány v České republice i v Indonésii při stejných teplotách (8 °C a 23 °C).

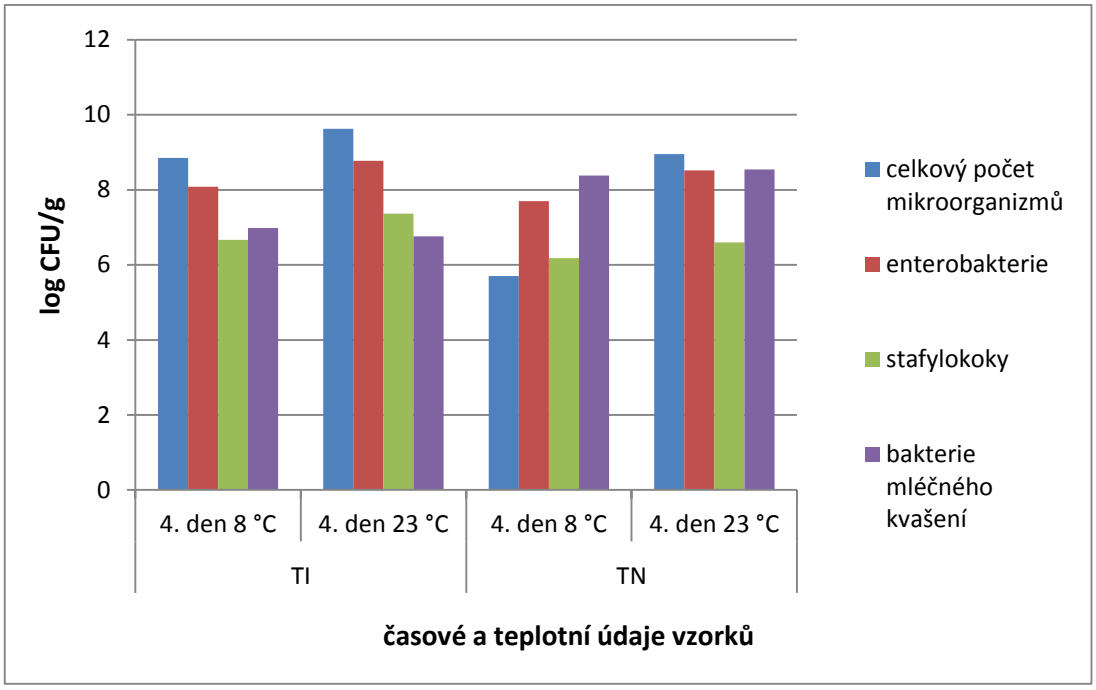
Vyšší počty všech vybraných skupin mikroorganizmů byly po 2 dnech skladování při teplotách 8 °C i 23 °C zaznamenány u vzorku tempeh natural (viz Obrázek 13). Co se týče

analýzy po 4 dnech skladování tak, celkový počet mikroorganizmů, počet stafylokoků i entorobakterií, u vzorku tempeh indonesia byl vyšší. Pouze počet bakterií mléčného kvašení byl u tempeh natural vyšší než u vzorku z Indonésie (viz Obrázek 14).

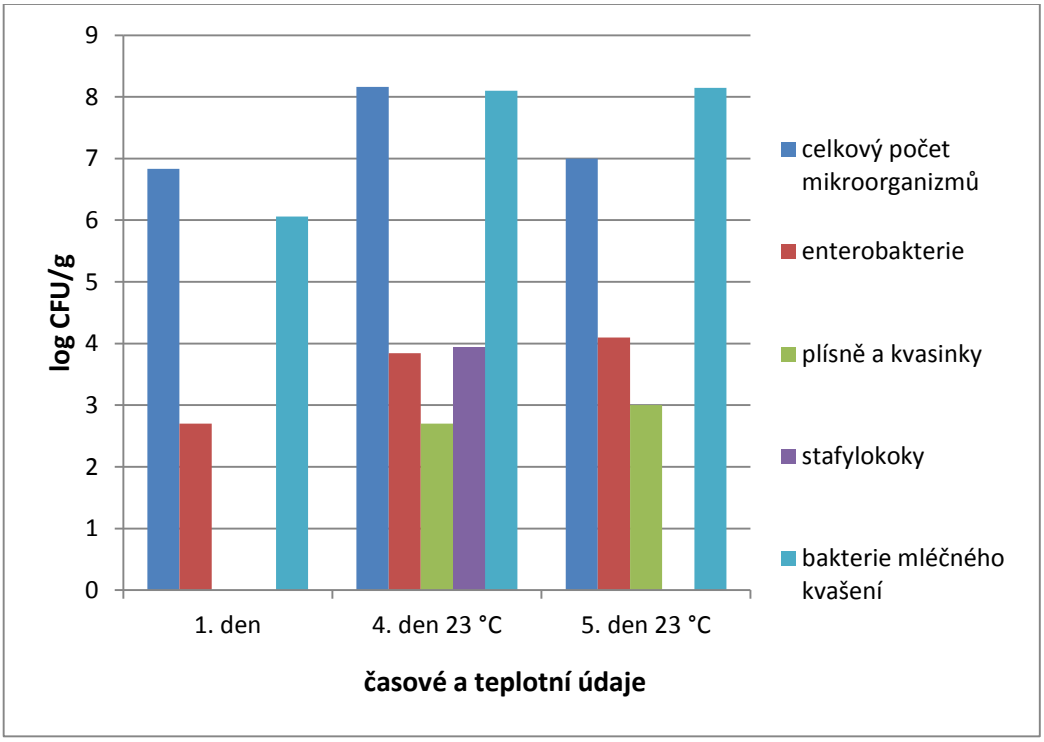
Z mikrobiologického výzkumu tempehu bylo zjištěno, že nejvyšší celkový počet mikroorganizmů, počet enterobakterií, stafylokoků, plísní a kvasinek byl zaznamenán v tempehu indonesia a poté v tempeh natural. Počet bakterií mléčného kvašení byl nejvyšší u tempeh párty. Z těchto výsledků lze říci, že přídavek oleje a koření v tempehu marinovaném a tempehu párty pomáhá inhibovat růst pouze některých skupin mikroorganizmů.



Obrázek 13: Porovnání vybraných skupin mikroorganizmů (log CFU/g) u vzorku tempeh natural (TN) a tempeh indonesia (TI) po 2 dnech skladování



Obrázek 14: Porovnání vybraných skupin mikroorganizmů (log CFU/g) u vzorku tempeh natural (TN) a tempeh indonesia (TI) po 4 dnech skladování



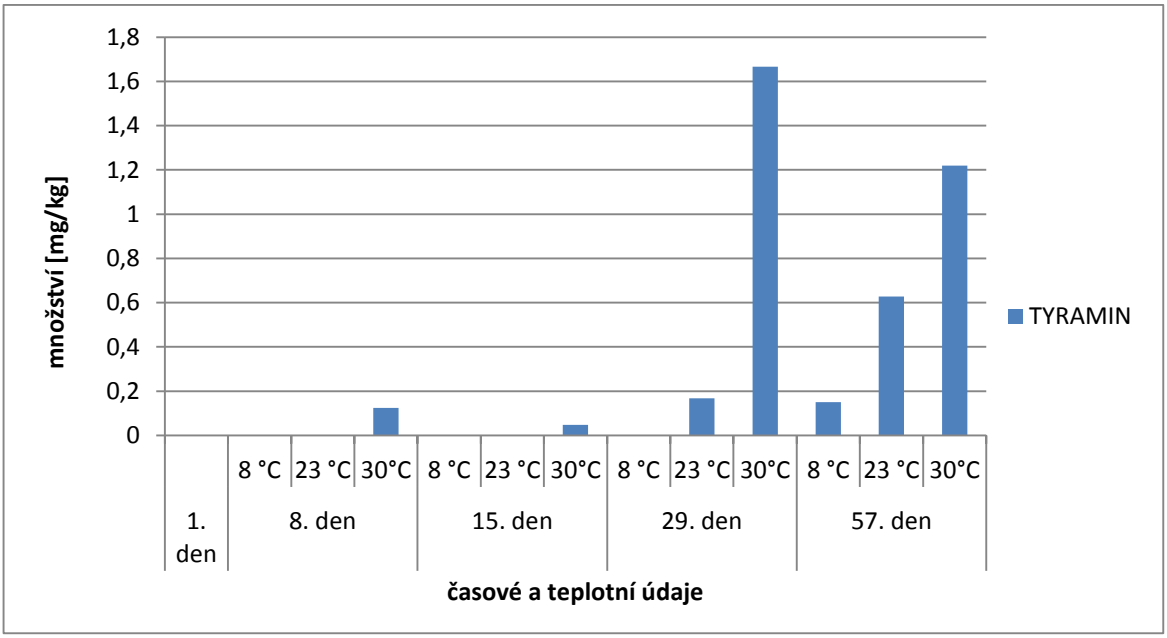
Obrázek 15: Porovnání vybraných skupin mikroorganizmů (log CFU/g)u kimči 1., 4. a 5. den skladování při teplotě 23 °C

Nakonec byl porovnán růst sledovaných skupin mikroorganizmů u kimči. K nejvyššímu nárůstu na selektivních půdách došlo po 4 a 5 dnech skladování kimči při 23 °C (viz Obrázek 15). Z důvodu porovnání jsou v tomto grafu zahrnuty i údaje z prvního dne (po zakoupení tohoto vzorku). Byly pozorovány konstantně vysoké hodnoty počtu bakterií mléčného kvašení a fakultativně anaerobních mezofilních mikroorganizmů v průběhu celé analýzy.

6.3 Chromatografické stanovení biogenních aminů

6.3.1 Miso pasty

Při chromatografické analýze miso past byl po celou dobu skladování nalezen pouze tyramin, a to v množství 0,048–1,765 mg/kg. V miso mugi bylo nalezeno nejvyšší množství tohoto biogenního aminu ze všech miso past po 15 dnech skladování při teplotě 8 °C. Miso shiro obsahovalo nejvyšší množství tyraminu 29. a 57. den skladování, a to zejména při teplotách 23 °C a 30 °C. Podobně tomu bylo u miso hatcho, kdy nejvyšších hodnot tyraminu bylo dosaženo při 30 °C v 29. a 57. den skladování (viz Obrázek 16). Množství tyraminu ve vzorku miso genmai bylo téměř po celou dobu testování konstantní a dosahovalo velmi nízkých hodnot. Nejnižší množství tyraminu byla detekována u výrobků s obsahem bílé rýže (miso shiro) a ječmene (miso genmai). Miso genmai a mugi miso se jevily stabilní obsah biogenních aminů i při zvýšené teplotě a delší době skladování. Touto problematikou se ve své studii zabývali Bo Young a Jae-Hyng Mah a potvrdili, že v miso pastách je velmi malý obsah BA, kde nalezli i jiné druhy BA [34].

