

# **Možnosti snížení obsahu biogenních aminů kulturami využívanými při výrobě fermentovaných masných výrobků**

Bc. Marika Lhotská, DiS.

---

Diplomová práce  
2019



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická

---

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav technologie potravin

akademický rok: 2018/2019

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Marika Lhotská, DiS.**

Osobní číslo: **T17238**

Studijní program: **N2901 Chemie a technologie potravin**

Studijní obor: **Technologie potravin**

Forma studia: **prezenční**

Téma práce: **Možnosti snížení obsahu biogenních aminů kulturami využívanými při výrobě fermentovaných masných výrobků**

Zásady pro vypracování:

1. **Biogenní aminy – charakterizace, vlastnosti a význam v potravinách.**
2. **Možnosti snížení obsahu biogenních aminů v potravinách.**
3. **HPLC stanovení obsahu biogenních aminů v bujónu po kultivaci bakterií využívaných při výrobě fermentovaných masných výrobků.**
4. **Vyhodnocení výsledků a formulace závěrů práce.**

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

[1] KAMENÍK, Josef; JANŠTOVÁ, Bohumíra; SALÁKOVÁ, Alena. **Technologie a hygiena potravin živočišného původu**. 1st ed. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, 2014, 199.

[2] TABANELLI, Giulia, et al. **Effects of starter cultures and fermentation climate on the properties of two types of typical Italian dry fermented sausages produced under industrial conditions**. *Food Control*, 2012, 26.2: 416–426.

[3] KALAČ, Pavel. **Health effects and occurrence of dietary polyamines: A review for the period 2005–mid 2013**. *Food Chemistry*. 2014, 161, 27–39.

[4] **Vědecké zdroje zahrnuté v databázích Web of Science, ScienceDirect, SciFinder Scholar, Medline aj.**

Vedoucí diplomové práce:

**doc. RNDr. Leona Buňková, Ph.D.**

Ústav inženýrství ochrany životního prostředí

Datum zadání diplomové práce:

**2. února 2019**

Termín odevzdání diplomové práce:

**3. května 2019**

Ve Zlíně dne 2. února 2019

L.S.

doc. Ing. Roman Čermák, Ph.D.  
*děkan*

doc. Ing. Jiří Mižek, Ph.D.  
*ředitel ústavu*

Příjmení a jméno: .....

Obor: .....

## 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 <sup>1)</sup>;
- 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 <sup>2)</sup>;
- beru na vědomí, že podle § 60 <sup>3)</sup> 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 <sup>3)</sup> 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 .....

.....

<sup>1)</sup> 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 nevdělečně 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.

<sup>2)</sup> 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 vzdělávacímu zařízení (školní dílo).

<sup>3)</sup> 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). Odporčí-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 výdělků jím dosaženého v souvislosti s užitím díla či poskytnutím licence podle odstavce 2 přiměřeně přispěl na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložily, a to podle okolností až do jejich skutečné výše; přitom se přihlídá k výši výdělků dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

## **ABSTRAKT**

Diplomová práce se zabývá biogenními aminy, možnostmi snížení jejich obsahu za pomoci mikrobiálních kultur. Cílem práce bylo otestovat 18 gram-pozitivních mikrobiálních kultur používaných při výrobě fermentovaných masných výrobků a hledání kultur, které jsou schopné degradovat biogenní aminy v závislosti na dostupnosti živin. Jako významnými degradéry se ukázaly 3 mikrobiální kultury s komerčními názvy LHP DRY, SM-194 a BFL-TO3. Dalším cílem bylo sledovat schopnost degradace biogenních aminů v závislosti na složení a množství kultivačního média, vlivem rozdílného pH a kultivační teploty. Úbytek biogenních aminů byl sledován ve vybraných tekutých médiích pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie.

Experimentem bylo zjištěno, že kultura LHP DRY má největší schopnost degradace biogenních aminů v médiu MRS při pH 7,2, po 12 hodinách kultivace, kdy docházelo k poklesu jednotlivých biogenních aminů o 20 - 70 %. U kultury LHP DRY nebyl jednoznačně prokázán vliv kultivační teploty ani polovičního množství živin na degradaci biogenních aminů. Kultura SM-194 má největší schopnost degradace všech biogenních aminů v médiu MRS s polovičním množstvím živin při pH 7,0 a 7,2, a to o 20 až 60 %. U kultury SM-194 byl prokázán vliv kultivační teploty i polovičního množství živin u média MRS na degradaci biogenních aminů.

Klíčová slova: biogenní aminy, HPLC, startérové kultury, fermentované masné výrobky, degradace biogenních aminů

## **ABSTRACT**

Diploma thesis deals biogenic amines, the possibility of reducing the content of biogenic amines using microbial cultures. The aim of the thesis was to test 18 gram-positive microbial cultures used in the production of fermented meat products and to search for cultures that are able of degrading biogenic amines depending on nutrient availability. Important microbial cultures were 3 cultures with commercial names LHP DRY, SM-194 and BFL-TO3. Another aim was to monitor the biogenic amines degradation depending on the composition and amount of culture medium, different pH and culture temperature. The loss of biogenic amines was monitored in selected liquid media by high performance liquid chromatography.

It was found by experiment that the LHP DRY culture has the greatest biogenic amine degradation ability in MRS medium at pH 7.2, after 12 hours of cultivation from 20 % to 70 %. The effect of culture temperature and half of the nutrients on biogenic amine degradation was not clearly demonstrated by the LHP DRY culture. The SM-194 culture has the greatest degradation ability of all biogenic amines by the SM-194 culture in MRS half-nutrient medium at pH 7.0 and 7.2 from 20 % to 60 %. The SM-194 culture, the influence of the culture temperature and half the amount of nutrients in the MRS medium on biogenic amine degradation was demonstrated.

Keywords: biogenic amines, HPLC, starter cultures, fermented meat products, biogenic amine degradation

Upřímně bych chtěla především poděkovat vedoucí mé diplomové práce doc. RNDr. Leoně Buňkové, Ph.D. za cenné rady, odborné vedení, čas, trpělivost, ochotu a hlavně vstřícnost při konzultacích a zpracování této práce. Dále bych chtěla poděkovat laborantkám Ing. Olze Vlčkové, Bc. Veronice Kučabové a Ing. et. Ing. Ludmile Zálešákové za pomoc a rady při zpracování experimentální části práce.

Ráda bych také poděkovala svým rodičům, sestře a příteli za podporu při studiu.

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



# OBSAH

ÚVOD.....	12
<b>I TEORETICKÁ ČÁST.....</b>	<b>14</b>
<b>1 BIOGENNÍ AMINY.....</b>	<b>15</b>
1.1 FUNKCE BIOGENNÍCH AMINŮ.....	15
1.2 PODMÍNKY VZNIKU BIOGENNÍCH AMINŮ.....	16
<b>2 STANOVENÍ OBSAHU BIOGENNÍCH AMINŮ.....</b>	<b>18</b>
<b>3 VYUŽITÍ BAKTERIÍ MLÉČNÉHO KVAŠENÍ PŘI FERMENTACI.....</b>	<b>21</b>
<b>4 VYUŽITÍ GRAM-POZITIVNÍCH KATALÁZA POZITIVNÍCH KOKŮ PŘI FERMENTACI.....</b>	<b>22</b>
<b>5 VYUŽITÍ PLÍSNÍ A KVASINEK PŘI FERMENTACI.....</b>	<b>23</b>
<b>6 STARTÉROVÉ KULTURY V MASNÉM PRŮMYSLU.....</b>	<b>24</b>
6.1 VLIV STARTÉROVÝCH KULTUR NA TVORBU BIOGENNÍCH AMINŮ PŘI FERMENTACI MASNÝCH VÝROBKŮ.....	24
6.1.1 Technologická role startérových kultur.....	24
6.2 FUNKČNÍ STARTÉROVÉ KULTURY PRO BEZPEČNÝ PRODUKT.....	25
6.2.1 Produkce bakteriocinů.....	25
6.2.2 Funkční startérové kultury pro spolehlivější produkční proces.....	27
6.2.3 Startérové kultury s technologickými výhodami.....	27
6.2.4 Funkční startérové kultury s probiotickými vlastnostmi.....	28
<b>7 BIOGENNÍ AMINY VE FERMENTOVANÝCH MASNÝCH VÝROBCÍCH.....</b>	<b>29</b>
<b>8 MOŽNOSTI SNÍŽENÍ OBSAHU BIOGENNÍCH AMINŮ.....</b>	<b>31</b>
8.1 ENZYMATICKÁ DEGRADACE BIOGENNÍCH AMINŮ.....	31
8.2 TECHNOLOGICKÝ VÝZNAM DEGRADACE BIOGENNÍCH AMINŮ PŘI VÝROBĚ FERMENTOVANÝCH POTRAVIN.....	31
8.3 ÚČINNOST DEKARBOXYLÁZA-NEGATIVNÍCH KULTUR PŘI REDUKCI OBSAHU BIOGENNÍCH AMINŮ.....	31
<b>II PRAKTICKÁ ČÁST.....</b>	<b>34</b>
<b>9 CÍL PRÁCE.....</b>	<b>35</b>
<b>10 MATERIÁL A METODIKA PRÁCE.....</b>	<b>36</b>
10.1 VÝBĚR MIKROBIÁLNÍCH KULTUR.....	36
10.2 POUŽITÁ KULTIVAČNÍ MÉDIA A PŘÍSTROJOVÉ VYBAVENÍ.....	37
10.2.1 Kultivační média.....	37
10.2.2 Přístrojové vybavení.....	39
10.3 IDENTIFIKACE MIKROORGANISMŮ METODOU MALDI-TOF MS.....	39
10.4 OVĚŘENÍ SCHOPNOSTI DEGRADACE VYBRANÝCH MIKROORGANISMŮ V KULTIVAČNÍM MÉDIU S BIOGENNÍMI AMINY.....	40
10.4.1 Použité mikrobiální kultury.....	40

10.4.2	Příprava a odběr vzorků na analýzu HPLC .....	40
10.4.3	Derivatizace vzorků .....	41
10.4.4	Chromatografické stanovení biogenních aminů.....	41
<b>11</b>	<b>VÝSLEDKY A DISKUZE .....</b>	<b>42</b>
11.1	IDENTIFIKACE POMOCÍ MALDI-TOF MS .....	42
11.2	OVĚŘENÍ SCHOPNOSTI DEGRADACE VYBRANÝCH MIKROORGANIZMŮ V KULTIVAČNÍM MÉDIU S BIOGENNÍMI AMINY .....	44
11.2.1	Stanovení úbytku BA 18 mikrobiálními kulturami pomocí HPLC .....	44
11.2.2	Degradace BA mikrobiální kulturou označovanou LHP DRY .....	45
11.2.3	Degradace BA mikrobiální kulturou označovanou SM-194.....	46
11.2.4	Degradace BA mikrobiální kulturou označovanou BFL-TO3 .....	47
11.3	SLEDOVÁNÍ VLIVU VYBRANÝCH FAKTORŮ NA DEGRADACI BIOGENNÍCH AMINŮ KULTUROU LHP DRY .....	48
11.3.1	Degradace putrescinu kulturou LHP DRY v závislosti na faktorech prostředí.....	48
11.3.2	Degradace fenyletylaminu kulturou LHP DRY v závislosti na faktorech prostředí .....	50
11.3.3	Degradace kadaverinu kulturou LHP DRY v závislosti na faktorech prostředí.....	52
11.3.4	Degradace histaminu kulturou LHP DRY v závislosti na faktorech prostředí.....	54
11.3.5	Degradace tyraminu kulturou LHP DRY v závislosti na faktorech prostředí.....	56
11.4	SLEDOVÁNÍ VLIVU VYBRANÝCH FAKTORŮ NA DEGRADACI BIOGENNÍCH AMINŮ U KULTURY SM-194 .....	58
11.4.1	Degradace putrescinu kulturou SM-194 v závislosti na faktorech prostředí.....	58
11.4.2	Degradace fenyletylaminu kulturou SM-194 v závislosti na faktorech prostředí.....	60
11.4.3	Degradace kadaverinu kulturou SM-194 v závislosti na faktorech prostředí.....	62
11.4.4	Degradace histaminu kulturou SM-194 v závislosti na faktorech prostředí.....	64
11.4.5	Degradace tyraminu kulturou SM-194 v závislosti na faktorech prostředí.....	66
<b>12</b>	<b>SOUHRNNÁ DISKUZE .....</b>	<b>68</b>
	<b>ZÁVĚR .....</b>	<b>75</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....</b>	<b>77</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK .....</b>	<b>90</b>
	<b>SEZNAM OBRÁZKŮ .....</b>	<b>91</b>
	<b>SEZNAM TABULEK.....</b>	<b>92</b>
	<b>SEZNAM PŘÍLOH.....</b>	<b>93</b>
	<b>PŘÍLOHA P I: DEGRADACE 18 MIKROBIÁLNÍCH KULTUR.....</b>	<b>94</b>
	<b>PŘÍLOHA P II: VLIV VYBRANÝCH FAKTORŮ NA DEGRADACI BA U</b>	

<b>KULTURY LHP DRY .....</b>	<b>95</b>
<b>PŘÍLOHA P III: VLIV VYBRANÝCH FAKTORŮ NA DEGRADACI BA U KULTURY SM-194.....</b>	<b>100</b>

## ÚVOD

Bezpečnost potravin může být ohrožena přítomností nežádoucích mikroorganismů nebo produktů jejich metabolismu, které mohou vykazovat za určitých podmínek toxické účinky. Mezi takové metabolity řadíme biogenní aminy. Vyskytují se v mnohých potravinách, které obsahují určité množství volných aminokyselin nebo proteinů podléhajících mikrobiálnímu rozkladu. V některých potravinách jsou přirozeně přítomny, avšak častěji vznikají činností mikroorganismů, které jsou zodpovědné za dekarboxylaci aminokyselin. Schopnost dekarboxylace aminokyselin byla zjištěna u mikroorganismů disponujících příslušnými enzymy. Mezi potravinářsky nejvýznamnější bakterie s dekarboxylázovou aktivitou lze zařadit bakterie mléčného kvašení a enterobakterie [52].

Možnosti minimalizace hromadění biogenních aminů mohou zahrnovat použití neprodukcujících anebo degradujících mikroorganismů a použití enzymů k oxidaci biogenních aminů. Další metodou, která může vést ke snížení výskytu biogenních aminů v potravinách, může být použití vhodných startérových kultur [14].

Hygienická kvalita masných surovin a složek je rozhodující pro minimalizaci výskytu mikrobiálních kontaminantů, a proto představuje klíčový bod při kontrole tvorby biogenních aminů u fermentovaných masných výrobků [14,46,47]. Hygiena je nezbytná, ale ovšem nedostatečná podmínka a jsou obvykle potřebná další technologická opatření zaměřená na kontrolu aminogenní aktivity endogenních mikrobiálních organismů. Mezi možné technologické strategie lze zařadit použití startérových kultur, které mají vliv na hromadění biogenních aminů během fermentace masných výrobků [46,47,48,49,50].