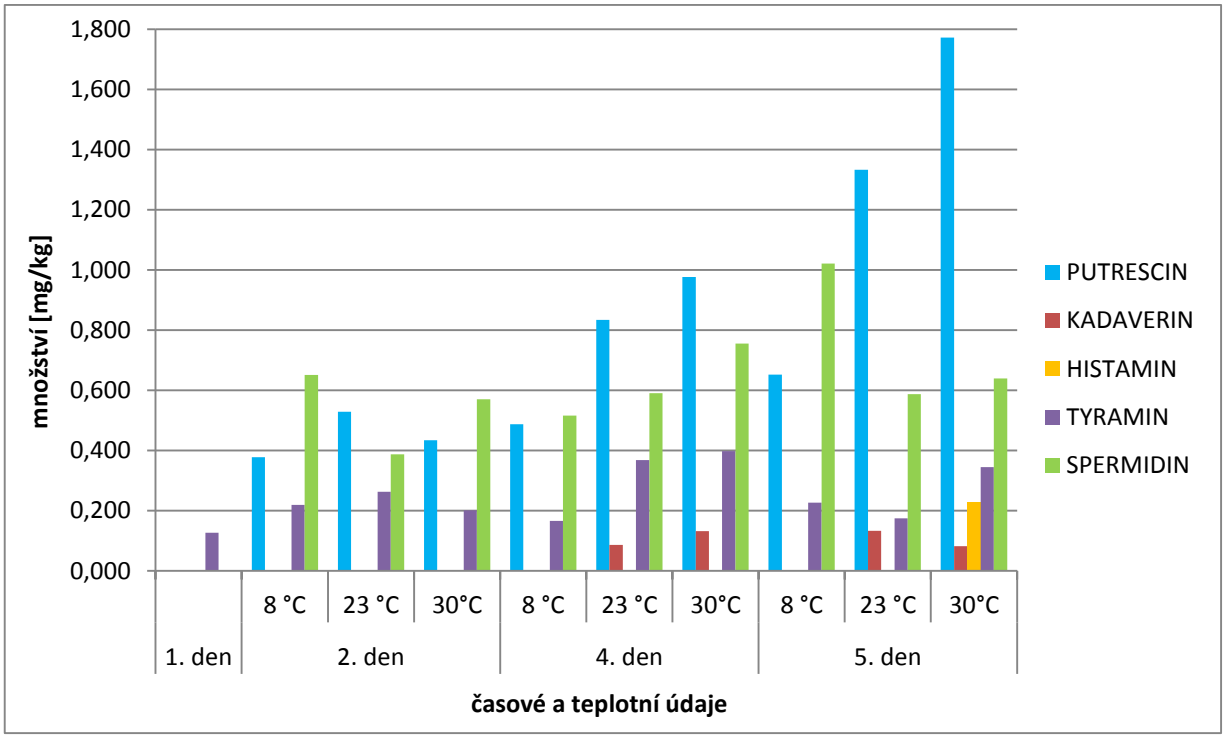


Obrázek 16: Množství tyraminu ve vzorku miso hatcho v průběhu 57 denního skladování při teplotách 8 °C, 23 °C a 30 °C

6.3.2 Tempeh

Při stanovení obsahu BA ve vzorcích tempehů byl nalezen putrescin, kadaverin, histamin, tyramin a spermidin.

Ve vzorku tempeh párty se spermidin a tyramin vyskytovaly při všech skladovacích teplotách po celou dobu testování (viz Obrázek 17). Množství sperminu se pohybovalo v rozmezí 0,387–1,021 mg/kg a tyraminu 0,127–0,398 mg/kg. Obsah putrescinu rostl v závislosti na době skladování a teplotě. Nejvyšší množství tohoto BA bylo naměřeno u vzorku tempeh párty odebraného 5. den skladování při 30 °C, a to 1,772 mg/kg, což bylo zároveň nejvyšší množství ze všech biogenních aminů, které zde byly stanoveny. Dále zde byl detekován kadaverin ve vzorcích skladovaných 4 a 5 dnů při teplotách 23 °C a 30 °C v množství 0,086–0,133 mg/kg. Ve vzorku skladovaném 5 dnů při 30 °C bylo zjištěno 0,227 mg/kg histaminu.

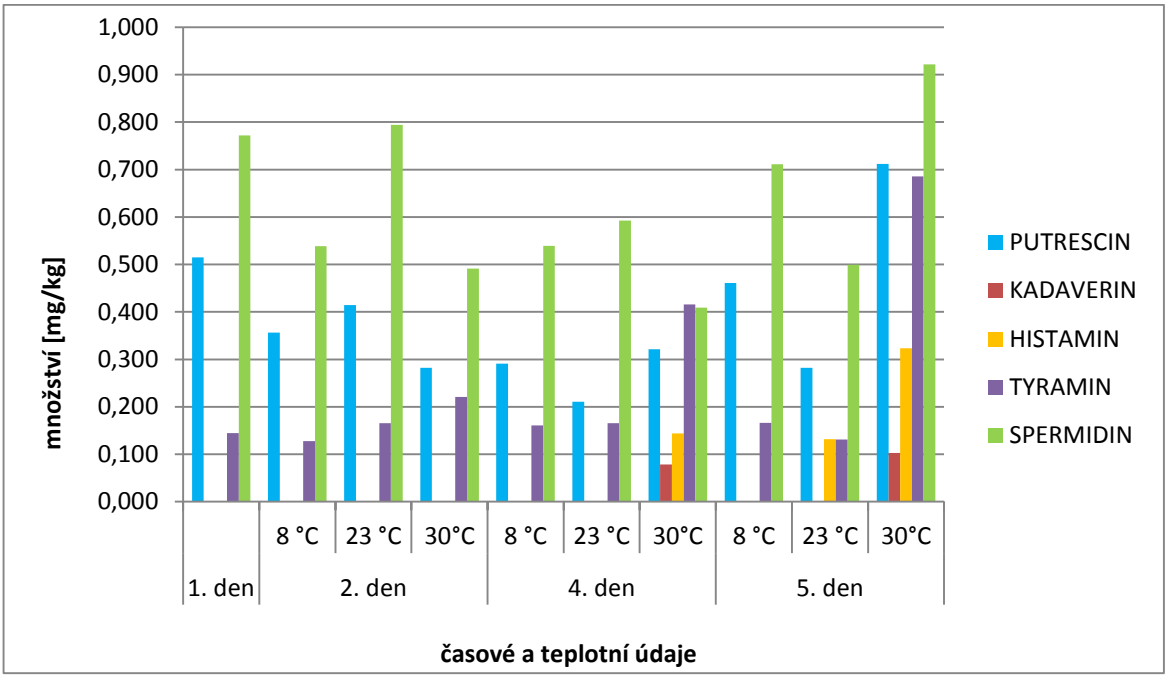


Obrázek 17: Detekovaná množství biogenních aminů v tempehu párty v průběhu 5 denního skladování při teplotách 8 °C, 23 °C a 30 °C

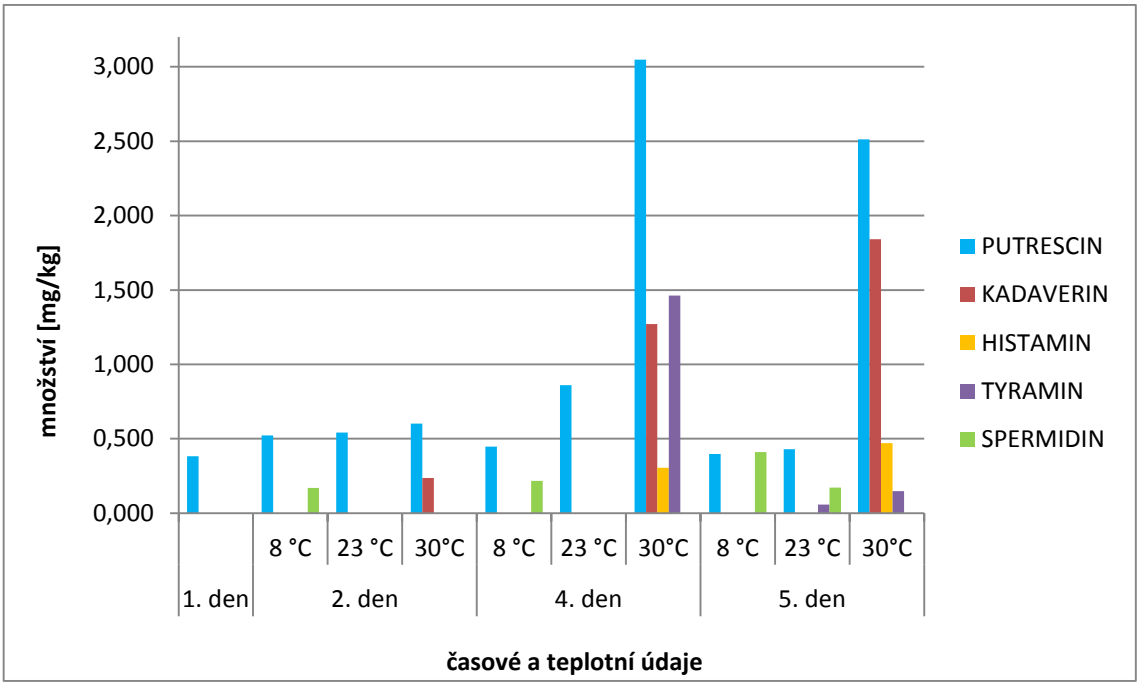
Množství putrescinu a spermidinu ve vzorku tempeh marinovaný (TM) bylo poměrně stálé s nejvyššími hodnotami u vzorků odebraných 5. den skladování při 30 °C a tyto hodnoty byly rovněž nejvyšší ze všech nalezených biogenních aminů v tomto vzorku (viz Obrázek 18). Obsah putrescinu se pohyboval v rozmezí 0,211–0,712 mg/kg a hodnoty spermidinu 0,409–0,922 mg/kg. Nejvyšší množství tyraminu (0,131–0,685 mg/kg) v tomto vzorku bylo v průběhu skladování zaznamenáno při 30 °C. Kadaverin byl analyzován ve vzorku skladovaném 4. a 5. den při 30 °C v množství 0,079 mg/kg a 0,102 mg/kg. Přítomnost histaminu byla zaznamenána po 4 dnech skladování při 30 °C (0,144 mg/kg) a 5 dnech skladování při 23 °C i 30 °C v obsahu 0,132 mg/kg a 0,323 mg/kg.

Posledním testovaným vzorkem byl tempeh natural (TN). V tomto produktu dosahoval nejvyššího množství ze všech přítomných biogenních aminů putrescin (0,382–3,048 mg/kg). Ten byl nalezen při všech skladovacích teplotách v průběhu celé doby skladování, avšak nejvyšší hodnoty dosahoval až ve 4. a 5. dni skladování při 30 °C (viz Obrázek 19). Obsahy kadaverinu, histaminu a tyraminu byly zaznamenány v tomto produktu hlavně při vyšších skladovacích teplotách. Kadaverin byl naměřen jen u vzorků uchovávaných při 30 °C ve 2., 4 a 5. dni odběru v množství 0,236–1,840 mg/kg, rovněž obsah histaminu byl stanoven u vzorku skladovaného při 30 °C ve 4. a 5. dni skladování

(0,305 mg/kg a 0,471 mg/kg). Přítomnost tyraminu byla obdobně jako u histaminu stanovena ve vzorku skladovaném 4 dny při 30 °C a 5 dnů při 23 °C a 30 °C. Jeho obsah činil 0,058–1,462 mg/kg. Spermidin byl obsažen ve vzorku skladovaném 2 a 4 dny při teplotě 8 °C a dále při skladování 5 dnů v teplotě 8 °C a 23 °C. Jeho množství se pohybovalo v rozmezí 0,169–0,172 mg/kg.



Obrázek 18: Detekovaná množství biogenních aminů v tempehu marinovaný v průběhu 5 denního skladování při teplotách 8 °C, 23 °C a 30 °C



Obrázek 19: Detekovaná množství biogenních aminů v tempehu natural v průběhu 5 denního skladování při teplotách 8 °C, 23 °C a 30 °C

Při porovnání 1. dne skladování s posledním, tedy 5. dnem skladování vzorků při 8 °C, byla u všech testovaných tempehů zjištěna nepatrná odchylka v množství BA. Při skladovaní tempehů 5. dnů při 30 °C bylo u všech vzorků stanoveno nejen vyšší množství, ale výskyt dalších druhů biogenních aminů, především kadaverinu, histaminu a spermidinu.

Shruti et al. [12] ve své práci zjistili, (viz Tab 7), že se v tempehu nachází tyramin, tryptamin, histamin, putrescin a spermidin. V této diplomové práci byly ve vzorcích tempehů stanoveny veškeré uvedené BA (kromě tryptaminu). Avšak nalezená množství zastoupených biogenních aminů byla mnohem nižší, než uvádějí Shruti et al.

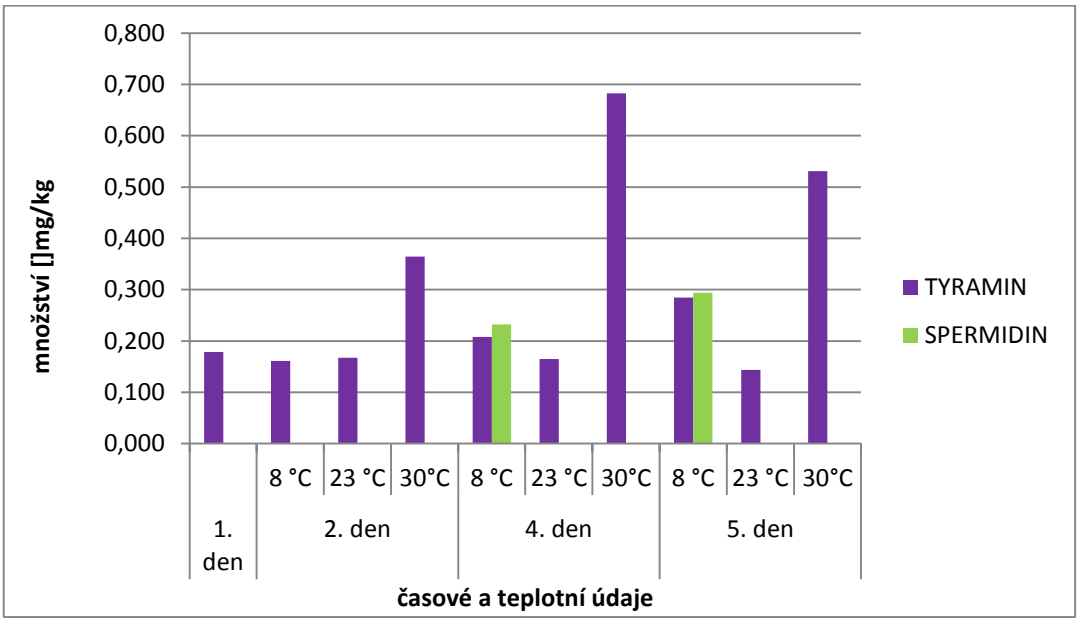
Nejvyšší obsah BA byl zjištěn u vzorku tempeh natural, který převýšil množství stanovených BA u tempeh marinovaný a tempeh párty. Lze tedy předpokládat, že přídavek koření a oleje inhibuje nebo zpomaluje růst mikroorganizmů, které mohou produkovat biogenní aminy. To potvrdil Santos [15] svou hypotézou, že koncentrace biogenních aminů v tempehu mohou být vysoké i nízké v závislosti na použitém výrobním procesu.

Jelikož je množství těchto biogenních aminů nízké, nepředpokládá se, že by mohly způsobit nežádoucí zdravotní efekt ani při delší době skladování.

6.3.3 Kimči

Při testování vzorku kimči, byl zjištěn velmi malý obsah tyraminu a spermidinu (viz Obrázek 20). Tyramin byl analyzován ve všech vzorcích v průběhu celé doby skladování a při všech skladovacích teplotách v množství 0,161–0,531 mg/kg. Jeho nejvyšší množství bylo zjištěno v kimči skladovaném při teplotě 30 °C.

Ve své práci Farnwort uvedl, že obsah biogenních aminů v kimči je velmi nízký a tudíž neohrožující lidské zdraví [33]



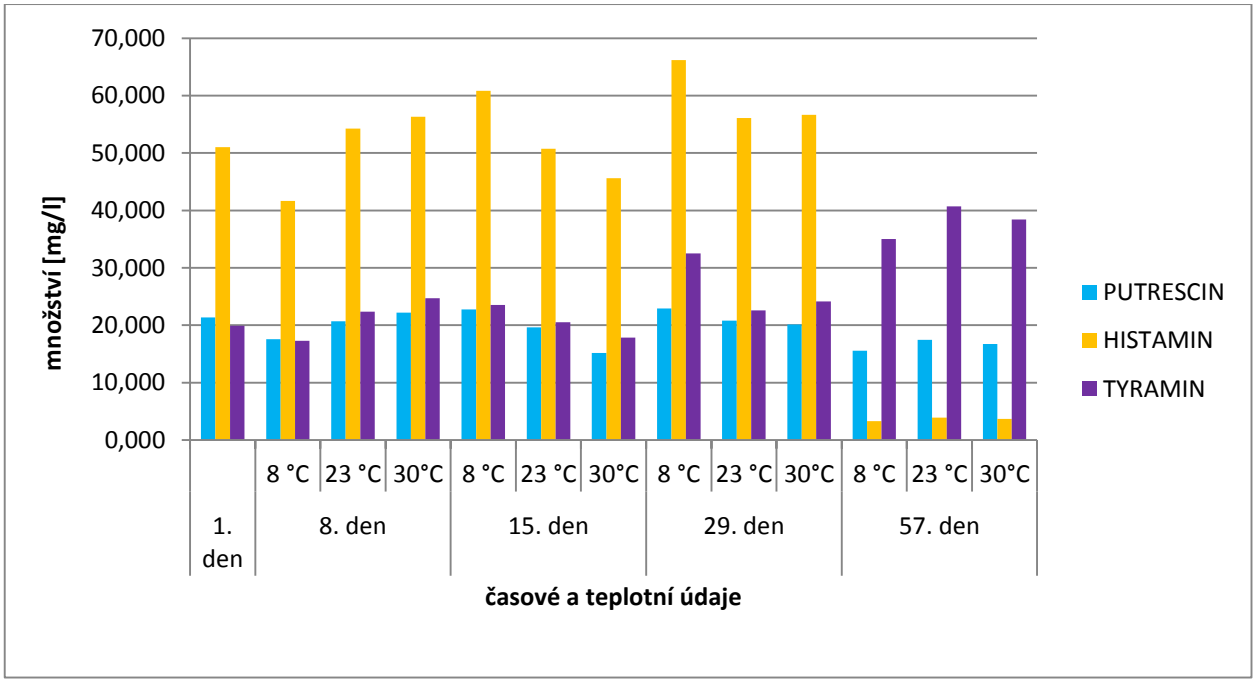
Obrázek 20: *Množství tyraminu a spemidinu v kimči v průběhu 5 denního skladování při teplotách 8 °C, 23 °C a 30 °C*

6.3.4 Sójové omáčky

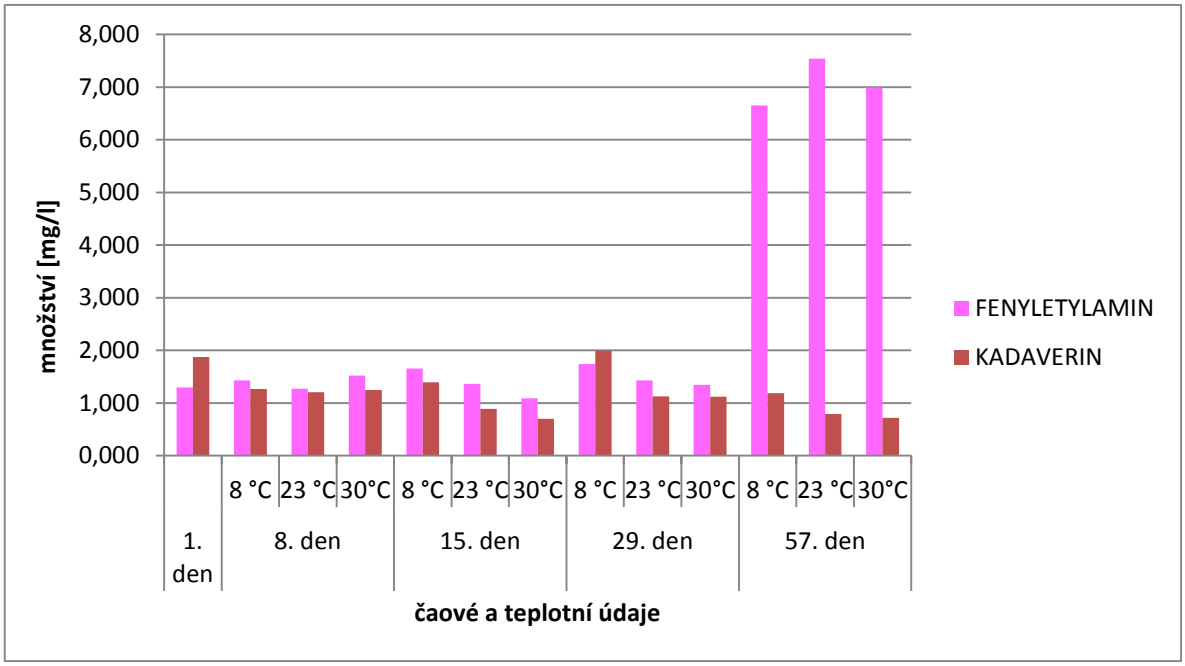
První z testovaných sójových omáček byla tamari shoyu. Biogenní aminy, které zde byly nalezeny, jsou putrescin, histamin, tyramin, fenyletylamin a kadaverin. Nejvyšší hodnoty byly zaznamenány u histaminu (3,306–66,208 mg/l), a to již od prvního dne skladování při všech testovaných teplotách. Poslední den testování jeho obsah výrazně poklesl (viz Obrázek 21). Množství putrescinu bylo téměř konstantní po celou dobu testování a hodnoty se pohybovaly mezi 15,156–22,764 mg/l. Obsah tyraminu se zpočátku příliš neměnil (17,287–40,710 mg/l), avšak poslední den došlo k jeho mírnému zvýšení.

Množství fenyletylaminu a kadaverinu bylo nízké a je zobrazeno v Obrázku 22. Obsah kadaverinu se po celou nezměnil (0,701–1,996 mg/l), zatímco u fenyletylaminu se hodnoty pohybovaly v rozmezí 1,088–7,538 mg/l. V 57. den skladování došlo k jeho nárůstu při všech skladovaných teplotách.

Histamin v tamari shoyu již 29. den skladování dosáhl hodnoty 66,208 mg/l a tím se přiblížil k hraniční hodnotě, jak již bylo uváděno výše, a to100 mg/l [18]. Je zajímavé, že v 57. den došlo k výraznému snížení obsahu tohoto BA, a tudíž se lze pouze domnívat, zda by stále klesalo jeho množství s delší dobou skladování. Tato problematika by mohla být předmětem dalšího výzkumu.