Startéry používané pro výrobu fermentovaných potravin by měly být buď aminonegativní nebo disponovat aminooxidázovou aktivitou a přeměňovat biogenní aminy na méně toxické produkty. Tyto mikroorganismy vyžadují optimální růstové podmínky, aby mohly převládat nad dekarboxyláza-pozitivní mikroflórou. Mezi bioaktivní látky, které mohou zcela inhibovat nebo zpomalovat růst dekarboxyláza-pozitivních mikroorganismů lze zařadit např. bakteriociny produkované řadou bakterií, včetně těch startérových [58,59].

Startérové kultury, které způsobují rychlé okyselení masného díla, a které vedou k požadované smyslové kvalitě konečného produktu, se používají pro výrobu fermentovaných masných výrobků. Funkční startérové kultury nabízejí doplňkové funkce ve srovnání s klasickými startérovými kulturami a představují způsob, jak zlepšit a

optimalizovat proces fermentace masných výrobků a dosáhnout tak chutnějších, bezpečnějších a zdravějších produktů [45].

Jako startérové kultury lze v masném průmyslu využít bakterie mléčného kvašení a koaguláza-negativní stafylokoky, jež musí splňovat některá technologická kritéria, což je především přizpůsobení se fermentaci masa, schopnost konkurovat přirozené (endogenní) mikroflóře surovin a neschopnost dekarboxylace aminokyselin [45].

## **I. TEORETICKÁ ČÁST**

## 1 BIOGENNÍ AMINY

Biogenní aminy (BA) jsou bazické dusíkaté sloučeniny tvořené převážně dekarboxylací aminokyselin nebo aminací a transaminací aldehydů a ketonů [1]. Mohou být tvořeny i degradovány mikrobiálními, rostlinnými a živočišnými metabolizmy [2]. Chemická struktura BA může být alifatická (putrescin, kadaverin, spermidin, spermin), aromatická (tyramin, fenyletylamin), heterocyklická (histamin, tryptamin) a mezi polyaminy někteří autoři řadí kadaverin, putrescin, spermin a spermidin [3].

### 1.1 Funkce biogenních aminů

Biogenní aminy jsou zdrojem dusíku a prekurzorů pro proteosyntézu hormonů, alkaloidů, správnou funkci nukleových kyselin a proteinů [4]. Mohou také ovlivňovat procesy v těle, jako je regulace tělesné teploty, příjem potravy a zvýšení nebo snížení krevního tlaku [2]. V rostlinách se diamin putrescin a polyaminy spermidin a spermin účastní v řadě fyziologických procesů, jako je diferenciací buněk a reakce na stres [5]. Polyaminy jsou důležité pro růst a metabolismus každého orgánu v těle a jsou nezbytné pro udržení vysoké metabolické aktivity a normálního fungování imunitního systému střev [4,6].

Malá množství biogenních aminů jsou v organizmech metabolizována bez jakéhokoliv vlivu na zdraví jedince. Za normálních podmínek lidské spotřeby potravin či nápojů obsahujících tyto sloučeniny nejsou toxické, protože jsou rychle detoxikovány aktivitou aminových oxidačních enzymů, monoaminoxidáz (MAO) a diaminoxidáz (DAO) [7].

Ovšem vysoká množství, která mohou být přijata potravinami, mohou obvykle způsobit řadu zdravotních problémů, například bolesti hlavy, zvýšení nebo snížení krevního tlaku, nevolnost, zvracení a další. Mohou také způsobovat snižování jakosti a organoleptických vlastností potravin [8,9].

BA jsou potenciální prekurzory pro tvorbu karcinogenních N-nitrososloučenin [3]. Reakce nitrozujících činidel s primárními aminy produkují alkylační látky, které reagují s jinými složkami v potravinové matici a jsou bez toxické aktivity. Nitrozovatelné sekundární aminy (agmatin, spermidin, spermin) mohou vytvářet nitrosaminy reakcí s dusitanem, zatímco terciární aminy produkují řadu labilních N-nitroso produktů [5].

## 1.2 Podmínky vzniku biogenních aminů

Biogenní aminy v potravinách a nápojích vznikají především dekarboxylací přirozených aminokyselin za působení dekarboxyláz, kterými jsou vybaveny četné druhy hnilobných bakterií, ale také řada druhů bakterií mléčného kvašení. Enzym dekarboxyláza odštěpí z karboxylové skupiny aminokyseliny oxid uhličitý za vzniku biogenního aminu [10,11].

Předpoklady pro tvorbu biogenních aminů za pomoci mikroorganismů jsou [8]:

- dostupnost volných aminokyselin,
- přítomnost dekarboxyláza pozitivních mikroorganismů,
- podmínky umožňující růst bakterií a syntézu dekarboxyláz.

Monoaminy histamin (HIM), tyramin (TYM) a tryptamin (TRM) a diaminy (nebo polyaminy) putrescin (PUT) a kadaverin (KAD) se tvoří z histidinu, tyrozinu, tryptofanu, ornitinu a lyzinu. Polyaminy spermidin (SPD) a spermin (SPM) vznikají z putrescinu [12,13].

Aktivitu mikrobiálních dekarboxylačních enzymů ovlivňuje mnoho faktorů, např. teplota, doba skladování potravin, vodní aktivita, pH, redoxní potenciál či obsah solí [5].

Aktivita dekarboxyláz je silnější v kyselém prostředí, přičemž optimální pH je mezi 4,0 a 5,5 [5]. Bakterie jsou v tomto prostředí stimulovány, aby tyto enzymy produkovaly jako součást svých obranných mechanismů proti okyselení [14].

Pozornost je věnována také vlivu glukonolaktonu na produkci BA v suchých salámech. Glukonolakton způsobuje snižování pH v salámech, což vede ke zvýšení dekarboxylázové aktivity bakterií [13]. Také zvyšuje produkci histaminu, tyraminu a putrescinu [14].

Přítomnost fermentovatelných sacharidů, jako je D-glukóza, zvyšuje růst bakterií i aktivitu jejich aminokyselinových dekarboxyláz. Bylo zjištěno, že obsah D-glukózy v rozmezí 0,5-2,0 % je optimální, zatímco hladiny převyšující 3 % tyto enzymy inhibují [6].

Také přítomnost kyslíku má zásadní vliv na biosyntézu BA. *Enterobacter cloacae* produkuje asi polovinu množství putrescinu v anaerobních podmínkách v porovnání s aerobními podmínkami. *Klebsiella pneumoniae* syntetizuje výrazně méně kadaverinu za aerobních podmínek, ale má schopnost produkovat putrescin za anaerobních podmínek [5].



Redoxní potenciál média také ovlivňuje produkci BA. Stavby vedoucí ke snížení redoxního potenciálu stimulují produkci histaminu a aktivita histidindekarboxylázy je inaktivována nebo redukována v přítomnosti kyslíku [6].

Tvorba aminů bakteriemi je rozhodujícím způsobem ovlivněna i teplotou. Teplota mezi 20 °C a 37 °C je optimální pro růst většiny bakterií obsahujících enzym dekarboxylázu a snížením teploty se zpomalí jejich růst [14].

Přítomnost chloridu sodného aktivuje tyrozindekarboxylázu a inhibuje histidindekarboxylázu [4]. Při obsahu 3,5 % chloridu sodného je schopnost *Lactobacillus buchneri* vytvářet histamin částečně inhibována a při obsahu 5,0 % jeho tvorba je zastavena [15]. Dusitan sodný zase aktivuje tyrozinkarboxylázu [14].

## 2 STANOVENÍ OBSAHU BIOGENNÍCH AMINŮ

Analytické metody používané pro separaci a kvantifikaci BA jsou založeny především na chromatografických metodách. Patří sem plynová chromatografie (GC), tenkovrstvá chromatografie (TLC) a vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) s technikami předkolumnové nebo postkolumnové derivatizace [19].

Alifatické BA nevykazují výraznou absorpci pásem v oblasti UV-VIS, takže nelze použít obvyklé spektrometrické detektory [19]. Přímá analýza BA bez derivatizace pomocí iontové výměnné chromatografie byla navržena s použitím oktylaminu nebo heptansulfonátu jako činidel iontových párů [18]. Pro oddělení iontových párů BA jsou obvykle vhodné kolony s reverzními fázemi [20].

Postupy HPLC zahrnují předkolumnovou nebo postkolumnovou derivatizaci [16]. Pro analýzu BA v postkolumnové derivatizaci se používají činidla jako je ninhydrin a o-ftalaldehyd a pro předkolumnovou derivatizaci dansylchlorid, benzoylchlorid, fluorescein a 9-fluorenylmethylchlorformiát [17,19,21].

Dansylchlorid byl nejpoužívanější činidlo pro derivatizaci BA analyzovaných pomocí HPLC. Je citlivý na světlo a má omezenou stabilitu. Avšak benzoylchlorid je snadno přístupný, levný, stabilní a jeho čistota je méně kritická než u dansylchloridu [16].

Pro detekční fluorescenci se používají UV a elektrochemické detektory. Elektrochemické detektory jsou založeny na oxidaci aminoskupin [21].

Přehled procedur předběžného odběru, stejně jako podmínky HPLC, které se používají pro stanovení BA v potravinách, jsou uvedeny v následující tabulce (tab. 1)

Tabulka 1 - Odběr a příprava vzorků fermentovaných masných výrobků pro HPLC [25]

<b>Biogenní aminy</b>	Různé
<b>Vzorek</b>	Fermentované salámy
<b>Ošetření vzorku</b>	Extrakce 0,5 M kyselinou chloristou
<b>Derivatizace</b>	Postkolonová derivatizace o-ftaldialdehydem a kyselinou 3-merkaptopropionovou
<b>Kolona / stacionární fáze</b>	(250 mm × 4.6 mm) NUCLEOSIL 10 7 C18
<b>Mobilní fáze</b>	A: 0,05 M kyselina hexansulfonová, 0,1 M dihydrogenfosforečnan sodný (pH 3,5) B: eluent A a acetonitril ( $\varphi$ = 3: 1)
<b>Detekce <math>\lambda</math></b>	Fluorimetry (excitace 340 nm, emise 455 nm)

Metoda TLC je obzvláště využívána v biochemii rostlin [16]. TLC má význam pro semikvantitativní screening BA v potravinách [22]. TLC s předběžným vyčištěním vzorku a derivatizací BA může být použita k detekci chloridů, dansyl-3,5-dinitrobenzamidů a fluoresceinových derivátů BA [1]. Dansylchlorid reaguje s primárními a sekundárními aminoskupinami a fluorescein reaguje pouze s primárními aminoskupinami [20].

Dansylovaná forma BA vyzařuje energii absorbovaného dlouhodobého ultrafialového záření jako fluorescenční světlo, což umožňuje detekovat na chromatogramu tyto sloučeniny i při nízkých úrovních. Fluorescenční zóny dansylových derivátů jsou vizualizovány a označeny pomocí vhodného zdroje UV záření (360 nm) [23]. Pro vizuální detekci eluovaných BA mohou být použita různá detekční činidla, jako je ninhydrin, etanolický roztok o-ftalaldehydu (pro chlorid BA) a naftylamin [22].

Stanovení BA pomocí GC není příliš časté. Kolony používané v GC jsou kapilární nebo plnicí. Kapilární sloupce umožnily lepší oddělení BA. Detektory pro stanovení BA pomocí GC jsou plamenová ionizace a záchyt elektronů [1,4].

Také použití kapilární elektroforézy (CE) pro separaci biogenních aminů není příliš časté, ale má několik výhod. Stanovení je jednoduché, rychlé, nákladově efektivní a spolehlivé [17].

Může být využita i kapilární izotachoforéza pro kvantifikaci BA histaminu v rybách a různých BA v syrovátce [24].

Fluorometrické metody se používají díky fluorescenci BA při určitém pH a reakci BA s vhodnými činidly na fluorescenční deriváty. Histamin může být stanoven o-ftalaldehydem a tyramin pomocí  $\beta$ -naftolu [1].

### 3 VYUŽITÍ BAKTERIÍ MLÉČNÉHO KVAŠENÍ PŘI FERMENTACI

Primární funkcí bakterií mléčného kvašení (LAB) k tvorbě chutě je produkce kyseliny mléčné a kyseliny octové, ačkoli také produkují další sensoricky aktivní látky při fermentaci sacharidů [26].

Exopeptidázy laktobacilů izolovaných z masa ve spojitosti s aminopeptidázami ze svalů tvoří volné aminokyseliny, přispívající k aromatizaci výrobku [27].

LAB izolované z řeckých klobás vykazují *in vitro* vysokou leucinovou a valinovou aminopeptidázovou aktivitu [28].

Laktobacily a pediokoky vykazují nízké aktivity katabolizmu aminokyselin s rozvětveným řetězcem, a proto nehrají hlavní roli při formování typického klobásového aroma, jako je 3-methylbutanal, jak je tomu v případě stafylokoků [29].

O lipolytické aktivitě laktobacilů během fermentace klobás je k dispozici jen málo informací, ale některé aktivity *in vitro* byly dokumentovány pro *Lactobacillus sakei*, *Lactobacillus curvatus* a *Lactobacillus plantarum* [28]. Avšak lipázy laktobacilů často vykazují malou nebo žádnou aktivitu [27], i když se zdá, že lipolytická aktivita je významná pro zrání salámů [30].

Kromě laktobacilů může být chuť ovlivněna i jinými LAB, jako jsou například enterokoky, které vykazují několik metabolických aktivit, jako je hydrolýza proteinů, lipidů a esterů [31]. Hrají důležitou úlohu při dozrávání a rozvoji chuti v několika tradičních středomořských sýrech [32,33] a mohou mít také význam v tradičních fermentovaných klobásách [34].

Také přidání *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* může vést k vyššímu množství volných aminokyselin [35].

Kmen *Carnobacterium piscicola* byl navržen jako nová startovací kultura kvůli jeho vysoké tvorbě aromatických sloučenin odvozených od metabolismu leucinu, podobně jako ty, které jsou tvořeny stafylokoky [29].

## 4 VYUŽITÍ GRAM-POZITIVNÍCH KATALÁZA POZITIVNÍCH KOKŮ PŘI FERMENTACI

Stafylokoky, zejména *Staphylococcus xylosus* a *Staphylococcus carnosus*, tvoří aroma konverzí aminokyselin (zejména aminokyselin s rozvětveným řetězcem - leucinu, izoleucinu a valinu) a volných mastných kyselin [36,37]. Tvorba aroma však závisí na použité technologii pro daný fermentovaný masný výrobek. Například u rychle zrajících klobás se zvýšenou inokulací stafylokoků se může zvýšit produkce aldehydů s rozvětveným řetězcem, zatímco u pomalu zrajících klobás je situace složitější. V druhém případě je produkce aroma obzvláště výrazná a zvýšená inokulace podporuje tvorbu methyl-rozvětvených kyselin a siřičitanů, zatímco nízká inokulace tvorbu diacetylu a ethylesterů [38]. Kromě přísad jako jsou dusičnany, dusitany a askorbany, je tedy možné upravit profil aroma salámu změnou úrovně očkování stafylokokovou startérovou kulturou [37].