Obrázek 21: Množství putrescinu, histaminu a tyraminu v tamari shoyu v průběhu 57 denního skladování při teplotách 8 °C, 23 °C a 30 °C



Obrázek 22: Množství kadaverinu a fenyletylaminu v tamari shoyu v průběhu 57 denního skladování při teplotách 8 °C, 23 °C a 30 °C

Druhou testovanou sójovou omáčkou byla koikuchi shoyu, ve které byl stanoven obsah fenyletylaminu, putrescinu, histaminu, tyraminu, tryptaminu a kadaverinu. Množství fenyletylaminu (7,273–13,921 mg/l) i putrescinu (16,336–28,823 mg/l) bylo po celou dobu skladování téměř konstantní (viz Obrázek 23). Obsah histaminu (1,439–43,889 mg/l) byl až do 29. dne velmi nízký při všech skladovacích teplotách, avšak 57. den skladování došlo k jeho prudkému nárůstu. Naopak tyramin byl již na počátku skladování obsažen ve velkém množství (9,686–96,503 mg/l), přičemž až 57. den skladování došlo k jeho výraznému snížení.

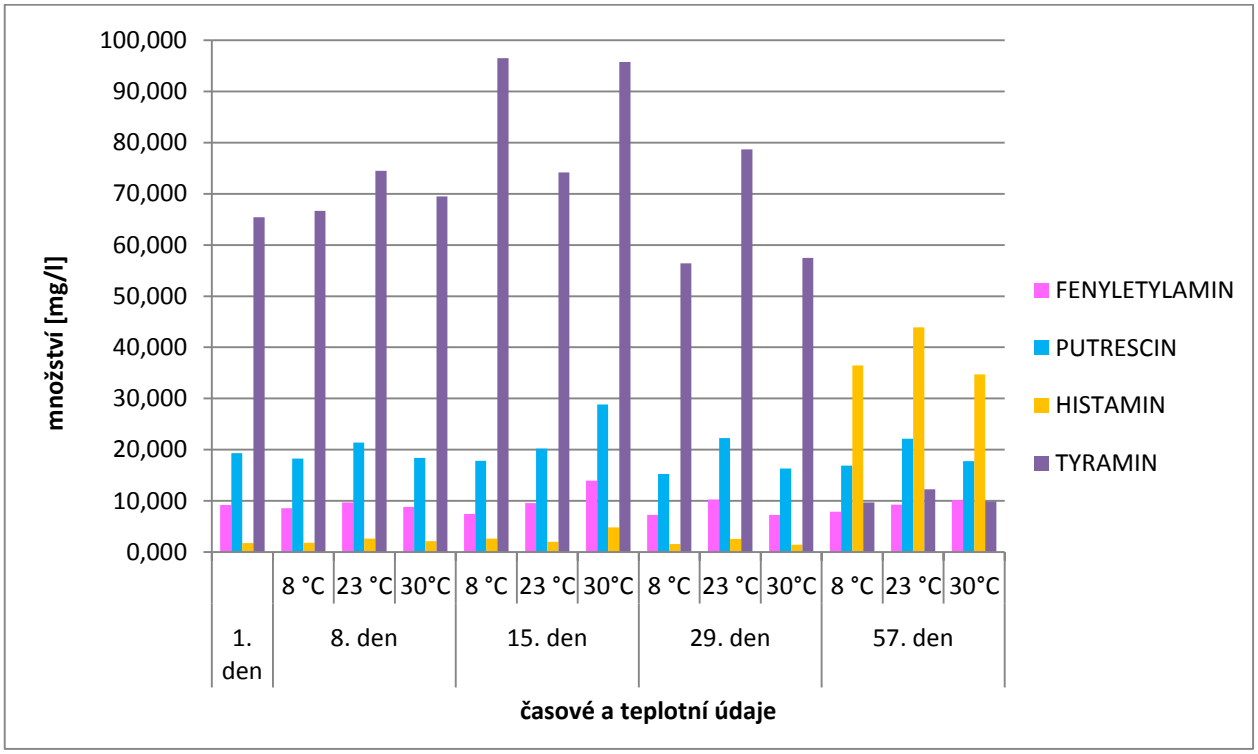
Z důvodu nízkého množství tryptaminu (4,514–5,819 mg/l) a kadaverinu (0,684–1,495 mg/l) byl vytvořen graf (viz Obrázek 24), ve kterém je znázorněna závislost množství těchto BA na teplotě a době skladování. Tryptamin byl přítomen v koikuchi shoyu pouze ve vzorcích odebraných po 1 a 8 dnech skladování a to při všech testovaných teplotách. Kadaverin byl stanoven pouze na počátku experimentu, a to 1. den, 8. den při 23 °C a 15. den při 8°C.

U koikuchi shoyu byla potvrzena hypotéza Spano et al., kteří uvádí, že mino jiné potraviny, jako je i sójová omáčka, obsahují vyšší množství tyraminu [16].

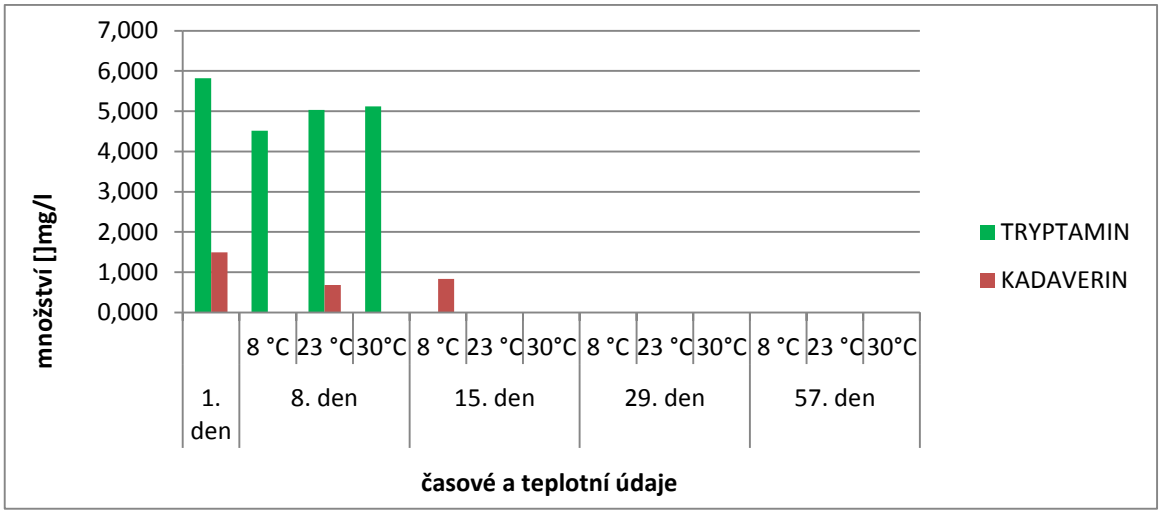
Lze se pouze domnívat, zda by množství histaminu rostlo s delší dobou skladování, avšak z pohledu spotřebitele, by bylo vhodnější neskladovat tento produkt příliš dlouhou dobu

Shruti et al. ve své práci uvádějí množství jednotlivých biogenních aminů v sójových omáčkách, avšak v produktech použitých v této práci byly nalezeny hodnoty nižší, než stanovili ve zmíněné studii [12].

V koikuchi shoyu, která je vyrobena ze sóji i pšenice byl na rozdíl od tamari shoyu analyzován i tryptamin. Rozlišné hodnoty biogenních aminů v těchto sójových omáčkách mohou být způsobeny použitými surovinami i procesem výroby.



Obrázek 23: Množství fenyletylaminu, putrescinu, histaminu a tyraminu v koikuchi shoyu v průběhu 57 denního skladování při teplotách 8 °C, 23 °C a 30 °C

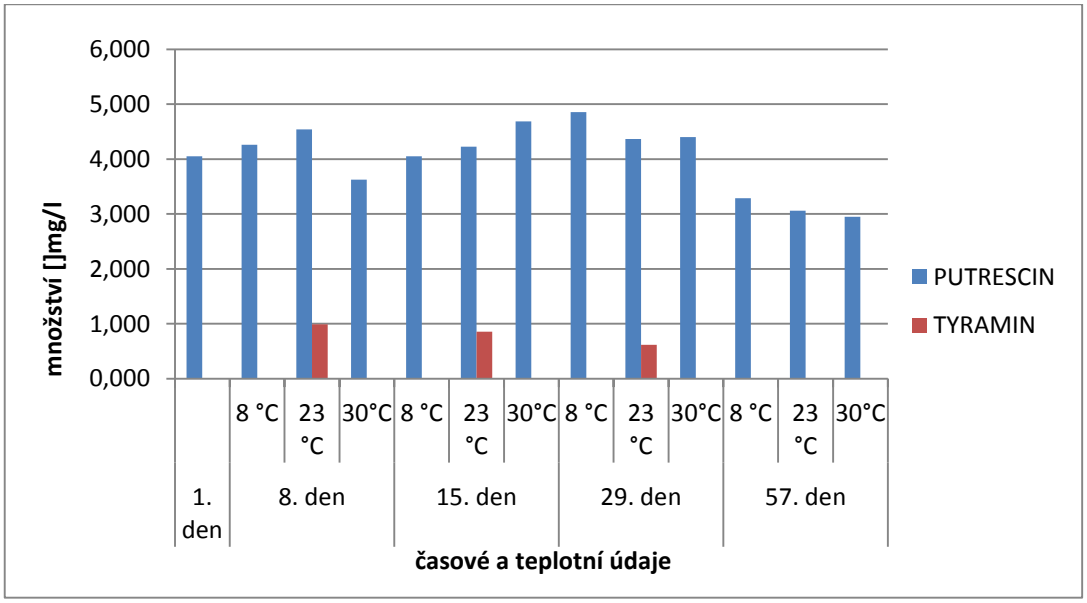


Obrázek 24: Množství tryptaminu a kadaverinu v koikuchi shoyu v průběhu 57 denního skladování při teplotách 8 °C, 23 °C a 30 °C

6.3.5 Komesu

Při stanovení BA ve vzorku rýžového octa komesu bylo zjištěno téměř konstantní množství putrescinu (2,948–4,858 mg/l) po celou dobu jeho skladování, při všech skladovacích teplotách. Dále u vzorků skladovaných 8,15 a 29 dní při 23 °C byl nalezen tyramin, a to v množství 0,618–0,987 mg/l.

Tento výrobek se jevil jako velmi stabilní, co se týče obsahu biogenních aminů ve vztahu k rozdílným teplotám v průběhu skladování.



Obrázek 25: *Množství putrescinu a tyraminu v komesu v průběhu 75 denního skladování při teplotách 8 °C, 23 °C a 30 °C*

ZÁVĚR

Tato diplomová práce se v první části zabývá procesem fermentace, dále problematikou biogenních aminů a typickými asijskými fermentovanými produkty. K testování byly vybrány nejznámější a nejprodávanější fermentované produkty (miso pasty, sójové omáčky – tamari shoyu a koikuchi shoyu, rýžový ocet, tempeh a kimči). V další části práce byla podrobně popsána jejich výroba, způsob konzumace a z toho plynoucí nutriční aspekty. Velká pozornost byla také věnována mikrobiální kultuře použité při výrobě a vývoji mikroflóry v těchto produktech.

V druhé části diplomové práce byly výrobky podrobeny mikrobiální analýze s cílem zjistit počty sledovaných indikátorových skupin mikroorganizmů (fakultativně anaerobních mezofilních mikroorganizmů, enterobakterií, stafylokoků, kvasinek a plísní a bakterií mléčného kvašení). Studované vzorky byly uchovávány po určitou dobu při různých skladovacích teplotách, s cílem simulovat podmínky prostředí, ve kterých se tyto výrobky uchovávají v asijských zemích. V poslední části práce byly produkty podrobeny analýze pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie za účelem vyhodnocení množství a identifikaci biogenních aminů.

Výsledky provedené mikrobiologické analýzy lze shrnout následovně:

- nejvyšší počty mezofilních fakultativně anaerobních mikroorganizmů, enterobakterií, plísní a kvasinek v miso pastách byly zpozorovány po 15 dnech skladování zejména při teplotách 23 °C a 30 °C,
- v miso genmai byly zaznamenány nejvyšší počty mezofilních fakultativně anaerobních mikroorganizmů, enterobakterií, kvasinek a plísní, zatímco v mugi miso byl stanoven nejvyšší počet enterobakterií a v miso shiro byl zjištěn nejvyšší počet kvasinek a plísní,
- u sójových omáček byl pozorován pouze malý nárůst fakultativně anaerobních mikroorganizmů, plísní a kvasinek, přičemž tamari shoyu vykazoval větší odolnost vůči růstu těchto mikroorganizmů,
- v rýžovém octu komesu byl zaznamenán růst fakultativně anaerobních mikroorganizmů, plísní a kvasinek, to pouze ve velmi malém množství,
- nejvyšší počty mezofilních fakultativně anaerobních mikroorganizmů, enterobakterií a stafylokoků ve vzorcích tempehu jsou zpozorovány po 4 dnech skladování při teplotě 30 °C,

- v tempehu indonesia jsou zaznamenány nejvyšší počty všech sledovaných skupin mikroorganizmů (kromě bakterií mléčného kvašení).

Výsledky chromatografické analýzy biogenních aminů lze shrnout takto:

- v miso pastách byl z biogenních aminů nalezen jen tyramin a to ve velmi malých množstvích (0,048–1,765 mg/l),
- analyzovaná množství biogenních aminů (putrescinu, kadaverinu, histaminu, tyraminu a spermidinu) ve vybraných testovaných druzích tempehu jsou velmi nízká 0,058–3,048 mg/kg,
- v kimči byly detekovány velmi nízké obsahy tyraminu a spermidinu, jejich množství se pohybovalo od 0,161–0,531 mg/kg,
- v tamari shoyu byl zaznamenán výskyt putrescinu, tyraminu, fenyletylaminu, kadaverinu a histaminu, jenž dosahoval nejvyšších hodnot (3,306–66,208 mg/l), které by však neměly ohrožovat lidské zdraví (zdravých jedinců),
- v koikuchi shoyu byl stanoven fenyletylamin, putrescin, histamin, tryptamin, kadaverin a tyramin, který dosahoval nejvyšších hodnot (9,686–96,503 mg/l),
- v komesu byly zaznamenány nízké hodnoty putrescinu a tyraminu pohybující se v rozmezí 0,987–4,858 mg/l

Z dosažených výsledků této práce vyplývá, že u analyzovaných asijských fermentovaných potravin bylo během skladování při teplotách 8 °C, 23 °C a 30 °C zjištěno rozdílné zastoupení vybraných indikátorových skupin mikroorganizmů. Rozdílné počty kolonií sledovaných skupin mikroorganizmů a biogenních aminů byly pravděpodobně způsobeny použitými surovinami a technologických procesem výroby těchto produktů. Je důležité věnovat pozornost složení jednotlivých druhů potravin a také jejich mikroflóře, zejména v souvislosti s jejich skladováním a tím zabezpečit jejich údržnost a zdravotní nezávadnost.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

[1] DAS, A. J. a S. C. DEKA. MiniReview: Fermented food and beverages of the North-East India. In: *International Food Research Journal*. India, 2012, s. 377-392.

[2] ŠPALEK, Jiří, Olga CWIKOVÁ a Vlastimil DOHNAL. Fermentované rostlinné potraviny asijského původu na českém trhu. In: *Výživa a potraviny*. Společnost pro Výživu, 2008, s. 52-54.

[3] HUI, Y. *Handbook of food and beverage fermentation technology*. New York: Marcel Dekker, c2004. Food science and technology (Marcel Dekker, Inc.), 134. ISBN 08-247-4780-1.

[4] MAH, Jae-Hyung. Fermented Soybean Foods: Significance of Biogenic Amines. Austin J Nutri Food Sci. 2015;3(1): 1058.

[5] KATZ, Sandor Ellix. *Síla přírodní fermentace: jedinečná chuť*. 1. vyd. Praha: Grada, 2015, 255 s. ISBN 978-80-247-5214-3.

[6] SVOBODOVÁ, Zuzana. *Dekarboxylázová aktivita bakterií izolovaných z mléka a mléčných výrobků*. Zlín, 2011. Bakalářská. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně. Vedoucí práce Leona Buňková.

[7] KALOUSOVÁ, Iveta. *Vliv vnějších faktorů na dekarboxylázovou aktivitu Bifidobacterium animalis subsp. lactis*. Zlín, 2014. Bakalářská. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně. Vedoucí práce Doc. RNDr. Leona Buňková, Ph.D.

[8] PUREVDORJ, Khatantuul. *Produkce biogenních aminů bakteriemii zolovanými z masných výrobků a produktů studené kuchyně*. Zlín, 2011. Bakalářská. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně.

[9] ZÁLEŠÁKOVÁ, Ludmila. *Monitoring obsahu biogenních aminů ve vybraných fermentovaných potravinách živočišného původu*. Zlín, 2011. Diplomová práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně. Vedoucí práce Doc. Ing. František Buňka, Ph.D.

[10] ONDRUCHOVÁ, Simona. *Produkce biogenních aminů bakteriemi izolovanými z moravských vín*. Zlín, 2013. Bakalářská. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně. Vedoucí práce Doc. RNDr. Leona Buňková Ph.D.

[11] BLAHOVÁ, Jitka. *Detekce mikroorganismů účastnících se tvorby biogenních aminů ve fermentovaných potravinách*. Brno, 2008. Diplomová práce. Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně. Vedoucí práce Ing. Radka Burdychová, Phd.

[12] SHRUTI Shukla, Jong-Kyu Kim and Myunghee Kim (2011). *Occurrence of Biogenic Amines in Soybean Food Products, Soybean and Health*, Prof. Hany El-Shemy (Ed.), ISBN: 978-953-307-535-8, InTech, Available from: http://www.intechopen.com/books/soybean-and-health/occurrence-of-biogenic-amines-in-soybean-foodproducts

[13] NAILA, Aishath; FLINT, Steve; FLETCHER, Graham; BREMER, Phil; MEERDINK, Gerrit. Control of Biogenic Amines in Food−Existing and Emerging. 2010, vol 75, no.7s. R139-R150. ISSN:0022-1147.

[14] NOVICKÁ, Kateřina. *Biologicky aktivní aminy ve vybraných fermentovaných potravinách živočišného původu*. Brno, 2010. Dizertační práce. Mendelova univerzita v Brně. Vedoucí práce Prof. MVDr. Ing. T. Komprda, CSc.

[15] SANTOS, M.H.Silla. Biogenic Amines: Their importance in Foods. 1996, vol. 29, no. 2 s. 213-231. ISSN:0168-1605.

[16] SPANO, G, P RUSSO, A LONVAUD-FUNEL, et al. Biogenic amines in fermented foods. In: *European Jurnal of Clinical Nutrition*. Macmillian Publishers Limited, 2010, s. 95-100. ISSN 0954-3007.

[17] BUŇKA, František, Pavel BUDINSKÝ, Markéta ČECHOVÁ, Viliam DRIENOVSKÝ, Vendula PACHLOVÁ, Dagmar MATOULKOVÁ, Vlastimil KUBÁŇ a Leona BUŇKOVÁ. Content of biogenic amines and polyamines in beers from the Czech Republic. *Journal of the Institute of Brewing* [online]. 2012, **118**(2): 213-216 [cit. 2015-10-15]. DOI: 10.1002/jib.31. ISSN 00469750.Dostupné z: http://doi.wiley.com/10.1002/jib.31

[18] KLČOVSKÁ, Pavlína. *Vliv vnějšího prostředí na produkci histaminu kmenem Enterobacter aerogenes CCM 2531*. Zlín, 2011. Diplomová práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně. Vedoucí práce Doc. RNDr. Leona Buňková Ph.D.

[19] BECK, Martin. *Stanovení vybraných biogenních aminu metodou kapalinové chromatografie s hmotnostně-spektrometrickou detekcí*. Zlín, 2014. Diplomová. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně. Vedoucí práce Lucie Vydrová.

[20] BUŇKOVÁ, Leona, Gabriela ADAMCOVÁ, Kateřina HUDCOVÁ, Eva LORENCOVÁ, František BUŇKA, Helena VELICHOVÁ a Vendula PACHLOVÁ. Monitoring of biogenic amines in cheeses manufactured at small-scale farms and in fermented dairy products in the Czech Republic. *Food chemis-*

try [online]. 2013, **141**(1): 548–551 [cit. 2015-10-15]. Dostupné z: www.elsevier.com/locate/foodchem

[21] BUŇKA, František, Blanka ZIMÁKOVÁ, Marek MERHAUT, Radka FLASAROVÁ, Pavel BUDINSKÝ, Vendula PACHLOVÁ, Vlastimil KUBÁŇ a Leona BUŇKOVÁ. Biogenic amines occurrence in fish meat sampled from restaurants in region of Czech Republic. MORTON, Ian Douglas a Chloe MORTON. *Elsevier: Food control* [online]. 1st ed. Amsterdam: Elsevier scientific publishing company, 2013, (31): 49-52 [cit. 2015-10-15]. ISSN 0956-7135.Dostupné z: www.elsevier.com/locate/foodcont

[22] VELÍŠEK, J.: *Chemie potravin 3*, 1. vydání, OSSIS Tábor., 1999. 123-130 s. ISBN 80-902391-5-3

[23] RIAZ, Mian N. *Soy applications in food*. Boca Raton, Fla.: CRC, 2006. ISBN 08-493-2981-7.

[24] ENDRES, Joseph G. *Soy protein products: characteristics, nutritional aspects, and utilization*. Rev. and expanded ed. Champaign, IL: AOCS Press, c2001. ISBN 18-939-9727-8.

[25] NOUT, M.J.R. a J.L. KIERS. Tempe fermentation, innovation and functionality: update into the third millenium. In: *Journal of Applied Microbiology*. 2005, **98**(4), s. 789-805. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2004.02471.x. ISSN 1364-5072. Dostupné také z: http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2672.2004.02471.x

[26] MUROOKA, Yoshikatsu a Ichiro SAEKI. *That's why Japanese Food is Loved All Over the World: The Source of the Health and Longevity*. 1. New York: Science Publishing Group, 2015. ISBN 978-1-940366-35-7.

[27] BEUCHAT, Larry R. *Food and beverage mycology*. 2nd ed. New York, N.Y.: Van Nostrand Reinhold, c1987, xiii, 661 p. ISBN 04-422-1084-1.

[28] BAMFORTH, Charles W a Robert E WARD. *The Oxford handbook of food fermentations*. New York: Oxford University Press, 2014. ISBN 978-019-9742-707.

[29] LIOE, Hanifah Nuryani; WADA, Koji; AOKI, Takayoshi; YASUDA, Masaaki. Chemical and Sensory Charakteristics of Low Molecular Weight Fractions Obtained from Three Types of Japanese Soy Sauce (Shoyu) – Koikuchi, Tamari and Shiro Shoyu. *Food Chemistry*. 2007, vol. 100, no. 4s. 1669-1677. ISSN:0308-8146.

[30] KANEKO, Shu, Kenji KUMAZAWA a Osamu NISHIMURA. Comparison of Key Aroma Compounds in Five Different Types of Japanese Soy Sauces by Aroma Extract Dilution Analysis (AEDA). In: *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2012, **60**(15), s. 3831-3836. DOI: 10.1021/jf300150d. ISSN 0021-8561. Dostupné také z: http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf300150d

[31] WILLIAM SHURTLEFF. *The book of miso*. Illustrated by Akiko Aoyagi. Soquel, CA: Autumn Press, 1976. ISBN 03-947-3432-7.