Použití správně vybraných kmenů, které vytvářejí velké množství aromatických složek, by mohlo umožnit zlepšení organoleptických vlastností anebo urychlení fermentačního procesu. Výběr vhodných stafylokoků s ohledem na aplikace bude rozhodující. Kmeny *Staphylococcus xylosus* převládají v jižních evropských salámech, které jsou charakterizované zaoblenou vůní a méně kyselou chutí a byly doporučeny při výrobě velmi aromatických klobás [39]. Ukázalo se, že tento druh produkuje mimo jiné 3-methyl-1-butanol, diacetyl, 2-butanon, acetoin, benzaldehyd, acetofenon a methyl-rozvětvené ketony [36].

U *Staphylococcus carnosus* se předpokládá, že převádí více aminokyselin s rozvětveným řetězcem na methyl-rozvětvené aldehydy (3-methylbutanal, 2-methylbutanal a 2-methylpropanal) a jejich kyseliny [36].

Sloučeniny 3-methyl-butanal a kyselina 3-methylbutanová odvozené od leucinu byly rovněž spojeny s aromatem klobás [36]. Navíc mohou být dále převedeny na „ovocné“ estery (například ethyl 2- nebo 3-methyl-butanoát), o kterých se předpokládá, že se vyskytují hlavně ve výrobcích s vysokým obsahem kyselin a alkoholů, a kde jsou mikrobiální esterové aktivity nízké [40].

Vedle přispívání k chuti, gram-pozitivní kataláza pozitivní koky také zabraňují tvorbě nežádoucích aromatických látek a můžou být použity k regulaci oxidace nenasycených mastných kyselin [40].

## 5 VYUŽITÍ PLÍSNÍ A KVASINEK PŘI FERMENTACI

Masné výrobky s plísněmi jsou běžné především ve Středomoří. Bylo prokázáno, že povrchová inokulace masných výrobků plísněmi, např. *Penicillium* nebo *Mucor*, přispívá k jejich smyslové kvalitě [41]. Tento příspěvek je zprostředkován oxidací laktátu, proteolýzou, degradací aminokyselin, lipolýzou, lipooxidací, a snížením ztráty vody způsobené pomalejším odpařováním [42,43]. Navíc plísně přispívají k celkové přitažlivosti konečného produktu, které mají charakteristický bílý nebo šedý vzhled, přispívají ke stabilizaci barvy katalázovou aktivitou, chrání výrobek před působením kyslíku a světla. Charakteristická vůně popcornu ve fermentovaných klobásách je připisována 2-acetyl-1-pyrrolinu, který může být způsoben konverzí prolinu plísněmi, a který se často vyskytuje v kolagenových obalech fermentovaných masných výrobků [42].

Stejně jako u bakteriálních startérových kultur, výběr plísňových startérových kmenů by měl být proveden pečlivě kvůli proteolytické a lipolytické aktivitě. Účinek na konečný produkt se může výrazně lišit mezi kmeny a závisí i na použité technologii [42].

Olesen a Stahnke [37] zjistili, že *Candida utilis* je schopna produkovat několik těkavých sloučenin, zejména esterů a alkoholů, které jsou pravděpodobně odvozeny od aminů s rozvětveným řetězcem kyseliny, zatímco *Debaryomyces hansenii* má velmi malý vliv na tvorbu těkavých sloučenin. V jiných studiích *Debaryomyces* spp. ovlivňuje proteolýzu a tvorbu těkavých sloučenin [44]. Vhodná očkovací dávka kultury *Debaryomyces* spp. ovlivňuje antioxidační účinek a podporu tvorby ethylesterů. Nicméně příliš velké množství *Debaryomyces* spp. může vytvářet velké množství kyselin, například kyseliny 2-methyl-propanové a 2- a 3-methylbutanové. Také kvůli fungistatickému účinku česneku nebo přítomnosti dalších výchozích surovin, může kvasinková kultura ztratit životaschopnost ještě předtím, než skončí proces dozrávání a tím selže i zlepšování organoleptických vlastností výrobků [37].

## 6 STARTÉROVÉ KULTURY V MASNÉM PRŮMYSLU

Startérové kultury, které způsobují rychlé okyselení masného díla, a které vedou k požadované smyslové kvalitě konečného produktu, se používají pro výrobu fermentovaných masných výrobků. Funkční startérové kultury nabízejí doplňkové funkce ve srovnání s klasickými startérovými kulturami a představují způsob, jak zlepšit a optimalizovat proces fermentace masných výrobků a dosáhnout chutnějších, bezpečnějších a zdravějších produktů. Příklady zahrnují mikroorganismy, které vytvářejí sensoricky aktivní sloučeniny, bakteriociny nebo jiné antimikrobiální látky a přispívají tak ke stále barvě masa, mají probiotické vlastnosti nebo postrádají negativní vlastnosti, jako je produkce biogenních aminů a toxických sloučenin [45].

### 6.1 Vliv startérových kultur na tvorbu biogenních aminů při fermentaci masných výrobků

#### 6.1.1 Technologická role startérových kultur

Hygienická kvalita masných surovin a složek je rozhodující pro minimalizaci výskytu mikrobiálních kontaminantů, a proto představuje klíčový bod při kontrole tvorby biogenních aminů u fermentovaných masných výrobků [14,46,47]. Hygiena je nezbytná, ale ovšem nedostatečná podmínka a jsou obvykle potřebná další technologická opatření zaměřená na kontrolu aminogenní aktivity endogenních mikrobiálních organismů. Mezi možné technologické strategie je použití startérových kultur, které mají vliv na hromadění biogenních aminů během fermentace masných výrobků [46,47,48,49,50]. Mechanismus působení startérových kultur je založen na zabránění růstu potenciálních aminogenních endogenních bakterií spolu se svou vlastní neschopností produkovat biogenní aminy [48].

Kmeny LAB (bakterie mléčného kvašení) a CNS (koaguláza-negativní stafylokoky) speciálně vybrané jako startérové kultury pro fermentované masné výrobky musí splňovat některá technologická kritéria, což je především přizpůsobení se fermentaci masa, schopnost konkurovat přirozené (endogenní) mikroflóře surovin a neschopnost dekarboxylace aminokyselin [49,50]. Některé kmeny LAB a CNS, které se obvykle používají jako startérové masné kultury, např. *Lactobacillus curvatus* a *Staphylococcus carnosus* byly popsány jako silní producenti biogenních aminů, zejména tyraminu [50].



Naproti tomu kmeny druhů jako *Lactobacillus sakei*, *Lactobacillus plantarum* a *Staphylococcus xylosus* jsou obvykle popsány jako slabší nebo neaminogenní mikroorganismy [46,52,53]. Schopnost dekarboxylace aminokyselin je vlastnost závislá na kmeni [54]. Proto je nutné provést individuální hodnocení aminogenní aktivity kmenů, které mají být vybrány jako amino-negativní výchozí kultury [49,55].

Potenciál aminokyselinové dekarboxylace může být testován pomocí molekulárních technik detekujících specifické geny kódující aminokyselinovou dekarboxylázu. Nicméně aminogenní potenciál daného kmene by měl být potvrzen studiem fenotypové exprese této aktivity, a to jak *in vitro* (jako screeningový postup), tak i v reálných podmínkách fermentace a dozrávání masných výrobků [49].

## 6.2 Funkční startérové kultury pro bezpečný produkt

### 6.2.1 Produkce bakteriocinů

Hlavním antimikrobiálním faktorem, který je zodpovědný za bezpečnost produktu, je rychlost okyselování syrového masa. Některé antimikrobiální látky, jako jsou například bakteriociny, mohou také hrát určitou roli, zejména v mírně okyselených produktech nebo k odstranění nežádoucích mikroorganismů, které vykazují kyselou toleranci například *Listeria monocytogenes* [56].

Bakteriociny produkované LAB jsou antibakteriální peptidy nebo proteiny, které zabíjejí nebo inhibují růst jiných gram-pozitivních bakterií [45,58,59]. Často mají úzké inhibiční spektrum [60]. LAB produkují rozmanité bakteriociny, obecně aktivní vůči jiným LAB, které přispívají ke konkurenceschopnosti producenta, ale také na patogeny jako je *Listeria monocytogenes* [56].

Takzvané bakteriociny třídy IIa jsou obzvláště aktivní vůči listeriím [61]. Aplikace LAB produkujících bakteriocin v masném průmyslu proto nabízí způsob přírodního konzervování potravin [62,63,64]. Laktobacily izolované z klobás často produkují bakteriociny nebo bakteriocinové sloučeniny, jak bylo dokázáno pro *Lactobacillus sakei* [65,66,67], *Lactobacillus curvatus* [66], *Lactobacillus plantarum* [67,68] *Lactobacillus brevis* [69] a *Lactobacillus casei* [70]. Použití bakteriocinu produkovaného *Lactobacillus sakei* jako výchozí kultury umožňuje snížit hladiny listerií ve fermentovaných klobásách [63,64,71].

V určitých produktech, např. v klobásách amerického stylu, fermentovaných při vyšších teplotách (27 °C – 38 °C versus 20 °C – 25 °C), produkují bakteriociny spíše pediokoky než laktobacily [72].

U enterokoků je známo, že produkují bakteriociny s vysokou termostabilitou [73,74]. Použití enterokoků produkujících bakteriocin je dobře zdokumentováno při výrobě sýrů [75], ale informace o jejich potenciálu bioprotektivních kultur v masném průmyslu jsou vzácné [63].

Bakteriocin-produkující laktokoky [76] a bakteriocin-produkující *Leuconostoc mesenteroides* [77] byly izolovány také z fermentovaných klobás. Kmeny *Lactococcus lactis* byly použity jako nové funkční startérové kultury pro výrobu klobás, přestože nejsou zvláště přizpůsobeny masné technologii [78].

Používání bakteriocinů produkovaných novými startérovými kulturami může nabízet značné výhody v oblasti bezpečnosti potravin bez rizika pro lidské zdraví v důsledku toxikologických vedlejších účinků [59]. Představuje přirozený bezpečný způsob konzumace potravin. Kromě toho produkce bakteriocinů *in situ* obecně nevede k organoleptickým nebo chuťovým nedostatkům a je nižší než lze očekávat z *in vitro* experimentů [79].

Aktivita bakteriocinů nemusí být ve fermentovaných masných výrobcích dostatečná. Může dojít k jejich nízké produkci, genetické nestabilitě, neschopnosti distribuce bakteriocinu v celém produktu, nízké rozpustnosti, inaktivaci proteázami z masa, odolnosti cílového kmene, interakci se složkami masa, anebo adsorpci na tukové částice [59,80]. Doporučuje se používat kmeny, které jsou dobře přizpůsobené prostředí fermentovaných masných výrobků, např. *Lactobacillus sakei* nebo *Lactobacillus curvatus* [81], *Lactobacillus curvatus* LTH 1174 [82] a *Lactobacillus curvatus* L442 [77] optimálně produkují bakteriociny za podmínek pH a teploty, které převládají během fermentace evropských fermentovaných masných výrobků. Také je potřeba vybrat vhodné kultury dle použité technologie [63].

Pediokoky jsou vhodnější než laktobacily, je-li požadována rychlá fermentace při vyšší teplotě. Rovněž výkon bakteriocinogenních LAB jako výchozí nebo společné kultury závisí na složkách produktů a použité receptuře. Je závislý na použití dusitanů nebo dusičnanů, chloridu sodného nebo draselného [81].

Je zřejmé, že bakteriociny nejsou určeny k použití jako jediný prostředek konzervování potravin, ale měly by být přiměřeně integrovány do víceúrovňového konzervačního systému po celou dobu s ohledem na správnou výrobní praxi [81].

### 6.2.2 Funkční startérové kultury pro spolehlivější produkční proces

Použití startérových kultur produkujících bakteriocin nemusí pouze přispívat k bezpečnosti potravin, ale také k prevenci kažení potravin. Zejména růst LAB, které produkují peroxid vodíku, způsobují sliznatost, odzdušnění nebo nepříjemné příchutě, může být inhibován [61].

Použití kmenů s antioxidačními vlastnostmi produkujících katalázy nebo superoxid dismutázy, například *Staphylococcus carnosus*, může pomáhat inhibovat oxidaci lipidů a zabraňuje zhoršování barvy a struktury, stejně jako tvorbu toxických sloučenin [83].

### 6.2.3 Startérové kultury s technologickými výhodami

Použití funkčních startérových kultur může být užitečné ke snížení úrovně dusitanů a dusičnanů, o nichž se diskutuje kvůli jejich podílu na tvorbě zdravotně nežádoucích nitrosaminů. Dusitany a dusičnany se využívají ve fermentační technologii fermentovaných masných výrobků jako činidla pro mikrobiální stabilitu a tvorbu barvy [84]. K odstranění části konzervačního účinku mohou být použity kmeny produkující bakteriociny. Zatímco použití kmenů schopných produkovat nitrozylované deriváty myoglobinu, což jsou deriváty, které jsou schopny převádět hnědý metmyoglobin na červené deriváty myoglobinu a mohou tak částečně převzít funkci činidel pro lepší stabilitu výrobků. Druhá možnost byla prokázána u kmenů *Lactobacillus fermentum* v uzených salámech [85].

Také použití kmenů, které vedou ke zrychlenému zrání klobás, může přinést technologické výhody, což vede ke zkrácení doby skladování a konkurenceschopnosti konečného produktu. Lze použít bakteriální kmeny, jako jsou například laktokoky, které mají silnou proteolytickou aktivitou během dozrávání [86,87].

#### 6.2.4 Funkční startérové kultury s probiotickými vlastnostmi

S ohledem na nedávný zájem o funkční masné výrobky [88], vypadají probiotické startérové kultury slibně. Probiotika se skládají ze živých mikroorganismů, které mají po požití dostatečného množství příznivý vliv na organismus hostitele [89]. Některé kmeny *Lactobacillus* jsou dobrými kandidáty jako probiotické kultury, protože jsou běžnými komponenty střevní mikroflóry a podporují zdraví člověka *in vivo*. Enterokoky jsou také uváděny na trh jako probiotické přípravky [90]. Použití probiotických kmenů je již v mlékárenském průmyslu velmi běžné. V budoucnu by se mohly používat probiotické kmeny LAB pro funkční probiotické masné výrobky [91].

Kmeny s probiotickými vlastnostmi by měly být silnými konkurenty proti přirozené mikroflóře masa, která může mít negativní zdravotní účinky. Bylo prokázáno, že několik laktobacilů střevního původu přežívá v procesu výroby uzenin a může být detekováno ve vysokém počtu v konečném produktu [92,93]. Intestinální laktobacily *Lactobacillus rhamnosus* FERM P-15120 a *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* FERM P-15121 mohou inhibovat růst a produkci enterotoxinu *Staphylococcus aureus* ve stejném rozsahu jako komerční startérová kultura *Lactobacillus sakei* v uzeninách fermentovaných při 20 °C nebo 35 °C. Na druhou stranu intestinální kmen *Lactobacillus acidophilus* FERM P-15119 nemohl uspokojivě snížit počty *Staphylococcus aureus* [93].

## 7 BIOGENNÍ AMINY VE FERMENTOVANÝCH MASNÝCH VÝROBCÍCH

Fermentované masné výrobky spolu s jinými fermentovanými potravinami nebo nápoji představují jedny z potravinových produktů, které mohou obsahovat vyšší množství biogenních aminů [48,49,94].