[32] *Soy in health and disease prevention*. Boca Raton, FL: Taylor, 2006. ISBN 0849335957.

[33] FARNWORTH, Edward R. *Handbook of fermented functional foods*. 2nd ed. Boca Raton: CRC Press, c2008. Functional foods. ISBN 14-200-5326-4.

[34] BYUN, Bo Young; MAH, Jae-Hyung. Occurrence of Biogenic Amines in Miso, japanese Traditional Fermented Soybean Paste. *Journal of Food Science*. 2012, vol. 77, no. 12 s. T216-T223. ISSN:0022-1147.

[35] JOHN AND JAN BELLEME. *Japanese Foods that Heal Using Traditional Ingredients to Promote Health, Longevity*. 1st ed. New York: Tuttle Pub, 2011. ISBN 14-629-0007-0.

[36] KULIGOWSKI, Maciej, Alexandra GINJA, Małgorzata MAJCHER a Henryk JELEŃ. Determination of compounds responsible for tempeh aroma. *Food chemistry* [online]. Amsterdam: Elsevier Science, 1976, **141**(1): 459–465 [cit. 2015-10-16]. ISSN 1873-7072.

[37] SHURTLEFF, William a Akiko AOYAGI. *The book of tempeh*. Professional ed., 1st ed. New York: Harper, c1979, 245 p. ISBN 0060140097.

[38] STEINKRAUS, Keith H. *Handbook of indigenous fermented foods*. 2nd ed., rev. and expanded. New York: Marcel Dekker, 1995. Food science and technology (Marcel Dekker, Inc.), 73. ISBN 08-247-9352-8.

[39] SULCHAN, Mohammad a MG Isworo RUKMI. Effect of tempe gembus on cholesterol profile in hyperlipidemic rats. In: *Mediacal jurnal of Indonesia*. 2007, s. 216-211. DOI: http://dx.doi.org/10.13181/mji.v16i4.281. ISSN 2252-8083.

[40] FERREIRA, MárciaPires. Changes in the isoflavone profile and in the chemical composition of tempeh during processing and refrigeration. *Pesq.agropec.*

bras. [online]. 2011, **46**(11): 1555-1561 [cit. 2015-10-16]. Dostupné z: http://www.scielo.br/

[41] LI, Sha, Pan LI, Feng FENG a Li-Xin LUO. Microbial diversity and their roles in the vinegar fermentation process. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2015, **99**(12), 4997-5024. DOI: 10.1007/s00253-015-6659-1. ISSN 0175-7598. Dostupné také z: http://link.springer.com/10.1007/s00253-015-6659-1

[42] LISA SOLIERI .., EDS., Lisa Solieri .., eds. *Vinegars of the world*. Online-Ausg. Milan: Springer, 2009. ISBN 978-884-7008-656.

[43] NANDA, Kumiko, Mariko TANIGUCHI, Santoshi UJIKE, Nobuhiro ISHIHARA, Hirotaka MORI, Hisayo ONO a Yoshikatsu MUROOKA. Characterization of Acetic Acid Bacteria in Traditional Acetic Acid Fermentation of Rice Vinegar (Komesu) and Unpolished Rice Vinegar (Kurosu) Produced in Japan. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY,* 2000, **2**(67), 986-990. DOI: 0.1128/AEM.67.2.986–990.2001.

[44] RAY, Ramesh C a Didier MONTET. *Microorganisms and fermentation of traditional foods*. Ilustrované vydání. Boca Raton: CRC Press, 2014. ISBN 978-148-2223-088.

[45] HACHISU, Nancy Singleton, David TANIS a Kenji MIURA. *Preserving the Japanese way: traditions of salting, fermenting, and pickling for the modern kitchen*. ISBN 14-494-5088-1.

[46] SHIZUMA, Toru, Kazuo ISHIWATA, Masanobu NAGANO, Hidezo MORI a Naoto FUKUYAMA. Protective effects of fermented rice vinegar sediment (Kurozu moromimatsu) in a diethylnitrosamine-induced hepatocellular carcinoma animal model. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*. 2011, **49**(1), 31-35. DOI: 10.3164/jcbn.10-112. ISSN 1880-5086. Dostupné také z: http://joi.jlc.jst.go.jp/JST.JSTAGE/jcbn/10-112.?from=CrossRef

[47] PARK, Jung-Min, Jin-Ho SHIN, Ja-Gyeong GU, et al. Effect of antioxidant activity in kimchi during a short-term and over-ripening fermentation period. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2011, **112**(4), 356-359. DOI: 10.1016/j.jbiosc.2011.06.003. ISSN 13891723. Dostupné také z: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1389172311002258

[48] JUNG, J. Y., S. H. LEE, J. M. KIM, M. S. PARK, J.-W. BAE, Y. HAHN, E. L. MADSEN a C. O. JEON. Metagenomic Analysis of Kimchi, a Traditional Korean Fermented Food. *Applied and Environmental Microbiology*. 2011, **77**(7), 2264-2274. DOI: 10.1128/AEM.02157-10. ISSN 0099-2240. Dostupné také z: http://aem.asm.org/cgi/doi/10.1128/AEM.02157-10

[49] JUNG, Ji Young, Se Hee LEE a Che Ok JEON. Kimchi microflora: history, current status, and perspectives for industrial kimchi production. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2014, **98**(6), 2385-2393. DOI: 10.1007/s00253-014-5513-1. ISSN 0175-7598. Dostupné také z: http://link.springer.com/10.1007/s00253-014-5513-1

[50] LEE, Mo-Eun, Ja-Young JANG, Jong-Hee LEE, Hae-Woong PARK, Hak-Jong CHOI a Tae-Woon KIM. Starter Cultures for Kimchi Fermentation. *J. Microbiol. Biotechnol*. 2015, **25**(5), 559–568. ISSN 1017-7825.

[51] *Applications of biotechnology to traditional fermented foods: report of an ad hoc panel of the Board on Science and Technology for International Development*. Washington, D.C.: National Academy Press, 1992. ISBN 0-309-04685-8.

[52] PARK, Kun-Young, Ji-Kang JEONG, Young-Eun LEE a James W. DAILY. Health Benefits of Kimchi (Korean Fermented Vegetables) as a Probiotic Food. *Journal of Medicinal Food*. 2014, **17**(1), 6-20. DOI: 10.1089/jmf.2013.3083. ISSN 1096-620x. Dostupné také z: http://online.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/jmf.2013.3083

[53] KIM, Eun Kyoung, So-Yeon AN, Min-Seok LEE, Tae Ho KIM, Hye-Kyoung LEE, Won Sun HWANG, Sun Jung CHOE a Tae-Young KIM. Fermented kimchi reduces body weight and improves metabolic parameters in overweight and obese patients. *Nutrition Research*. 2011, **31**(6), 436–443. DOI: 10.1016/j.nutres.2011.05.011. ISSN 02715317. Dostupné také z: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S027153171100114X

[54] CHANG, J.-H., Y.Y. SHIM, S.-K. CHA a K.M. CHEE. Probiotic characteristics of lactic acid bacteria isolated from kimchi. *Journal of Applied Microbiology*. 2010, **2010**(109), DOI: 10.1111/j.1365-2672.2009.04648.x. ISSN 13645072. Dostupné také z: http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2672.2009.04648.x

[55] LI, Jing, Jennifer L. CHAYTOR, Brandon FINDLAY, Lynn M. MCMULLEN, David C. SMITH a John C. VEDERAS. Identification of Didecyldimethylammonium Salts and Salicylic Acid as Antimicrobial Compounds in Commercial Fermented Radish Kimchi. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2015, **63**(11), 3053-3058. DOI: 10.1021/jf5063588. ISSN 0021-8561. Dostupné také z: http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf5063588

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

AGM	Agmatin
BA	Biogenní aminy
BMK	Bakterie mléčného kvašení
CE	Kapilární elektroforéza
CAD	Kadaverin
CFU	Kolonie tvořící jednotky
DOPA	Dihydroxyfenylalanin
FDA	US Food and Drug Administration (úřad pro kontrolu potravin a léčiv)
GC	Plynová chromatografie
GMO	Geneticky modifikované organizmy
HIM	Histamin
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie
JAS	Japan Agricultural Standards (Japonské zemedělské standardy)
KS	Koikuchi shoyu
K	Komesu
KIM	Kimči
MG	Miso genmai
MH	Miso hatcho
MM	Miso mugi
MS	Miso shiro
NPU	Net Protein Utilization (čistá využitelnost bílkovin)
PCA	Polymerázová řetězová reakce
PEA	2-fenyletylamin
PUT	Putrescin

RAPD	Random-amplified polymorphic DNA (náhodně amplifikovaná polymorfní DNA)
REP element-PCR	Repetitive sequence-based PCR (opakující se sekvence bází PCR)
SPD	Spermidin
SPM	Spermin
SS	Shiro shoyu
SSS	Sai-Shikomi shoyu
TLC	Tenkovrstvá chromatografie
TM	Tempeh marinovaný
TN	Tempeh natural
TP	Tempeh párty
TRM	Tyramin
TS	Tamari shoyu
TYM	Tryptamin
US	Usuchi shoyu
USD	United states dollars (americký dolar)
USDA	US Department of Agriculture (americké ministerstvo zemědělství)

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Typy sójových omáček [30] 26
Obrázek 2: Různé druhy miso past (zleva nahoře shiro miso, vedle mugi miso, pod ním hatcho miso a genmai miso) 28
Obrázek 3: Postup při výrobě rýžových octů komesu a kurosu [42] 36
Obrázek 4: Výrobna tempehu v Indonésii 46
Obrázek 5: Počty sledovaných skupin mikroorganizmů (log CFU/g) u polotuhých vzorků (pasty miso) skladovaných při teplotě 30°C po dobu 15. dnů 55
Obrázek 6: Počty sledovaných skupin mikroorganizmů (log CFU/g) u polotuhých vzorků (pasty miso) skladovaných při teplotě 23°C po dobu 15. dnů 56
Obrázek 7: Celkový počet mikroorganizmů (log CFU/ml) u tamari shoyu sledovaný na půdě PCA v průběhu 57denního skladování při různých teplotách 57
Obrázek 8: Celkový počet mikroorganizmů (log CFU/ml) u koikuchi shoyu sledovaný na půdě PCA v průběhu 57denního skladování při různých teplotách 57
Obrázek 9: Celkový počet kolonií mikroorganizmů (log CFU/ml) u vzorku komesu sledovaný na půdě PCA v průběhu 57denního skladování při různých teplotách 58
Obrázek 10: Porovnání celkového počtu mikroorganizmů u polotuhých a tuhých vzorků po zakoupení a 57. den skladování při různých teplotách 59
Obrázek 11: Porovnání celkového počtu mikroorganizmů u polotuhých a tuhých vzorků po zakoupení a 15. den skladování při různých teplotách 59
Obrázek 12: Počty sledovaných skupin mikroorganizmů (log CFU/g) u tuhých vzorků (tempehy) skladovaných při teplotě 30 °C po dobu 4. dnů 61
Obrázek 13: Porovnání vybraných skupin mikroorganizmů (log CFU/g) u vzorku tempeh natural (TN) a tempeh indonesia (TI) po 2 dnech skladování 62
Obrázek 14: Porovnání vybraných skupin mikroorganizmů (log CFU/g) u vzorku tempeh natural (TN) a tempeh indonesia (TI) po 4 dnech skladování 63
Obrázek 15: Porovnání vybraných skupin mikroorganizmů (log CFU/g)u kimči 1., 4. a 5. den skladování při teplotě 23 °C 63
Obrázek 16: Množství tyraminu ve vzorku miso hatcho v průběhu 57 denního skladování při teplotách 8 °C, 23 °C a 30 °C 65
Obrázek 17: Detekovaná množství biogenních aminů v tempehu párty v průběhu 5 denního skladování při teplotách 8 °C, 23 °C a 30 °C 66