Tyramin je obvykle nejčastěji se vyskytující biogenní amin nacházející se ve fermentovaných masných výrobcích. Pokud jde o průměrné hodnoty, bylo zjištěno, že fermentované klobásy vykazují nejvyšší obsah tyraminu mezi fermentovanými produkty [49]. Ve fermentovaných masných výrobcích je tyramin produkován zejména bakteriemi mléčného kvašení (včetně laktobacilů a enterokoků) a méně pak koaguláza-negativními stafylokoky [95,96,97,98,99,100]. Latorre-Moratalla a kol. uvádějí, že 48 % LAB a 13 % stafylokoků izolovaných ze spontánně fermentovaných klobás jsou schopny dekarboxylace jedné nebo více aminokyselin [99].

Fermentační procesy mohou také vést k významné akumulaci diaminů putrescinu a kadaverinu. Přestože obsahy těchto diaminů ve fermentovaných masných výrobcích jsou relativně nízké, v některých případech jsou jejich úrovně extrémně vysoké a překračují až hodnoty tyraminu. Produkce diaminů se obvykle připisuje gram-negativním bakteriím, jako jsou enterobakterie a pseudomonády [48,97,101]. Nicméně, řada publikací ukazuje několik kmenů LAB a CNS se silnou schopností produkovat putrescin nebo kadaverin [95,97,99,102].

Naproti tomu je histamin ve fermentovaných masných výrobcích obvykle nalezen méně často. Nicméně v některých vzorcích může dosáhnout poměrně vysokých úrovní, obvykle doprovázených vysokým množstvím jiných biogenních aminů. Tvorba histaminu je omezena na některé kmeny enterobakterií nebo LAB, které se běžně nenacházejí ve vzorku, pokud ovšem nedojde ke kontaminaci [14,97,103,104].

Fenyletylamin a tryptamin mohou být považovány za méně významné aminy vyskytující se ve fermentovaných masných výrobcích. Jejich hromadění je závislé na výskytu vysokého obsahu tyraminu spojeného s některými LAB nebo CNS [105]. Úrovně biogenních aminů u fermentovaných masných výrobků vykazují velké rozdíly mezi různými typy produktů a produktů od stejného výrobce. Vliv mikrobiologické kvality surovin, která se mění v každé výrobní šarži, je klíčovým parametrem pro vysvětlení této variability. Navíc je mohou ovlivňovat i další faktory, jako jsou přísady (cukr, koření atd.),

tloušťka fermentovaného masného výrobku a technologické podmínky (teplota a relativní vlhkost), které jsou spojeny s aminogenezí, včetně mikrobiálního růstu, kyselosti, proteolýzy a aktivity dekarboxyláz [15,105,106,107,108].

## **8 MOŽNOSTI SNÍŽENÍ OBSAHU BIOGENNÍCH AMINŮ**

### **8.1 Enzymatická degradace biogenních aminů**

Monoaminoxidázy (MAO, E.C. 1.4.3.4.) jsou flavoproteiny, které katalyzují oxidační deaminaci řady biogenních monoaminů tvořících odpovídající aldehydy, peroxid vodíku a amoniak. U lidí existují dvě samostatné MAO izoformy (MAO-A, MAO-B), například intestinální sliznice má mono- a diaminoxidázy, které katabolizují BA a jsou dobře charakterizovány. Nicméně informace týkající se identifikace a biochemické charakterizace enzymatické aktivity spojené s redukcí BA v potravinách jsou poměrně vzácné [109].

### **8.2 Technologický význam degradace biogenních aminů při výrobě fermentovaných potravin**

Novým způsobem snížení obsahu BA v potravinách by bylo jejich odstranění z potravinové matrice. Mohlo by jít o strategii, ve které by se zabránilo přítomnosti LAB produkujícího BA, protože ty jsou součástí běžné mikroflóry a BA jsou tedy přítomny ve finálních fázích výrobního procesu [110].

Bylo navrženo použití BA-degradujících bakterií v produkci fermentovaných masných výrobků [110,111,112]. Bylo zjištěno, že přítomnost určitých výchozích kultur snižuje jejich obsah [111]. Produkce aminoxidázy byla navržena jako kritérium při výběru startérových kultur [113] a stejní autoři také zdůrazňují důležitost použití správných hygienických a výrobních postupů.

### **8.3 Účinnost dekarboxyláza-negativních kultur při redukcí obsahu biogenních aminů**

Několik studií vyhodnotilo použití komerčních a experimentálních startérových kultur ke snížení aminogeneze během fermentace masných výrobků. Přestože řada studií prokázala příznivý účinek startérových kultur při snižování akumulace biogenních aminů [15,114,115,116,117,118] jiné studie zase neprokázaly účinnost výchozích kultur ke snížení přítomnosti biogenních aminů v některých fermentovaných masných výrobcích [103,120,121,122].

Obecně platí, že startérové kultury obsahující druhy LAB vykazovaly vyšší hodnoty produkce biogenních aminů než startérové kultury obsahující pouze CNS [115]. LAB startérové kultury by mohly vyvíjet efektivnější náhradu endogenní mikroflóry s potenciální aminogenní schopností, obvykle sestávající z laktobacilů a enterokoků. Zejména u startérových kultur, včetně druhů LAB, se uvádí, že ty, které obsahují *Lactobacillus sakei* nebo *Lactobacillus plantarum*, významně inhibují akumulaci aminů, ačkoli s různou intenzitou v závislosti na kmeni a produktu [114,115,123,124,125]. Proteolytická aktivita CNS může stimulovat aminogenezi pomocí poskytnutí aminokyselinových prekurzorů. Bover-Cid a kol. prokázali potenciál proteolytických stafylokoků k inhibici produkce biogenních aminů [126].

Kmeny *Lactobacillus sakei* jsou obvykle dobře přizpůsobeny fermentaci masa a jsou konkurenceschopné mezi teplotami 15 a 25 °C, což je teplotní rozsah pro výrobu uzenin v evropských zemích [63,97]. Ve studii, kterou provedli González-Fernández a kol., mezi všemi testovanými dekarboxyláza-negativními kmeny se *Lactobacillus sakei* K29 ukázal nejúčinnější při redukci produkce aminu, pravděpodobně proto, že tento kmen způsobil rychlý pokles pH během fermentace masných výrobků [127]. Bover-Cid a kol. také popsali, že negativní kmen *Lactobacillus sakei* CTC494 vykazuje silnou schopnost snížit tvorbu biogenních aminů ve španělských klobásách. Avšak když byl tento stejný kmen (*Lactobacillus sakei* CTC494) kombinován se *Staphylococcus carnosus* LHT 2102, *Staphylococcus xylosus* CTC3037 nebo *Staphylococcus xylosus* CTC3050, bylo dosaženo ještě účinnější redukce aminů ve srovnání s účinkem každého použitého kmene [97,126,128].

Komerční startérové kultury používané v průmyslové výrobě nemusí být plně přizpůsobeny prostředí pro fermentaci masa nebo k tradičním specifickým fermentačním podmínkám. V dnešní době se pro fermentaci řemeslných salámů doporučuje přidání takzvaných autochtonních startovacích kultur, které se skládají z vybraných kmenů pocházejících z každého speciálně fermentovaného masného produktu [100,129,130]. Autochtonní startérové kultury pomáhají udržovat typické jedinečné vlastnosti drobných masných výrobků. Tato lepší adaptace a konkurenceschopnost autochtonních startérů ve srovnání s komerčními startéry by mohla vysvětlit větší snížení obsahu biogenních aminů u produktů pocházejících z tradičního fermentovaného masa [100].

Komerčně dodávané smíšené startérové kultury kombinující různé druhy LAB a stafylokoky [114,117,131] vykazovaly slabší redukci aminů než u původních smíšených



autochtonních startérových kultur [99,130,132]. Talon a kol. [132] a Latorre-Moratalla a kol. [99] vyhodnotili účinek autochtonních startérů bez dekarboxylázové aktivity na redukci biogenních aminů v různých evropských fermentovaných salámech. Práce prokázala důležitost výběru kmene případ od případu, aby se dosáhlo dobrého přizpůsobení prostředí fermentace masa a následně dobré prevence výskytu biogenních aminů [110,111,112,133].

## **II. PRAKTICKÁ ČÁST**

## 9 CÍL PRÁCE

Cílem teoretické části diplomové práce bylo popsat vliv startérových kultur při výrobě fermentovaných masných výrobků, možnosti snížení obsahu biogenních aminů v potravinách za pomoci mikrobiálních kultur a také možnosti detekce biogenních aminů v potravinách.

Cílem praktické části bylo otestovat celkem 18 gram-pozitivních mikrobiálních kultur používaných při výrobě fermentovaných masných výrobků a hledání takových kultur, které jsou schopné degradovat biogenní aminy v závislosti na dostupnosti živin. Dalším cílem bylo sledovat schopnost degradace biogenních aminů v závislosti na složení a množství kultivačního média, vlivem rozdílného pH a kultivační teploty. Úbytek biogenních aminů byl sledován ve vybraných tekutých médiích pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie.

Dílčím cílem bylo popsat další vlastnosti testovaných kultur, např. morfologii buněk.

## 10 MATERIÁL A METODIKA PRÁCE

### 10.1 Výběr mikrobiálních kultur

V diplomové práci byly použity běžné mikrobiální kultury využívané jako startérové kultury při výrobě fermentovaných masných výrobků. Mikrobiální kultury byly dodány od společnosti Chr. Hansen (tab. 2) pod komerčními názvy a uchovávány v mikrobiologické laboratoři Ústavu inženýrství ochrany životního prostředí Fakulty technologické.

Tabulka 2 - Testované mikrobiální kultury

<b>Chr. Hansen - Bactoferm®</b>		
	<b>Komerční název</b>	<b>Mikrobiální složení (dle informací dodavatele)</b>
1	Rubis	Bioprotective culture
2	S-SX	<i>Staphylococcus xylosus</i>
3	LHP DRY	<i>Pediococcus pentosaceus</i>
5	CS-300	<i>Staphylococcus carnosus</i>
6	HPS DRY	<i>Pediococcus acidilactici</i>
7	SM-75	<i>Staphylococcus carnosus</i> , <i>Staphylococcus xylosus</i>
8	C-P-77	<i>Staphylococcus carnosus</i> , <i>Lactobacillus pentosus</i>
9	F-SC-111	<i>Staphylococcus carnosus</i> , <i>Lactobacillus sakei</i>
10	SM-194	5 kmenů
11	T-SPX	<i>Pediococcus pentosaceus</i> , <i>Staphylococcus xylosus</i>
<b>Chr. Hansen - SafePro®</b>		
12	B-LC-48	<i>Lactobacillus curvatus</i>
13	B-LC-20	<i>Pediococcus acicilactici</i>
14	B-2	<i>Lactobacillus sakei</i>
15	B-LC-007	neuveдено
16	B-LC-78	neuveдено
17	B-LC-77	neuveдено
18	ImPorous	neuveдено
<b>Chr. Hansen - Bactoflavor®</b>		
19	BFL-TO3	neuveдено

## 10.2 Použitá kultivační média a přístrojové vybavení

### 10.2.1 Kultivační média

U vybraných mikrobiálních kultur byl sledován růst ve třech kultivačních médiích.

#### a) médium M17 (HiMedia)

Složení uvedeno na 1000 ml vody:

Tabulka 3 - Složení média M17

Hydrolyzát kaseinu	2,5 g
Pepton	2,5 g
Sójový pepton	5 g
Kvasniční extrakt	2,5 g
Masový extrakt	5 g
Kyselina askorbová	0,5 g
Síran hořečnatý	0,25 g
Laktóza	5 g
Glycerylfosfát sodný	19 g

Výsledné pH při 25 °C je  $7,1 \pm 0,1$ .

**b) médium MRS (De Man, Rogosa and Sharpe agar; HiMedia)**

Složení uvedeno na 1000 ml vody:

*Tabulka 4 - Složení média MRS*

<b>Pepton</b>	10 g
<b>Kvasničný extrakt</b>	4 g
<b>Masový extrakt</b>	8 g
<b>Glukóza</b>	20 g
<b>Hydrogenfosforečnan draselný</b>	2 g
<b>Octan sodný</b>	5 g
<b>Citronan amonný</b>	2 g
<b>Síran hořečnatý</b>	0,2 g
<b>Síran manganatý</b>	0,05 g
<b>Tween 80</b>	1 g

Výsledné pH při 25 °C je  $5,7 \pm 0,2$ .

**c) médium NB (Nutrient Broth; HiMedia)**

Složení uvedeno na 1000 ml vody:

*Tabulka 5 - Složení média Nutrient Broth*

<b>Masový pepton</b>	5 g
<b>Hovězí extrakt</b>	1,5 g
<b>Kvasničný extrakt</b>	1,5 g
<b>Chlorid sodný</b>	5 g

Výsledné pH při 25 °C je  $7,4 \pm 0,2$ .

Pro některé experimenty byla použita tzv. „poloviční“ média (M17 1/2, MRS 1/2 a NB 1/2), kdy byly připraveny poloviční navážky těchto médií.

#### **d) Zásobní roztok biogenních aminů**

Zásobní roztok biogenních aminů byl připraven navážením příslušného množství biogenních aminů (kadaverinu, putrescinu, histaminu, tyraminu, fenyletylaminu; vše Sigma-Aldrich) a jejich rozpuštěním v 1000 ml destilované vody, pH roztoku bylo upraveno pomocí 35% HCl (Penta) na hodnotu  $6,8 \pm 0,2$ .

*Tabulka 6 - Složení zásobního roztoku BA*

<b>Tyramin</b>	2 g
<b>Putrescin</b>	2 g
<b>Kadaverin</b>	2 g
<b>Histamin</b>	2 g
<b>Fenyletylamin</b>	2 g

Degradace biogenních aminů byla testována v příslušném kultivačním médiu s přidavkem biogenních aminů. Koncentrace každého z biogenních aminů v kultivačním médiu byla 0,2 % (w/v). Následně bylo kultivační médium rozplněno do zkumavek po 4,5 ml a sterilováno v autoklávu.

#### **10.2.2 Přístrojové vybavení**

Běžné laboratorní vybavení pro mikrobiologickou práci (zkumavky, odměrné válce, jednorázový plastový materiál), automatické pipety, pH metry, termostaty, inkubátory, vortex, centrifuga, biohazard boxy, třepačka, HPLC, přístroj na zahřívání a odpařování dusíkem a další.

### **10.3 Identifikace mikroorganismů metodou MALDI-TOF MS**

Některé mikroorganismy byly identifikovány metodou MALDI-TOF MS (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight mass spektrometry - hmotnostní spektrometrie s laserovou desorpcí a ionizací za účasti matrice s průletovým analyzátozem). Kultury narostlé na tuhém kultivačním médiu (stejně složení jako kultivační média uvedená v kapitole 10. 2. 1. plus přidavek agaru (HiMedia) v koncentraci 1,5 g/l) byly přeočkovány pomocí křížového roztěru k získání čisté kultury. Po 48 hodinách kultivace při 30 °C byla kultura sterilně kličkou odebrána do sterilní eppendorfkové mikrozkuhavky, do které bylo

přidáno 500 µl sterilní destilované vody a 500 µl absolutního etanolu (Sigma-Aldrich). Připravené vzorky byly zamrazeny a nachystány na identifikaci, která byla provedena pod vedením prof. Ing. Miroslavy Kačániové, PhD. na Katedře mikrobiologie Fakulty biotechnologie a potravinářstva Slovenské poľnohospodárske univerzity v Nitře.