Obrázek 18: Detekovaná množství biogenních aminů v tempehu marinovaný v průběhu 5 denního skladování při teplotách 8 °C, 23 °C a 30 °C 67
Obrázek 19: Detekovaná množství biogenních aminů v tempehu natural v průběhu 5 denního skladování při teplotách 8 °C, 23 °C a 30 °C 68
Obrázek 20: *Množství tyraminu a spemidinu v kimči v průběhu 5 denního skladování při teplotách 8 °C, 23 °C a 30 °C*..... 69
Obrázek 21: Množství putrescinu, histaminu a tyraminu v tamari shoyu v průběhu 57 denního skladování při teplotách 8 °C, 23 °C a 30 °C 70
Obrázek 22: Množství kadaverinu a fenyletylaminu v tamari shoyu v průběhu 57 denního skladování při teplotách 8 °C, 23 °C a 30 °C 71
Obrázek 23: Množství fenyletylaminu, putrescinu, histaminu a tyraminu v koikuchi shoyu v průběhu 57 denního skladování při teplotách 8 °C, 23 °C a 30 °C..... 72
Obrázek 24: Množství tryptaminu a kadaverinu v koikuchi shoyu v průběhu 57 denního skladování při teplotách 8 °C, 23 °C a 30 °C 73
Obrázek 25: *Množství putrescinu a tyraminu v komesu v průběhu 75 denního skladování při teplotách 8 °C, 23 °C a 30 °C* 73

SEZNAM TABULEK

Tab. 1: Fermentované potraviny a jejich požadované ingredience [3] 14
Tab. 2: Vybrané mikroorganizmy používané k fermentaci potravin [3] 14
Tab. 3: BA, jejich prekurzory, další produkty a biologický význam [22] 20
Tab. 4: Množství vitaminů ve fermentovaných asijských potravinách [2] 23
Tab. 5: Obsah vitaminů v nezpracované rýži, pšenici a sóji [2] 23
Tab. 6: Obsah tyraminu a histaminu ve vybraných skupinách potravin [14] 24
Tab. 7: Obsahy biogenních aminů [mg/g] v různých sójových produktech [12] 25
Tab. 8: Procentuální množství proteinu v tempehu a různých potravinách [38] 33
Tab. 9: Kvalita proteinu [NPU – čistá využitelnost bílkoviny] v tempehu a různých potravinách [38] 34
Tab. 10: Charakteristika použitých vzorků 45
Tab. 11: Gradientový eluční program separace biogenních aminů 54

SEZNAM PŘÍLOH

Příloha I: Výsledky mikrobiologických odečtů u tekutých a polotuhých vzorků

Příloha II: Výsledky mikrobiologických odečtů u tuhých vzorků

Příloha III: Fotografie vzorku tempeh indonesia

Příloha IV: Výsledky chromatografické analýzy biogenních aminů

PŘÍLOHA I: VÝSLEDKY MIKROBIOLOGICKÝCH ODEČTŮ U TEKUTÝCH A POLOTUHÝCH VZORKŮ

Počty kolonií v CFU/ml u tekutých vzorků a CFU/g u polotuhých vzorků v průběhu časového období při různých skladovacích teplotách na půdě PCA

Vzorek	CFU/ml					
	1. den	Teplota skladování	8. den	15. den	29. den	57. den
MG	250000	8 °C	450000	250000	6700000	200000
		23 °C	1300000	55500000	ND	125000
		30 °C	2500000	82500000	1500000	175000
MM	250000	8 °C	45000	1450000	ND	70000
		23 °C	100000	10800000	ND	40000
		30 °C	55000	13000000	ND	165000
MS	50000	8 °C	5000	270000	1000	200000
		23 °C	80000	17600000	ND	50000
		30 °C	640000	500000	50000	50000
MH	50000	8 °C	ND	35000	200	50000
		23 °C	250000	1360000	50000	150000
		30 °C	5000	90000	ND	50000
TS	ND	8 °C	ND	ND	ND	ND
		23 °C	ND	ND	5	5
		30 °C	ND	50	10	10
KS	ND	8 °C	ND	500	20	10
		23 °C	ND	100	10	335
		30 °C	ND	ND	20	15
K	ND	8 °C	ND	ND	ND	65
		23 °C	ND	150	ND	5
		30 °C	ND	100	75	5

ND…nedetekováno

Počty kolonií v CFU/g u jednotlivých vzorků v průběhu časového období při různých skladovacích teplotách na půdě ENDO

Vzorek	CFU/ml					
	1. den	Teplota skladování	8. den	15. den	29. den	57. den
MG	ND	8 °C	ND	150000	ND	10000
		23 °C	25000	11000000	ND	5000
		30 °C	10000	13000000	ND	70000
MM	5000	8 °C	ND	500000	ND	9500
		23 °C	160000	31000000	ND	9000
		30 °C	ND	9000000	ND	80000
MS	5000	8 °C	ND	240000	2000	25000
		23 °C	100000	1300000	ND	ND
		30 °C	110000	205000	ND	75000
MH	ND	8 °C	ND	260000	10000	18000
		23 °C	120000	390000	ND	6000
		30 °C	5000	80000	ND	23000

ND…nedetekováno

Počty kolonií v CFU/g u jednotlivých vzorků v průběhu časového období při různých skladovacích teplotách na půdě MSA

Vzorek	CFU/ml					
	1. den	Teplota skladování	8. den	15. den	29. den	57. den
MG	300000	8 °C	400000	150000	50000	17600
		23 °C	1650000	65000	20000	650
		30 °C	4500000	110000	60000	100
MM	30000	8 °C	20000	40000	ND	100
		23 °C	100000	45000	ND	600
		30 °C	300000	25000	ND	2150
MS	ND	8 °C	5000	5500	ND	1250
		23 °C	50000	ND	ND	1250
		30 °C	220000	ND	ND	250
MH	ND	8 °C	ND	100	500	1700
		23 °C	ND	4500	ND	6100
		30 °C	ND	1500	ND	1750

ND…nedetekováno

Počty kolonií v CFU/g u tekutých vzorků a CFU/g u polotuhých vzorků v průběhu časového období při různých skladovacích teplotách na půdě CHYGA

Vzorek	CFU/ml					
	1. den	Teplota skladování	8. den	15. den	29. den	57. den
MG	ND	8 °C	5000	5000	500	50
		23 °C	5000	30000	ND	150
		30 °C	10000	150000	ND	300
MM	ND	8 °C	5000	5000	ND	150
		23 °C	20000	70000	ND	300
		30 °C	5000	250000	ND	1350
MS	ND	8 °C	ND	5000	ND	150
		23 °C	ND	450000	ND	ND
		30 °C	35000	ND	5000	200
MH	ND	8 °C	ND	5000	ND	800
		23 °C	ND	30000	ND	800
		30 °C	ND	315000	ND	200
TS	ND	8 °C	ND	50	ND	ND
		23 °C	ND	ND	ND	ND
		30 °C	ND	ND	ND	ND
KS	ND	8 °C	ND	100	ND	ND
		23 °C	ND	ND	ND	ND
		30 °C	ND	ND	ND	ND
K	ND	8 °C	ND	200	ND	ND
		23 °C	ND	ND	ND	ND
		30 °C	ND	ND	ND	ND

ND…nedetekováno

Počty kolonií v CFU/g u jednotlivých vzorků v průběhu časového období při různých skladovacích teplotách na půdě MRS

Vzorek	CFU/ml					
	1. den	Teplota skladování	8. den	15. den	29. den	57. den
MG	ND	8 °C	ND	5000	ND	ND
		23 °C	ND	ND	ND	150
		30 °C	ND	50	50	ND
MM	ND	8 °C	ND	ND	1450	1200
		23 °C	ND	ND	ND	ND
		30 °C	ND	ND	ND	ND
MS	ND	8 °C	ND	800	350	50
		23 °C	ND	ND	1550	ND
		30 °C	ND	ND	165	50
MH	ND	8 °C	ND	50	ND	100
		23 °C	ND	50	ND	200
		30 °C	ND	ND	ND	ND

PŘÍLOHA II: VÝSLEDKY MIKROBIOLOGICKÝCH ODEČTŮ U TUHÝCH VZORKŮ

Počty kolonií v CFU/g u jednotlivých vzorků v průběhu časového období při různých skladovacích teplotách na půdě PCA

Vzorek	CFU/ml				
	1. den	Teplota skladování	2. den	4. den	5. den
TP	8700000	8 °C	70400000	800000000	100000000
		23 °C	209900000	1250000000	1300000000
		30 °C	149500000	1850000000	800000000
TM	750000	8 °C	8000000	290000000	515000000
		23 °C	2000000	700000000	540000000
		30 °C	13500000	1020000000	665000000
TN	3822	8 °C	115200000	500000	450000000
		23 °C	1294650000	900000000	1400000000
		30 °C	496200000	3050000000	1500000000
KIM	6800000	8 °C	50000	ND	20000000
		23 °C	699800000	145000000	10000000
		30 °C	1364600000	200000000	35000000

ND…nedetekováno

Počty kolonií v CFU/g u jednotlivých vzorků v průběhu časového období při různých skladovacích teplotách na půdě ENDO

Vzorek	CFU/ml				
	1. den	Teplota skladování	2. den	4. den	5. den
TP	2900000	8 °C	10650000	55000000	3000000
		23 °C	21200000	25000000	20000000
		30 °C	16850000	23000000	10000000
TM	50000	8 °C	1110000	2500000	1500000
		23 °C	5000	50000	15150000
		30 °C	70000	103000000	64000000
TN	11250000	8 °C	16250000	50000000	70000000
		23 °C	45200000	330000000	645000000
		30 °C	100400000	1020000000	1920000000
KIM	500	8 °C	20000	47000	ND
		23 °C	10000	7000	12500
		30 °C	15000	60000	ND

ND…nedetekováno

Počty kolonií v CFU/g u jednotlivých vzorků v průběhu časového období při různých skladovacích teplotách na půdě MSA

Vzorek	CFU/ml				
	1. den	Teplota skladování	2. den	4. den	5. den
TP	ND	8 °C	11000	2200000	50000
		23 °C	300000	1060000	7500000
		30 °C	500000	28000000	11500000
TM	50000	8 °C	7000	150000	1100000
		23 °C	500	2350000	33200000
		30 °C	100000	50000000	71600000
TN	1150000	8 °C	1300000	1500000	500000
		23 °C	950000	4000000	500000
		30 °C	1700000	19000000	1000000
KIM	ND	8 °C	ND	2000	1500
		23 °C	5000	8500	ND
		30 °C	1500	2500	ND

ND…nedetekováno

Počty kolonií v CFU/g u jednotlivých vzorků v průběhu časového období při různých skladovacích teplotách na půdě CHYGA