## **10.4 Ověření schopnosti degradace vybraných mikroorganismů v kultivačním médiu s biogenními aminy**

### **10.4.1 Použité mikrobiální kultury**

Byly použity mikrobiální kultury využívané jako startérové kultury při výrobě fermentovaných masných výrobků. Schopnost degradace těchto mikroorganismů byla zkoumána v kultivačních médiích obohacených o biogenní aminy a srovnávána s kontrolou (příslušné kultivační médium s biogenními aminy bez zaočkované kultury).

### **10.4.2 Příprava a odběr vzorků na analýzu HPLC**

Mikrobiální kmeny byly pomnoženy v kultivačních médiích bez přídavku biogenních aminů a dále pak v kultivačních médiích obohacených o biogenní aminy. Hodnoty pH byly upraveny na  $6,8 \pm 0,2$  v základním experimentu a dále pak při sledování vlivu pH na degradaci BA byly hodnoty upraveny v rozmezí 6,6 až 7,2.

Degradace biogenních aminů byla sledována při teplotách  $30 \pm 0,1$  °C a  $37 \pm 0,1$  °C.

Odběry vzorků byly provedeny ve stanovených časech, a to po 6, 10, 24, 48 a 72 hodinách vždy ze 2 paralelních zkumavek. Kontrolní odběr byl proveden vždy ihned po zaočkování (čas 0 hod). Dále byly vzorky centrifugovány při 4600 otáčkách za minutu po dobu 10 minut a z každé zkumavky bylo odebráno do 2 mikrozkušavek 650 µl supernatantu, ke kterému bylo přidáno 650 µl kyseliny chloristé (Sigma-Aldrich) o koncentraci 1,2 mol/l. Připravené vzorky byly následně zamrazeny při teplotě -18 °C a nachystány tak na derivatizaci.



### 10.4.3 Derivatizace vzorků

K připraveným vzorkům supernatantu s kyselinou chloristou bylo přidáno 100  $\mu$ l vnitřního standardu 1,7-heptandiaminu (Sigma-Aldrich) v koncentraci 500 mg/l. Dále byl odpipetován 1 ml vzorku do derivatizační nádoby a bylo přidáno 1,5 ml čerstvě připraveného karbonátového pufru (pH 11,1 – 11,2) a 2 ml čerstvě připraveného dansylchloridu (Sigma-Aldrich) o koncentraci 5 g/l v acetonu. Uzavřené nádoby byly třepány 20 hodin v temnu. Poté bylo ke vzorkům přidáno 200  $\mu$ l roztoku prolinu a vzorky byly třepány další hodinu. Následně byly ke vzorku přidány 3 ml heptanu (Sigma-Aldrich) a po pečlivém uzavření nádobek se vzorky třepaly 5 minut ručně. Poté bylo odpipetováno 1 ml heptanové vrstvy do vialek. Obsah vialek byl odpařen při teplotě 65 °C do sucha pod proudem dusíku a suchý odparek byl zředěn 1,5 ml acetonitrilu (Sigma-Aldrich). Vialky byly zamrazeny na -18 °C do doby chromatografické analýzy.

### 10.4.4 Chromatografické stanovení biogenních aminů

Bezprostředně před analýzou HPLC byly vzorky přefiltrovány přes stříkačkový filtr s porozitou 0,22  $\mu$ m. Separace byly provedeny gradientovou elucí (voda/acetonitril) na koloně Agilent Zorbax RRHD Eclipse Plus C18 s parametry 50 x 3,0 mm, pórovitost 1,8  $\mu$ m (Agilent, Paolo Alto, USA) při teplotě 30 °C, průtok kolonou byl nastaven na 0,453 ml/min. Chromatografický systém Dionex HPLC UltiMate 3000 byl tvořen odplyňovací jednotkou (degaserem), binární pumpou, autosamplerem, termostatem kolon a UV/VIS detektorem (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA). Detekce probíhala pomocí UV/VIS detektoru při vlnové délce 254 nm. Chromatogramy byly vyhodnoceny pomocí softwaru Chromeleon™ 6.8 a následně zpracovány do přehledných tabulek a grafů.

## 11 VÝSLEDKY A DISKUZE

V experimentální části diplomové práce byla zjišťována degradace BA pomocí 18 gram-pozitivních mikrobiálních kultur využívaných při výrobě fermentovaných masných výrobků. Nejprve byly z 18 mikrobiálních kultur vybrány ty kultury, které byly schopné nejlépe degradovat pět přidaných biogenních aminů (FEM, PUT, KAD, HIM a TYM) po 48 hodinách kultivace v příslušném kultivačním médiu (Nutrient Broth, MRS a M17 a poloviční navážky těchto médií). U vybraných 3 mikrobiálních kultur (komerční názvy LHP DRY, SM-194 a BFL-TO3) byl sledován vliv doby kultivace (24 a 48 hodin) na degradaci biogenních aminů. Ze získaných výsledků byly vybrány 2 mikrobiální kultury (LHP DRY a SM-194), u kterých byl dále sledován vliv teploty (30 °C a 37 °C), času (12, 24, 30, 36 a 48 hodin), pH (6,6; 6,8; 7,0 a 7,2) a kultivačního média (MRS a MRS 1/2), na degradaci biogenních aminů.

### 11.1 Identifikace pomocí MALDI-TOF MS

Analýze pomocí MALDI-TOF MS byly podrobeny pouze mikrobiální kultury, se kterými se prováděly experimenty týkající se faktorů na vliv degradace biogenních aminů. Na identifikaci mikroorganismů pomocí metody MALDI-TOF MS byly vybrány bílé kolonie, které jsou typické pro bakterie mléčného kvašení.

Výsledky jsou stručně shrnuty v následující tabulce (tab. 7).

Tabulka 7 - Složení kultur dle výrobce a výsledky identifikace metodou MALDI-TOF MS

<b>Chr. Hansen - Bactoferm®</b>			
	<b>Komerční název</b>	<b>Mikrobiální složení (dle informací dodavatele)</b>	<b>Identifikace pomocí MALDI-TOF MS</b>
1	Rubis	Bioprotective culture	
2	S-SX	<i>Staphylococcus xylosus</i>	
<b>3</b>	<b>LHP DRY</b>	<b><i>Pediococcus pentosaceus</i></b>	<b><i>Pediococcus pentosaceus,</i> <i>Pediococcus acidilactici</i></b>
5	CS-300	<i>Staphylococcus carnosus</i>	
6	HPS DRY	<i>Pediococcus acidilactici</i>	
7	SM-75	<i>Staphylococcus carnosus,</i> <i>Staphylococcus xylosus</i>	
8	C-P-77	<i>Staphylococcus carnosus,</i> <i>Lactobacillus pentosus</i>	
9	F-SC-111	<i>Staphylococcus carnosus,</i> <i>Lactobacillus sakei</i>	
<b>10</b>	<b>SM-194</b>	<b>5 kmenů</b>	<b><i>Pediococcus pentosaceus,</i> <i>Staphylococcus carnosus</i></b>
11	T-SPX	<i>Pediococcus pentosaceus,</i> <i>Staphylococcus xylosus</i>	
<b>Chr. Hansen - SafePro®</b>			
12	B-LC-48	<i>Lactobacillus curvatus</i>	
13	B-LC-20	<i>Pediococcus acicilactici</i>	
14	B-2	<i>Lactobacillus sakei</i>	
15	B-LC-007	nevedeno	
16	B-LC-78	nevedeno	
17	B-LC-77	nevedeno	
18	ImPorous	nevedeno	
<b>Chr. Hansen - Bactoflavor®</b>			
<b>19</b>	<b>BFL-TO3</b>	<b>nevedeno</b>	<b><i>Pediococcus pentosaceus,</i> <i>Staphylococcus carnosus</i></b>

## 11.2 Ověření schopnosti degradace vybraných mikroorganismů v kultivačním médiu s biogenními aminy

Byly použity mikrobiální kultury využívané jako startérové kultury při výrobě fermentovaných masných výrobků. Schopnost degradace těchto mikroorganismů byla zkoumána v kultivačních médiích obohacených o biogenní aminy a srovnávána s kontrolou (příslušné kultivační médium s biogenními aminy bez zaočkované kultury).

### 11.2.1 Stanovení úbytku BA 18 mikrobiálními kulturami pomocí HPLC

Byl sledován úbytek pěti BA – fenyletylaminu (FEM), putrescinu (PUT), kadaverinu (KAD), histaminu (HIM) a tyraminu (TYM) pomocí 18 gram-pozitivních mikrobiálních kultur používaných v masném průmyslu, po 48 hodinové kultivaci. Úbytek BA byl srovnáván s kontrolou, což bylo médium s BA bez zaočkovaných mikroorganismů.

Významnými degradéry BA se ukázaly 3 mikrobiální kultury (komerční názvy LHP DRY, SM-194 a BFL-TO3). Všechny podrobné výsledky degradace BA jsou shrnuty v příloze PI. V následující tabulce (tab. 8) jsou shrnuty obsahy BA nezávisle na kultivačním médiu.

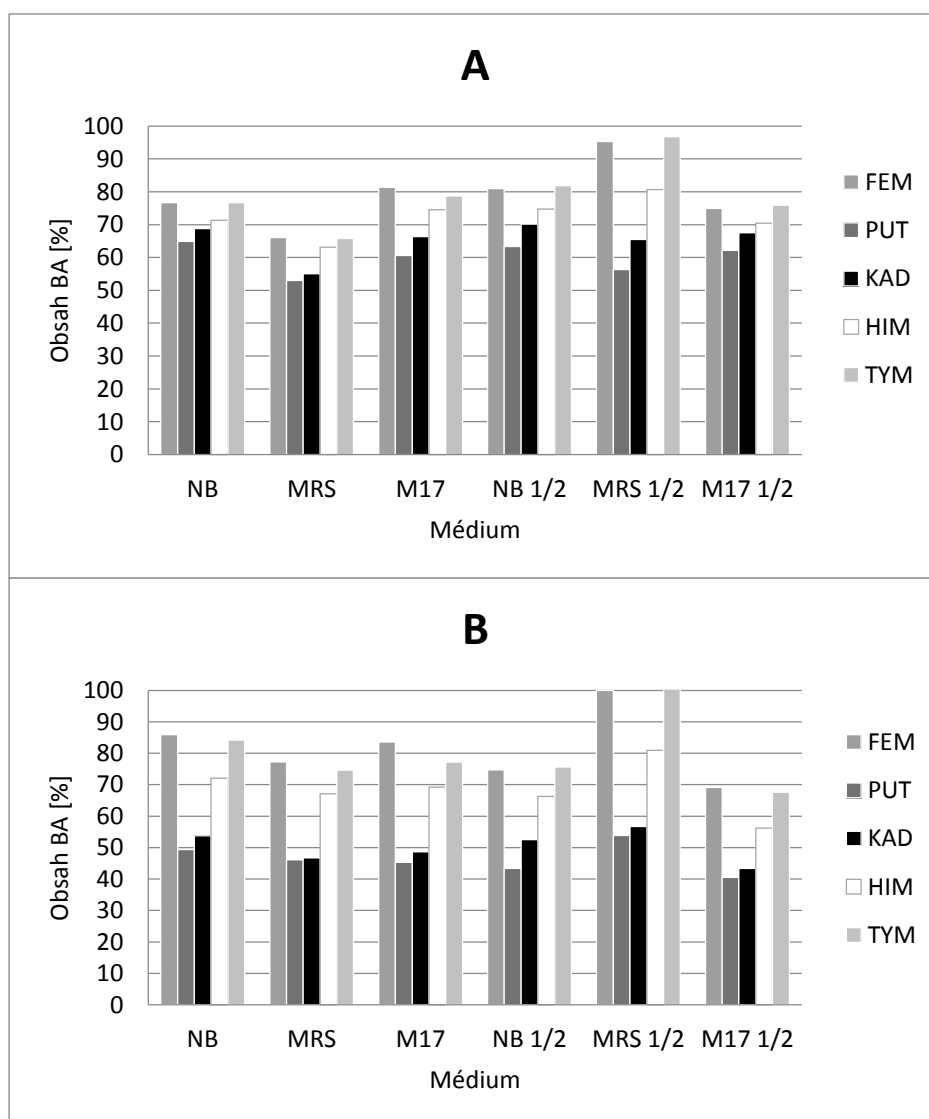
Tabulka 8 - Degradace BA 18 mikrobiálními kulturami

		Zůstatek BA v médiu [%]				
		FEM	PUT	KAD	HIM	TYM
1	<b>Rubis</b>	63-75	51-70	66-94	47-69	69-77
2	<b>S-SX</b>	95 - 100	51-71	81-99	52-97	99-100
3	<b>LHP DRY</b>	55-98	51-76	60-97	52-75	60-98
5	<b>CS-300</b>	57-63	49-77	66-97	56-70	66-69
6	<b>HPS DRY</b>	64-100	49-76	68-99	52-83	72-92
7	<b>SM-75</b>	61-99	54-77	74-84	54-75	68-98
8	<b>C-P-77</b>	60-96	62-88	68-99	57-89	65-90
9	<b>F-SC-111</b>	65-100	65-79	70-95	54-89	70-95
10	<b>SM-194</b>	45-99	45-85	63-90	53-76	53-99
11	<b>T-SPX</b>	72-91	51-69	70-90	59-72	77-97
12	<b>B-LC-48</b>	62-72	51-67	69-98	49-83	70-96
13	<b>B-LC-20</b>	59-98	60-64	62-92	51-82	66-93
14	<b>B-2</b>	67-99	42-73	67-99	44-67	78-98
15	<b>B-LC-007</b>	59-62	34-88	50-63	34-73	59-70
16	<b>B-LC-78</b>	60-97	60-89	63-98	59-88	68-93
17	<b>B-LC-77</b>	72-100	65-89	73-96	53-77	81-100
18	<b>Im Porous</b>	69-99	65-93	69-91	49-68	79-95
19	<b>BFL-TO3</b>	52-93	55-98	62-65	36-66	47-87

### 11.2.2 Degradace BA mikrobiální kulturou označovanou LHP DRY

Schopnost degradace BA pomocí kultury označované komerčním názvem LHP DRY v kulturačních médiích NB, MRS, M17 a v médiích s polovičními navážkami s přidavkem BA, úpravě pH na hodnotu 6,8; odběru po 24 a 48 hodinách, je uvedeno na obrázku 1.

Všeobecně lze tvrdit, jak vyplývá z výsledků, že se zvyšující se dobou kultivace byl úbytek BA větší. Tedy schopnost degradace BA pomocí mikrobiální kultury LHP DRY se zvyšovala s časem. Nejvíce náchylný k degradaci byl putrescin v médiu MRS po 24 hodinách. Po 48 hodinové kultivaci byl náchylný na degradaci opět putrescin, ovšem v médiu Nutrient Broth s poloviční navážkou.