Vzorek	CFU/ml				
	1. den	Teplota skladování	2. den	4. den	5. den
TP	ND	8 °C	3000000	13000000	500000
		23 °C	4000000	14000000	10000000
		30 °C	10000	2500000	550000
TM	50000	8 °C	2400000	ND	5000000
		23 °C	2000	5000000	6500000
		30 °C	15000	100000	1000000
TN	148400000	8 °C	419850000	ND	540000000
		23 °C	267200000	420000000	380000000
		30 °C	248100000	525000000	3085000000
KIM	ND	8 °C	ND	ND	ND
		23 °C	ND	500	1000
		30 °C	ND	ND	3500

Počty kolonií v CFU/g u jednotlivých vzorků v průběhu časového období při různých skladovacích teplotách na půdě MRS

Vzorek	**CFU/ml**				
	1. den	**Teplota skladování**	**2. den**	**4. den**	**5. den**
TP	48600000	8 °C	45700000	860000000	30000000
		23 °C	111400000	1180000000	1335000000
		30 °C	63000000	580000000	470000000
TM	50000	8 °C	5500000	495000000	785000000
		23 °C	450000	680000000	405000000
		30 °C	14700000	415000000	285000000
TN	337150000	8 °C	4000000	238550000	900000000
		23 °C	50000000	346700000	1200000000
		30 °C	130000000	241750000	850000000
KIM	1150000	8 °C	7700000	85000000	115000000
		23 °C	14200000	125000000	140000000
		30 °C	22600000	220000000	170000000

PŘÍLOHA III: MIKROBIOLOGICKÝ ROZBOR VZORKU TEMPEH INDONESIA

Stanovení počtu koliformních bakterií na půdě EMB u vzorku tempeh indonesia skladovaném 2 dny při teplotě 8 °C

Stanovení počtu koliformních bakterií na půdě EMB u vzorku tempeh indonesia skladovaném 2 dny při teplotě 23 °C

Stanovení počtu koliformních bakterií na půdě EMB u vzorku tempeh indonesia skladovaném 3 dny při teplotě 8 °C

Stanovení počtu koliformních bakterií na půdě EMB u vzorku tempeh indonesia skladovaném 3 dny při teplotě 23 °C

Stanovení počtu koliformních bakterií na půdě EMB u vzorku tempeh indonesia skladovaném 4 dny při teplotě 8 °C

Stanovení počtu koliformních bakterií na půdě EMB u vzorku tempeh indonesia skladovaném 4 dny při teplotě 23 °C

PŘÍLOHA IV: VÝSLEDKY CHROMATOGRAFICKÉ AMALÝZY BIOGENNÍCH AMINŮ

Počty biogenních aminů ve vzorcích tempehu v průběhu skladování při různých teplotách

Druh tempehu	Doba skladování	Teplota skladování	PUT	CAD	HIM	TYM	SPD	SUMA
			MNOŽSTVÍ [mg/kg]	MNOŽSTVÍ [mg/kg]	MNOŽSTVÍ [mg/kg]	MNOŽSTVÍ [mg/kg]	MNOŽSTVÍ [mg/kg]	MNOŽSTVÍ [mg/kg]
TP	1. den		ND	ND	ND	0,127	ND	0,127
	2. den	8 °C	0,377	ND	ND	0,220	0,651	1,248
		23 °C	0,528	ND	ND	0,263	0,387	1,179
		30°C	0,434	ND	ND	0,201	0,570	1,205
	4. den	8 °C	0,487	ND	ND	0,166	0,516	1,170
		23 °C	0,834	0,086	ND	0,368	0,591	1,879
		30°C	0,976	0,132	ND	0,398	0,755	2,261
	5. den	8 °C	0,652	ND	ND	0,227	1,021	1,900
		23 °C	1,332	0,133	ND	0,175	0,587	2,227
		30°C	1,772	0,082	0,227	0,345	0,639	3,065
TM	1. den		0,515	ND	ND	0,144	0,772	1,431
	2. den	8 °C	0,356	ND	ND	0,128	0,538	1,022
		23 °C	0,414	ND	ND	0,165	0,794	1,374
		30°C	0,282	ND	ND	0,221	0,491	0,995
	4. den	8 °C	0,291	ND	ND	0,161	0,539	0,991
		23 °C	0,211	ND	ND	0,165	0,593	0,969
		30°C	0,321	0,079	0,144	0,416	0,409	1,368
	5. den	8 °C	0,461	ND	ND	0,166	0,711	1,338
		23 °C	0,282	ND	0,132	0,131	0,500	1,044
		30°C	0,712	0,102	0,323	0,685	0,922	2,745
TN	1. den		0,382	ND	ND	ND	ND	0,382
	2. den	8 °C	0,523	ND	ND	ND	0,169	0,692
		23 °C	0,542	ND	ND	ND	ND	0,542
		30°C	0,601	0,236	ND	ND	ND	0,837
	4. den	8 °C	0,447	ND	ND	ND	0,218	0,664
		23 °C	0,861	ND	ND	ND	ND	0,861
		30°C	3,048	1,270	0,305	1,462	ND	6,084
	5. den	8 °C	0,397	ND	ND	ND	0,411	0,808
		23 °C	0,431	ND	ND	0,058	0,172	0,661
		30°C	2,512	1,840	0,471	0,147	ND	4,971

ND…nedetekováno

Počty biogenních aminů ve tamari shoyu v průběhu skladování při různých teplotách

	Doba skladování	Teplota skladování	PEA	PUT	CAD	HIM	TYM	SUMA
			MNOŽSTVÍ [mg/l]	MNOŽSTVÍ [mg/l]	MNOŽSTVÍ [mg/l]	MNOŽSTVÍ [mg/l]	MNOŽSTVÍ [mg/l]	MNOŽSTVÍ [mg/l]
TS	1. den		1,293	21,356	1,875	51,033	19,891	95,447
	8. den	8 °C	1,430	17,564	1,266	41,652	17,287	79,198
		23 °C	1,273	20,716	1,206	54,264	22,365	99,823
		30°C	1,521	22,206	1,247	56,304	24,706	105,984
	15. den	8 °C	1,657	22,764	1,391	60,857	23,561	110,230
		23 °C	1,362	19,620	0,889	50,712	20,513	93,095
		30°C	1,088	15,156	0,701	45,632	17,823	80,400
	29. den	8 °C	1,740	22,921	1,996	66,208	32,519	125,383
		23 °C	1,426	20,819	1,122	56,100	22,566	102,034
		30°C	1,342	20,125	1,121	56,637	24,124	103,349
	57. den	8 °C	6,650	15,538	1,186	3,306	34,999	61,680
		23 °C	7,538	17,468	0,789	3,902	40,710	70,406
		30°C	6,992	16,760	0,718	3,714	38,394	66,578

ND…nedetekováno

Počty biogenních aminů v koikuchi shoyu v průběhu skladování při různých teplotách

	Doba skladování	Teplota skladování	TRYP	PEA	PUT	CAD	HIM	TYM	SUMA
			MNOŽSTVÍ [mg/l]	MNOŽSTVÍ [mg/l]	MNOŽSTVÍ [mg/l]	MNOŽSTVÍ [mg/l]	MNOŽSTVÍ [mg/l]	MNOŽSTVÍ [mg/l]	MNOŽSTVÍ [mg/l]
KS	1. den		5,819	9,211	19,322	1,495	1,736	65,400	102,983
	8. den	8 °C	4,514	8,580	18,245	ND	1,840	66,638	99,817
		23 °C	5,032	9,711	21,376	0,684	2,621	74,507	113,931
		30°C	5,118	8,817	18,367	ND	2,161	69,484	103,947
	15. den	8 °C	ND	7,459	17,854	0,837	2,652	96,503	125,306
		23 °C	ND	9,577	20,210	ND	2,004	74,152	105,943
		30°C	ND	13,921	28,823	ND	4,813	95,752	143,309
	29. den	8 °C	ND	7,273	15,250	ND	1,584	56,388	80,496
		23 °C	ND	10,284	22,274	ND	2,582	78,685	113,825
		30°C	ND	7,272	16,336	ND	1,439	57,474	82,521
	57. den	8 °C	ND	7,911	16,887	ND	36,493	9,686	70,977
		23 °C	ND	9,273	22,140	ND	43,889	12,248	87,550
		30°C	ND	10,107	17,783	ND	34,735	9,902	72,526

ND…nedetekováno

Počty biogenních aminů v komesu v průběhu skladování při různých teplotách

	Doba skladování	Teplota skladování	PUT	TYM	SUMA
			MNOŽSTVÍ [mg/l]	MNOŽSTVÍ [mg/l]	MNOŽSTVÍ [mg/l]
KOMESU	1. den		4,052	ND	4,052
	8. den	8 °C	4,262	ND	4,262
		23 °C	4,539	0,987	5,525
		30°C	3,627	ND	3,627
	15. den	8 °C	4,049	ND	4,049
		23 °C	4,224	0,853	5,077
		30°C	4,685	ND	4,685
	29. den	8 °C	4,858	ND	4,858
		23 °C	4,365	0,618	4,983
		30°C	4,403	ND	4,403
	57. den	8 °C	3,288	ND	3,288
		23 °C	3,058	ND	3,058
		30°C	2,948	ND	2,948

ND…nedetekováno

Počty biogenních aminů v kimči v průběhu skladování při různých teplotách

	Doba skladování	Teplota skladování	TYM	SPD	SUMA
			MNOŽSTVÍ [mg/l]	MNOŽSTVÍ [mg/l]	MNOŽSTVÍ [mg/l]
KIMČI	1. den		0,179	ND	0,179
	2. den	8 °C	0,161	ND	0,161
		23 °C	0,167	ND	0,167
		30°C	0,364	ND	0,364
	4. den	8 °C	0,208	0,232	0,440
		23 °C	0,165	ND	0,165
		30°C	0,683	ND	0,683
	5. den	8 °C	0,285	0,294	0,579
		23 °C	0,144	ND	0,144
		30°C	0,531	ND	0,531

ND…nedetekováno

Počty biogenních aminů v miso pastách v průběhu skladování při různých teplotách

Druh miso pasty	Doba skladování	Teplota skladování	TYM
			MNOŽSTVÍ [mg/l]
MM	1. den		1,129
	8. den	8 °C	0,442
		23 °C	0,482
		30°C	1,129
	15. den	8 °C	1,765
		23 °C	0,448
		30°C	0,483
	29. den	8 °C	0,384
		23 °C	0,488
		30°C	0,379
	57. den	8 °C	0,278
		23 °C	0,424
		30°C	0,492
MS	1. den		ND
	8. den	8 °C	0,033
		23 °C	0,069
		30°C	0,011
	15. den	8 °C	0,034
		23 °C	0,053
		30°C	0,155
	29. den	8 °C	0,080
		23 °C	0,384
		30°C	0,610
	57. den	8 °C	0,068
		23 °C	0,242
		30°C	0,323
MH	1. den		ND
	8. den	8 °C	ND
		23 °C	ND
		30°C	0,124
	15. den	8 °C	ND
		23 °C	0,000
		30°C	0,048
	29. den	8 °C	0,000
		23 °C	0,167
		30°C	1,667
	57. den	8 °C	0,150
		23 °C	0,628
		30°C	1,219

Počty biogenních aminů v miso pastách v průběhu skladování při různých teplotách (pokr.)

Druh miso pasty	Doba skladování	Teplota skladování	TYM
			MNOŽSTVÍ [mg/l]
MG	1. den		0,099
	8. den	8 °C	0,159
		23 °C	0,194
		30°C	0,076
	15. den	8 °C	0,153
		23 °C	0,287
		30°C	0,089
	29. den	8 °C	0,112
		23 °C	0,107
		30°C	0,133
	57. den	8 °C	0,114
		23 °C	0,118
		30°C	0,148

ND…nedetekováno