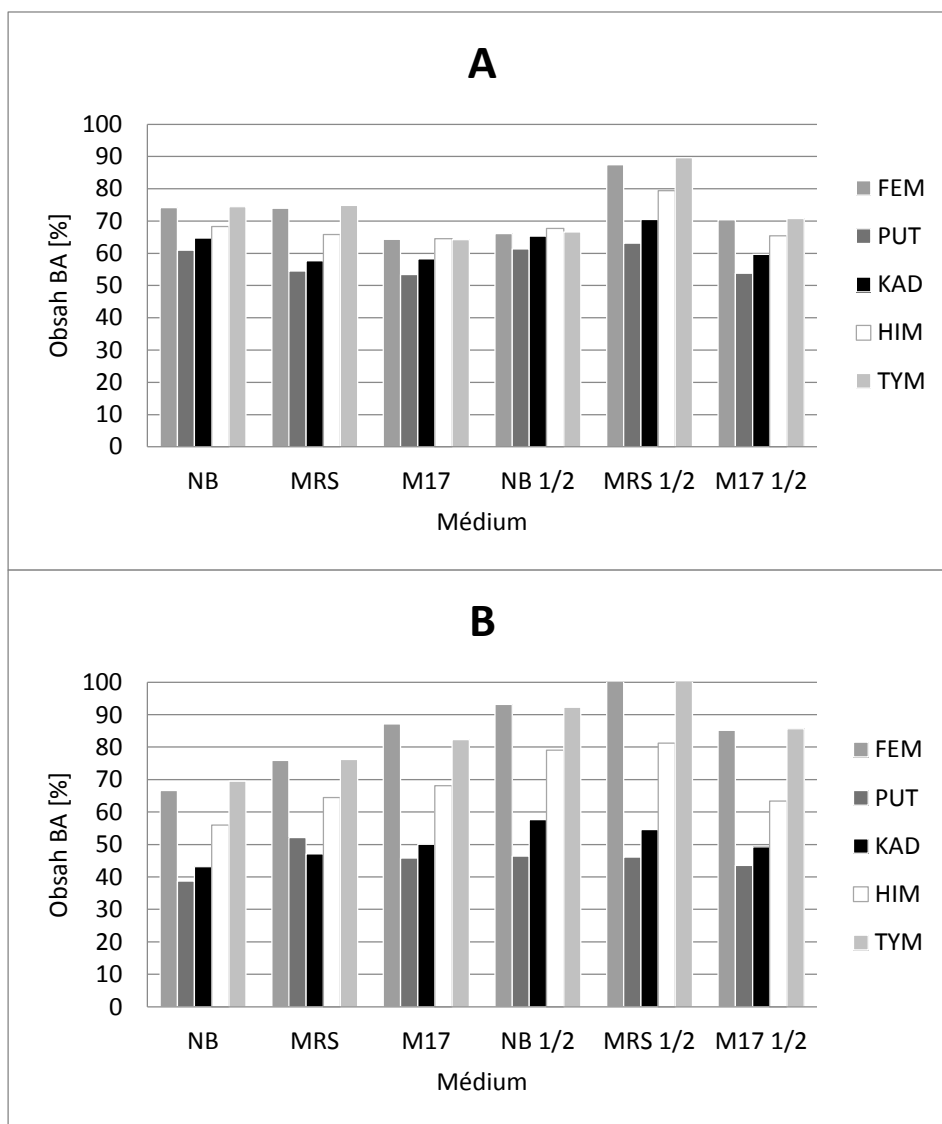


Obrázek 1 - Degradace BA pomocí mikrobiální kultury LHP DRY po 24 hod (A) a 48 hod (B) kultivace

### 11.2.3 Degradace BA mikrobiální kulturou označovanou SM-194

Schopnost degradace BA pomocí kultury označované pod komerčním názvem SM-194 v kultivačních médiích NB, MRS, M17 a v médiích s polovičními navážkami s přidavkem BA, úpravě pH na hodnotu 6,8; odběru po 24 a 48 hodinách, je uvedeno na obrázku 2.

Všeobecně lze tvrdit, jak vyplývá z výsledků, že se zvyšující se dobou kultivace byl úbytek BA větší. Tedy schopnost degradace BA pomocí mikrobiální kultury SM-194 se zvyšovala s časem. Nejvíce náchylný k degradaci byl putrescin v médiu M17 po 24 hodinách. Po 48 hodinové kultivaci byl náchylný na degradaci opět putrescin, ovšem v médiu Nutrient Broth.

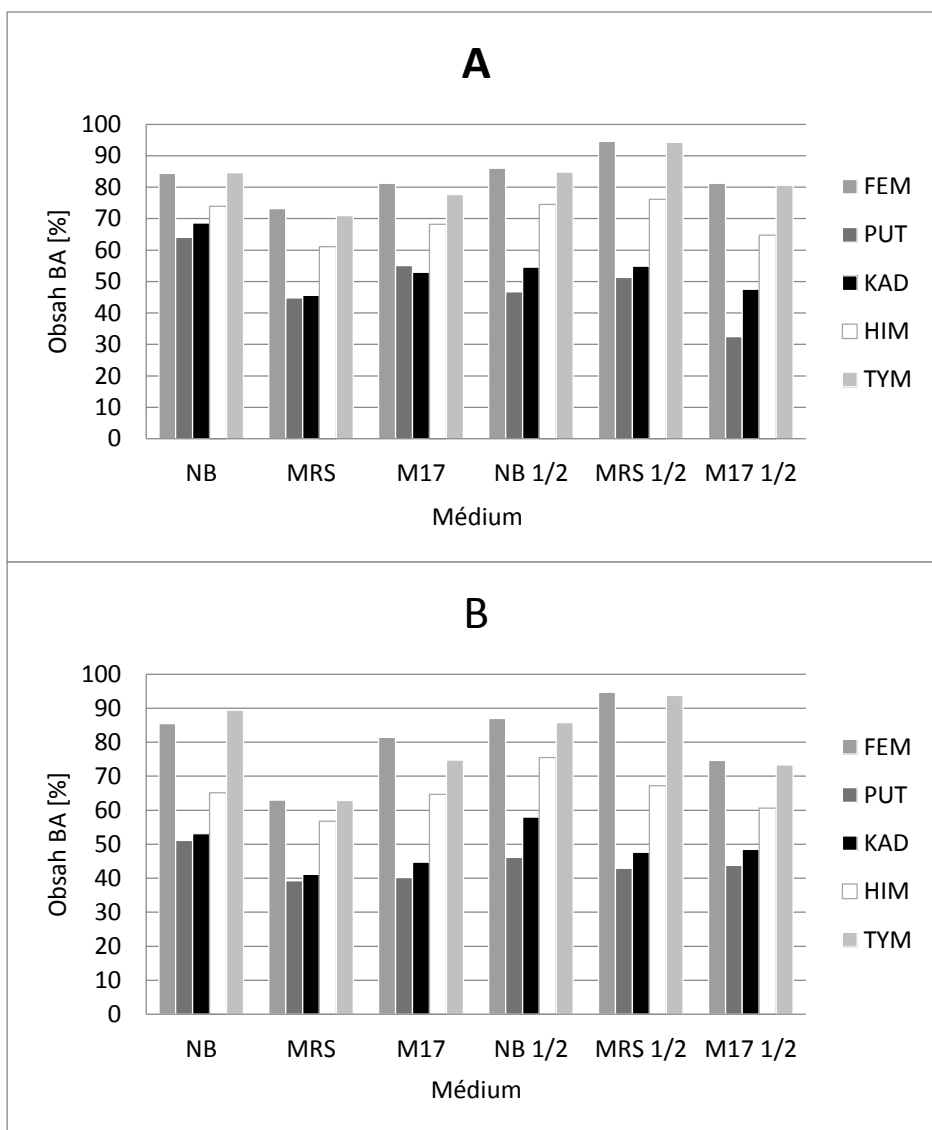


Obrázek 2 - Degradace BA pomocí mikrobiální kultury SM-194 po 24 hod (A) a 48 hod (B) kultivace

### 11.2.4 Degradace BA mikrobiální kulturou označovanou BFL-TO3

Schopnost degradace BA pomocí kultury označované pod komerčním názvem BFL-TO3 v kultivačních médiích NB, MRS, M17 a v médiích s polovičními navážkami s přidavkem BA, úpravě pH na hodnotu 6,8; odběru po 24 a 48 hodinách, je uvedeno na obrázku 3.

Všeobecně lze tvrdit, jak vyplývá z výsledků, že se zvyšující se dobou kultivace byl úbytek BA větší. Tedy schopnost degradace BA pomocí mikrobiální kultury BFL-TO3 se zvyšovala s časem. Nejvíce náchylný k degradaci byl putrescin v médiu M17 s poloviční navážkou, po 24 hodinách. Po 48 hodinové kultivaci byl náchylný na degradaci opět putrescin, ovšem v médiu MRS.



Obrázek 3 - Degradace BA pomocí mikrobiální kultury BFL-TO3 po 24 hod (A) a 48 hod (B) kultivace

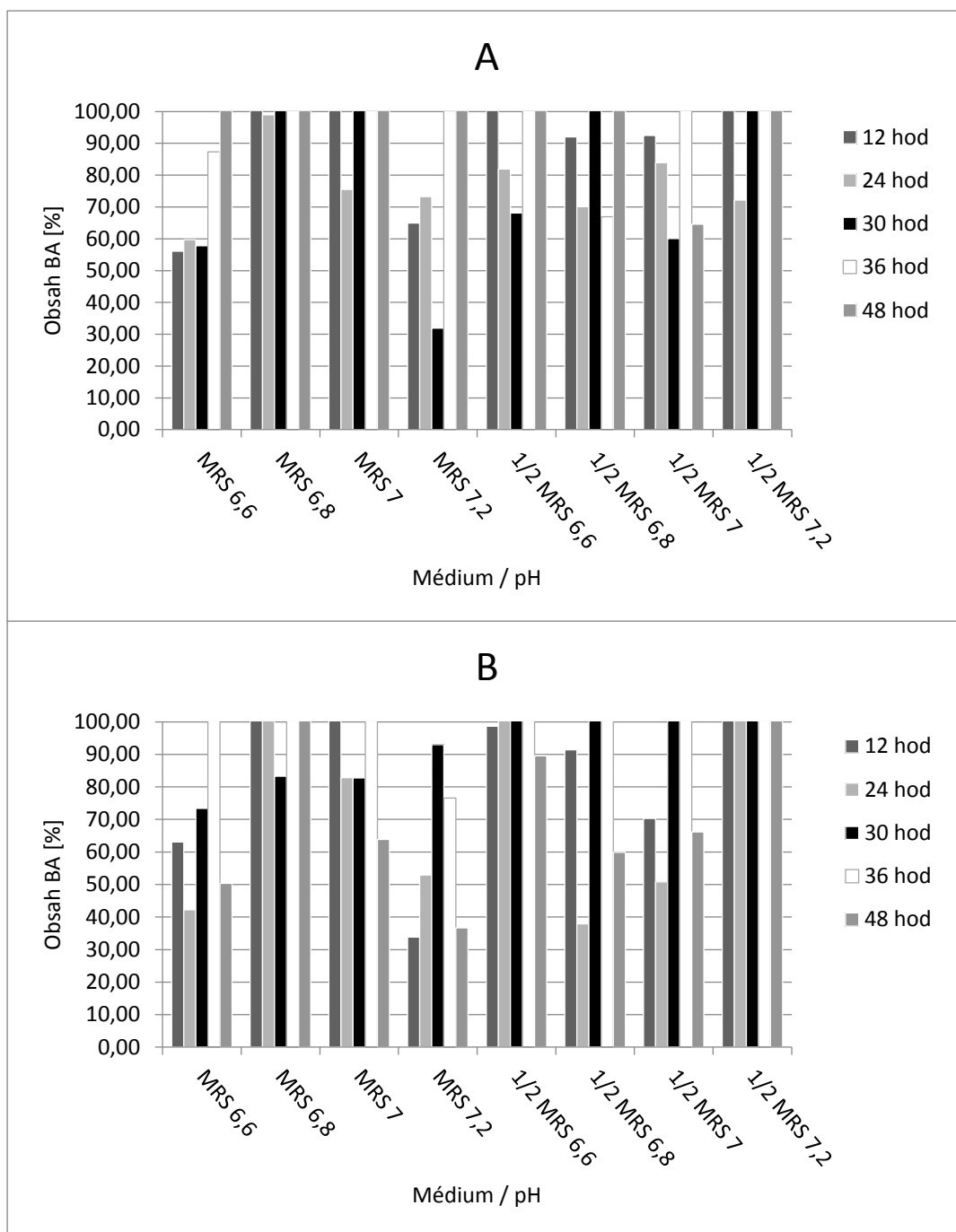
### **11.3 Sledování vlivu vybraných faktorů na degradaci biogenních aminů kulturou LHP DRY**

Sledování vlivu vybraných faktorů na degradaci biogenních aminů kulturou LHP DRY jsou shrnuty v příloze II.

#### **11.3.1 Degradace putrescinu kulturou LHP DRY v závislosti na faktorech prostředí**

Obrázek 4 znázorňuje srovnání degradace putrescinu kulturou LHP DRY v závislosti na faktorech prostředí. Všeobecně můžeme tvrdit, že při zvýšené teplotě (37 °C) se degradace putrescinu kulturou LHP DRY zvyšovala oproti teplotě nižší (30 °C). Při teplotě 30 °C byl putrescin nejvíce degradován po 30 hodinách kultivace v médiu MRS při pH 7,2, a to až o 70 %. Stejná míra degradace byla pozorována v médiu MRS při hodnotě pH 6,6 po 12, 24 i 30 hodinách kultivace při teplotě 30 °C. Při teplotě 37 °C byl putrescin nejvíce degradován v médiu MRS při pH 7,2 a to hned po 12 hodinách kultivace až o 60 %. Lze tvrdit, že při obou teplotách měla značný vliv na degradaci i dostupnost živin, což se projevilo v médiu MRS s polovičním množstvím živin (MRS 1/2) s výjimkou biogenních aminů. Nejmenší pokles putrescinu byl zaznamenán v médiu MRS o pH 6,8 při teplotě 30 °C. V médiu MRS s polovičním množstvím živin při pH 7,2 a teplotě 37 °C nedocházelo k degradaci putrescinu vůbec. Na základě výsledků uvedených na obrázku 4 lze konstatovat, že nelze jednoznačně označit podmínky (kultivační teplota, dostupnost živin a pH kultivačního média) ani dobu, za kterých by kulturou LHP DRY docházelo k nejvyšší degradaci putrescinu.

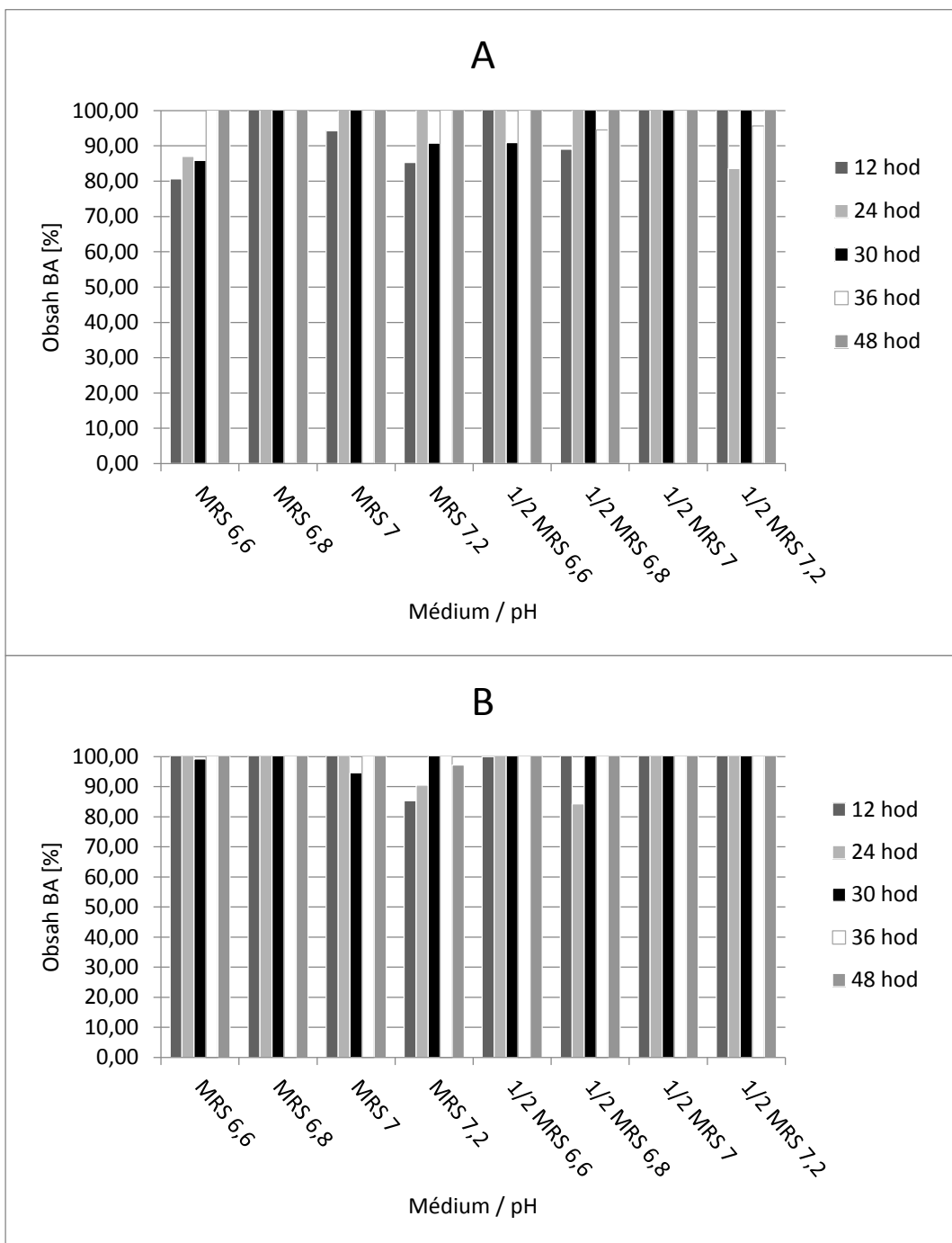




Obrázek 4 - Degradace putrescinu kulturou LHP DRY při 30 °C (A) a 37 °C (B)

### 11.3.2 Degradace fenyletylaminu kulturou LHP DRY v závislosti na faktorech prostředí

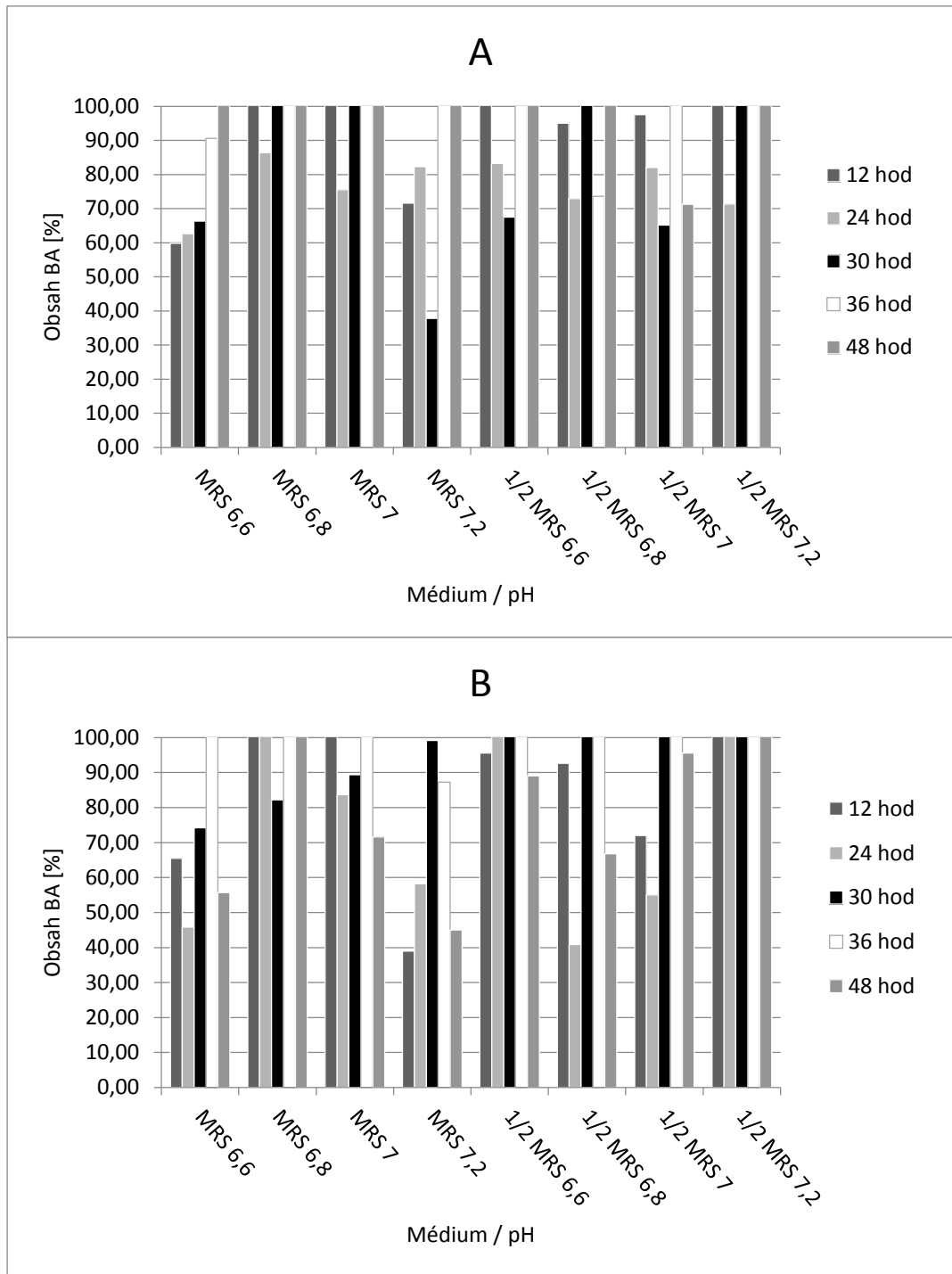
Obrázek 5 znázorňuje srovnání degradace fenyletylaminu kulturou LHP DRY v závislosti na faktorech prostředí. K větší degradaci biogenních aminů docházelo při nižší teplotě (30 °C). Při teplotě 30 °C byl fenyletylamin nejvíce degradován v médiu MRS při pH 6,6, a to hned po 12 hodinách kultivace o 20 %, poté ale ovšem jeho obsah stoupal. Po 12 hodinové kultivaci byly zaznamenány úbytky fenyletylaminu i u média MRS při pH 7,0 a 7,2 a dále u média MRS s polovičním množstvím živin při pH 6,8. Z obrázku 5 je patrné, že při 30 °C nedocházelo k degradaci fenyletylaminu v médiu MRS při pH 6,8 a v médiu MRS s polovičním množstvím živin při pH 7,0. Při teplotě 37 °C docházelo k významnějšímu úbytku fenyletylaminu pouze v médiu MRS při pH 7,2, a to hned po 12 hodinách kultivace, podobně, jako tomu bylo i při teplotě 30 °C. Při kultivační teplotě 37 °C nedocházelo k téměř žádné degradaci fenyletylaminu ve více než polovině zkoumaných půd a hodnot pH. Na základě výsledků uvedených na obrázku 5 lze tvrdit, že nejvhodnější kombinace vnějších faktorů pro degradaci fenyletylaminu kulturou LHP DRY byla kultivační teplota 30 °C, doba kultivace 12 hodin a kultivační médium MRS upraveno na hodnotu pH 6,6. Nebyl zde ovšem prokázán vliv kultivačního média s polovičním množstvím živin na degradaci fenyletylaminu.



Obrázek 5 - Degradace fenyletylamínu kulturou LHP DRY při 30 °C (A) a 37 °C (B)

### 11.3.3 Degradace kadaverinu kulturou LHP DRY v závislosti na faktorech prostředí

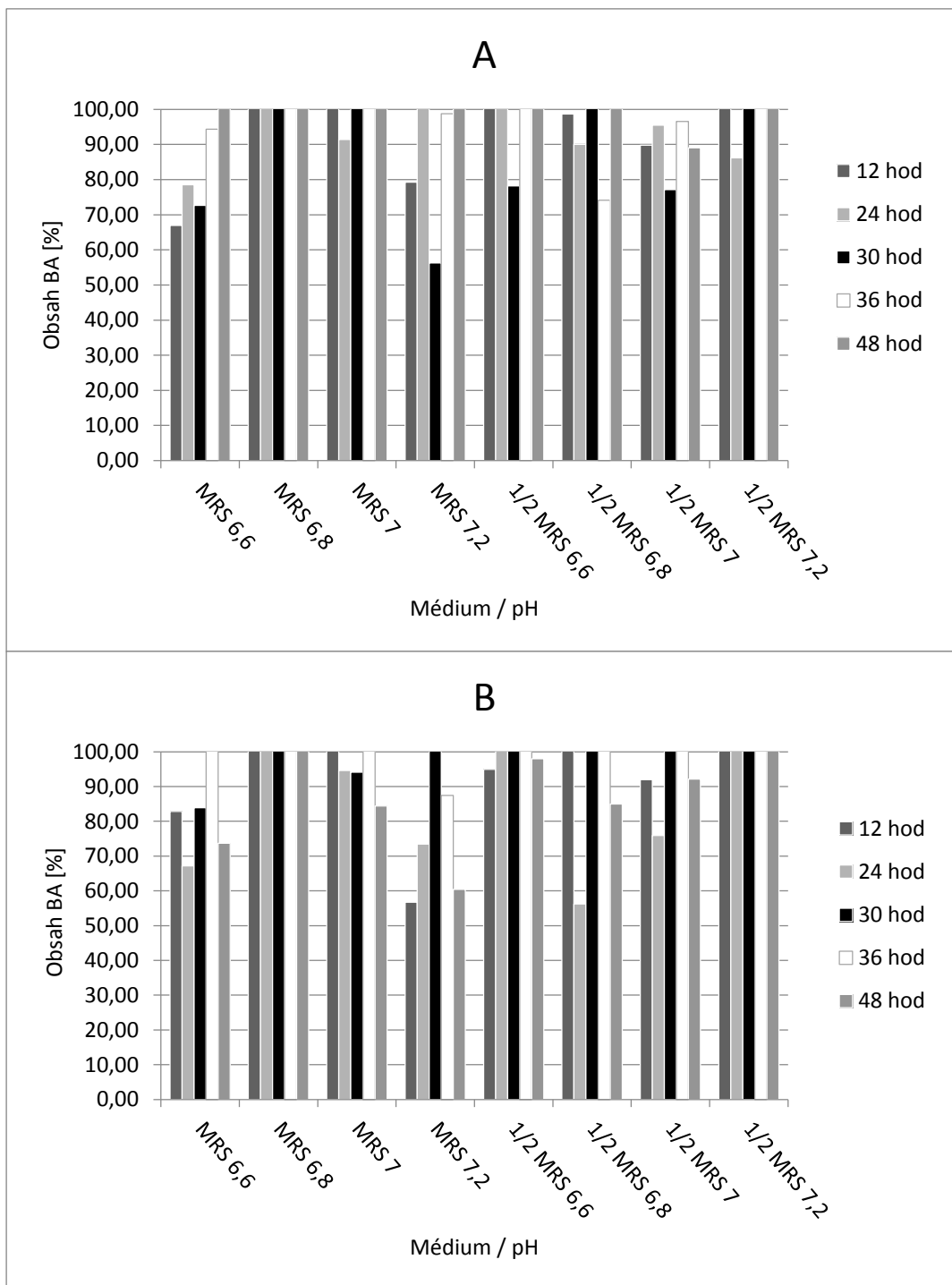
Obrázek 6 znázorňuje srovnání degradace kadaverinu kulturou LHP DRY v závislosti na faktorech prostředí. Všeobecně můžeme tvrdit, že při zvýšené teplotě (37 °C) se degradace kadaverinu kulturou LHP DRY zvyšovala oproti teplotě nižší (30 °C). Při teplotě 30 °C byl kadaverin nejvíce degradován po 30 hodinách kultivace v médiu MRS upraveném na pH 7,2, a to o více jak 60 %, poté začal jeho obsah vysoce stoupat. Významný úbytek kadaverinu byl pozorován i v médiu MRS při pH 6,6, teplotě 30 °C, po 12 hodinách kultivace, a to o 40 %. Poté začal obsah kadaverinu postupně stoupat. Při teplotě 37 °C byl kadaverin nejvíce degradován v médiu MRS při pH 7,2, a to hned po 12 hodinách kultivace o více jak 60 %. Poté začal jeho obsah postupně stoupat a zase klesat. Toto může být způsobeno tím, že po 24 hodinách začala kultura využívat jiné zdroje uhlíku a dusíku až do jejich vyčerpání, poté byl opět pozorován úbytek biogenních aminů. K významnému úbytku obsahu kadaverinu docházelo při 37 °C v médiu MRS s polovičním množstvím živin při pH 6,8 po 24 hodinách kultivace, a to o 60 %. Při kultivační teplotě 37 °C nedocházelo k žádné degradaci kadaverinu v médiu MRS s polovičním množstvím živin při pH 7,2. Na základě výsledků uvedených na obrázku 6 lze konstatovat, že optimální kombinace vnějších faktorů na degradaci kadaverinu byla kultivační teplota 37 °C, médium MRS o hodnotě pH 7,2 a doba kultivace pouze 12 hodin.



Obrázek 6 - Degradace kadaverinu kulturou LHP DRY při 30 °C (A) a 37 °C (B)

#### 11.3.4 Degradace histaminu kulturou LHP DRY v závislosti na faktorech prostředí

Obrázek 7 znázorňuje srovnání degradace histaminu kulturou LHP DRY v závislosti na faktorech prostředí. Při teplotě 30 °C byl histamin nejvíce degradován v médiu MRS 7,2 po 30 hodinové kultivaci, a to o 45 %. Dále pak v médiu MRS při pH 6,6, po 12 hodinové kultivaci a při 30 °C, kdy byl úbytek histaminu 35 %. Poté jeho obsah začal opět stoupat. Při kultivační teplotě 37 °C byl nejvíce degradován histamin v médiu MRS při pH 7,2 po 12 hodinové kultivaci o více než 40 %. Taktéž tomu bylo i v médiu MRS při pH 6,8 s polovičním množstvím živin, ale až po 24 hodinách kultivace. Žádné úbytky histaminu nebyly zaznamenány v médiích MRS při pH 6,8 v obou kultivačních teplotách a dále pak při teplotě 37 °C v médiu MRS s polovičním množstvím živin. Na základě výsledků uvedených na obrázku 7 můžeme konstatovat, že nejvhodnější kombinace vnějších faktorů na degradaci histaminu byla v médiu MRS při pH 7,2, po 30 hodinové kultivaci a teplotě 30 °C. Nebyl zde jednoznačně prokázán vliv polovičního množství živin u média MRS.

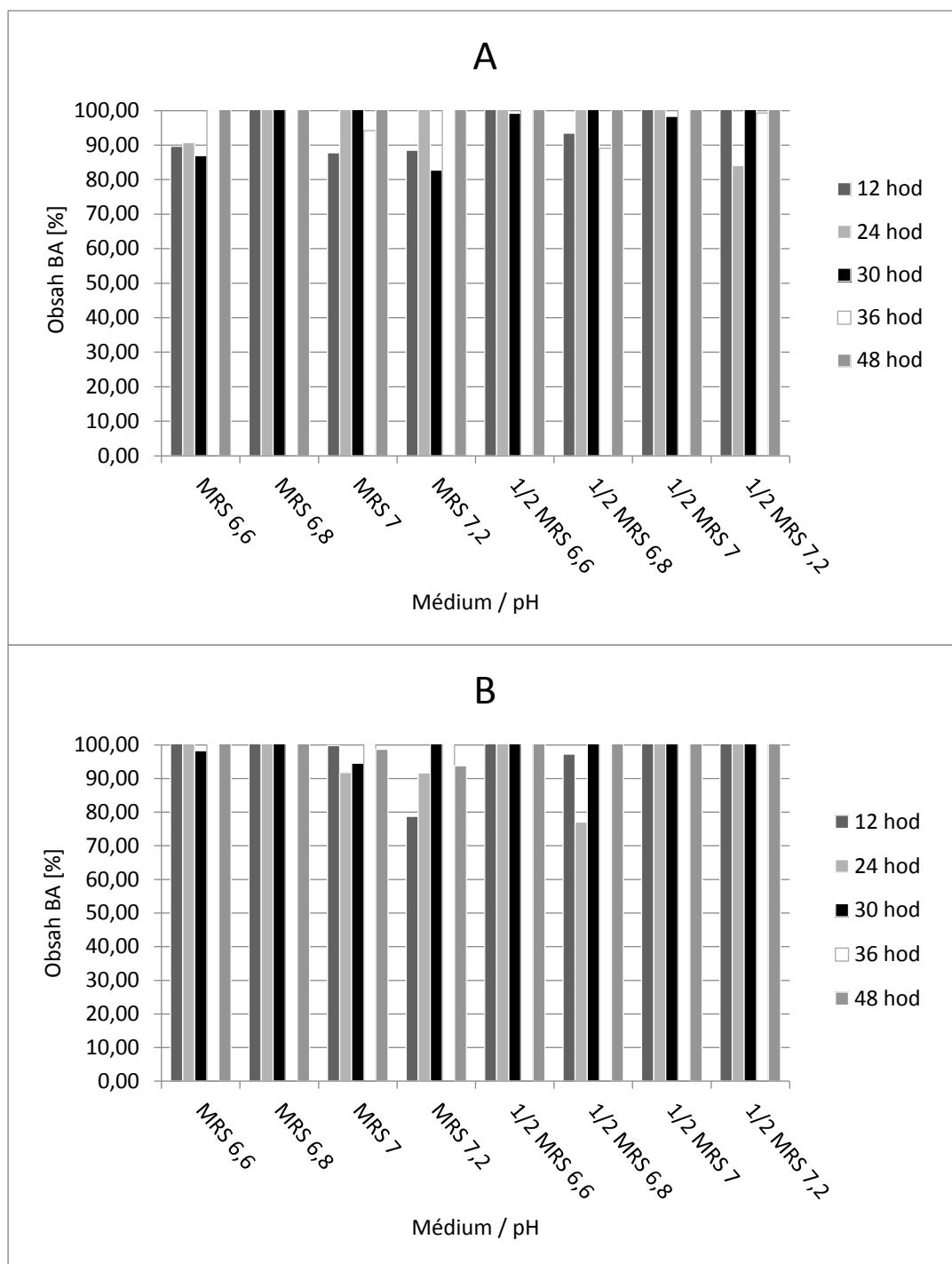


Obrázek 7 - Degradace histaminu kulturou LHP DRY při 30 °C (A) a 37 °C (B)

### 11.3.5 Degradace tyraminu kulturou LHP DRY v závislosti na faktorech prostředí

Obrázek 8 znázorňuje srovnání degradace tyraminu kulturou LHP DRY v závislosti na faktorech prostředí. Při teplotě 30 °C nedocházelo k výraznějším úbytkům tyraminu. Úbytky nepřekročily hranici 18 %. Všeobecně lze ale tvrdit, že k těmto úbytkům docházelo již po 12, 24 a 48 hodinách kultivace a poté se jejich obsah zvyšoval. Při kultivační teplotě 37 °C byl nejvíce degradován tyramin v médiu MRS při pH 7,2, a to hned po 12 hodinách kultivace. Žádné poklesy tyraminu nebyly zaznamenány v médiu MRS při pH 6,8 a kultivační teplotě 30 °C a v médiu MRS při pH 6,8, dále pak v médiu MRS s polovičním množstvím živin při pH 6,6 a 7,2 a 37 °C. Na základě výsledků uvedených na obrázku 8 lze konstatovat, že nelze jednoznačně určit podmínky, za kterých by kulturou LHP DRY docházelo k nejvyšší degradaci tyraminu.





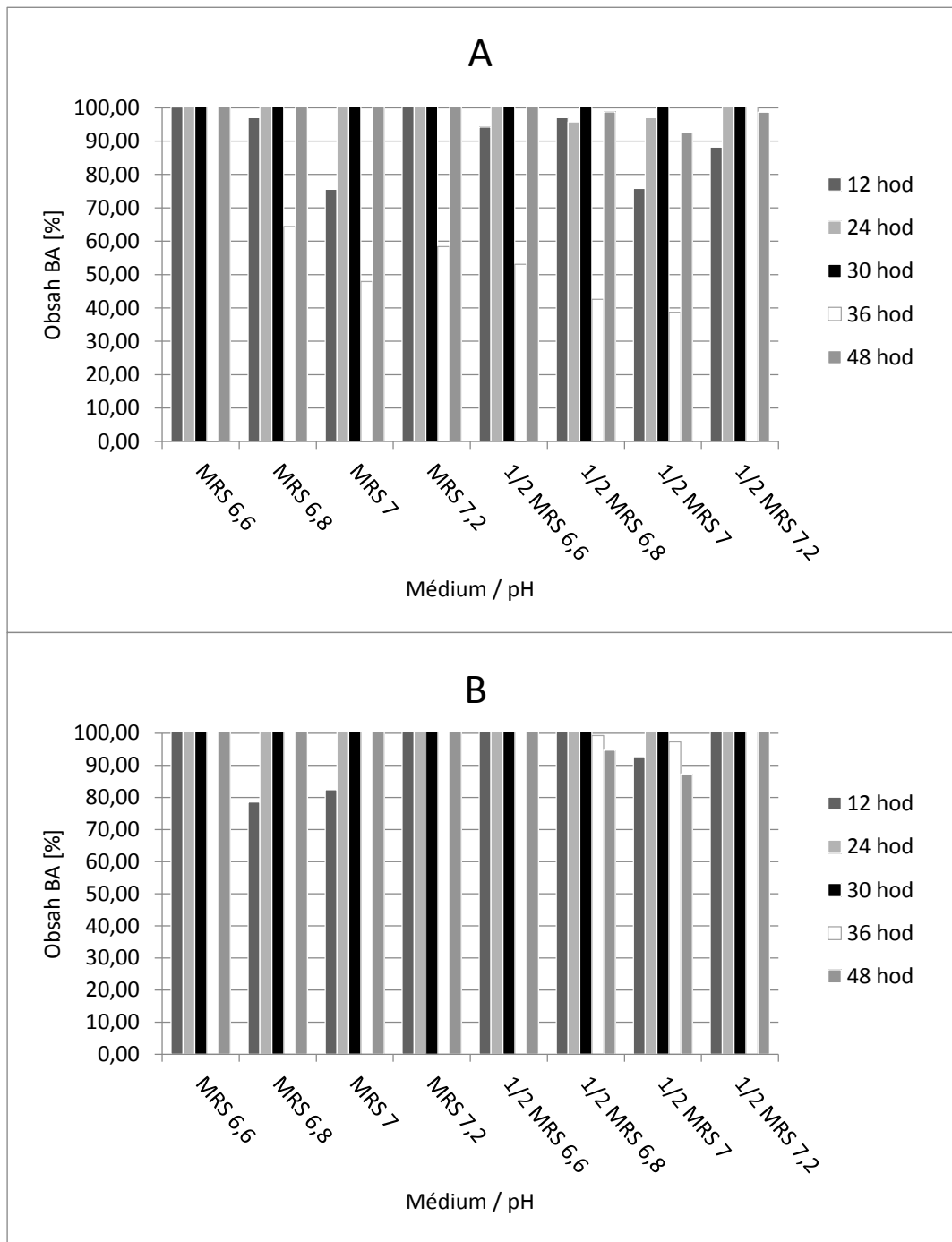
Obrázek 8 - Degradace tyraminu kulturou LHP DRY při 30 °C (A) a 37 °C (B)

## **11.4 Sledování vlivu vybraných faktorů na degradaci biogenních aminů u kultury SM-194**

Sledování vlivu vybraných faktorů na degradaci biogenních aminů kulturou SM-194 jsou shrnuty v příloze III.

### **11.4.1 Degradace putrescinu kulturou SM-194 v závislosti na faktorech prostředí**

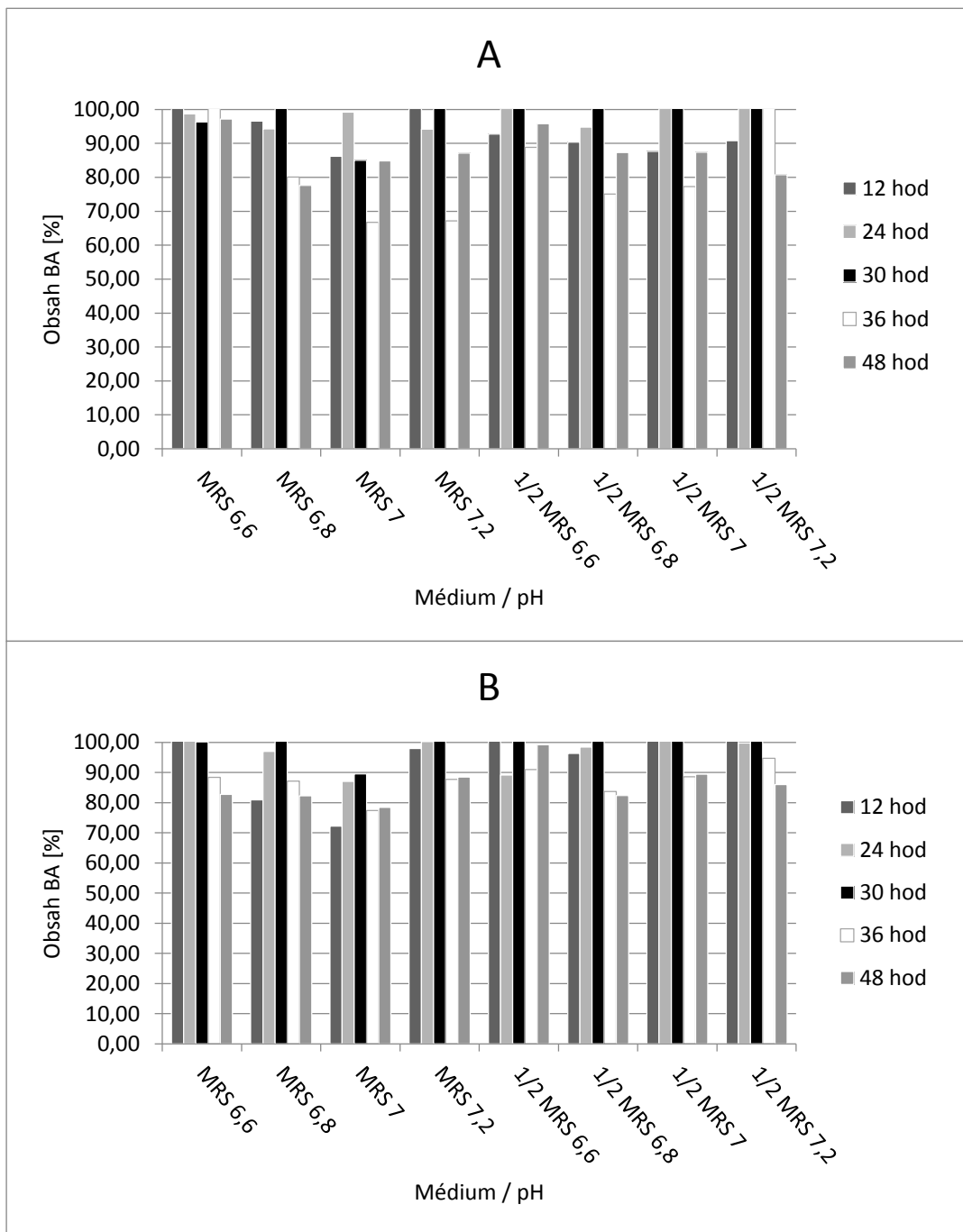
Obrázek 9 znázorňuje srovnání degradace putrescinu kulturou SM-194 v závislosti na faktorech prostředí. Všeobecně lze tvrdit, že při nižší teplotě (30 °C) docházelo k výraznější degradaci putrescinu oproti teplotě vyšší (37 °C). Při kultivační teplotě 30 °C docházelo k největším úbytkům putrescinu v médiu MRS s polovičním množstvím živin při pH 7,0 a po 36 hodinách kultivace, a to až o 62 %. K výrazným úbytkům putrescinu docházelo při 30 °C i v médiích MRS při pH 7 po 36 hodinách kultivace a v médiu MRS s polovičním množstvím živin při hodnotách pH 6,6 a 6,8, o více jak 50 % po 36 hodinách kultivace. Při kultivační teplotě 37 °C byl nejvíce degradován putrescin v médiu MRS při pH 6,8 a 7, a to o 20 % po 12 hodinách kultivace. Na základě výsledků uvedených na obrázku 9 lze konstatovat, že na degradaci putrescinu měli výrazný vliv jak teplota, tak i dostupnost živin, což se projevilo v médiu MRS s polovičním množstvím živin. Lze tvrdit, že na degradaci putrescinu kulturou SM-194 byla vhodná kombinace nižší teploty (30 °C), poloviční množství živin kultivačního média MRS (nezávisle na hodnotě pH) a doba kultivace 36 hodin.



Obrázek 9 - Degradace putrescinu kulturou SM-194 při 30 °C (A) a 37 °C (B)

#### 11.4.2 Degradace fenyletylaminu kulturou SM-194 v závislosti na faktorech prostředí

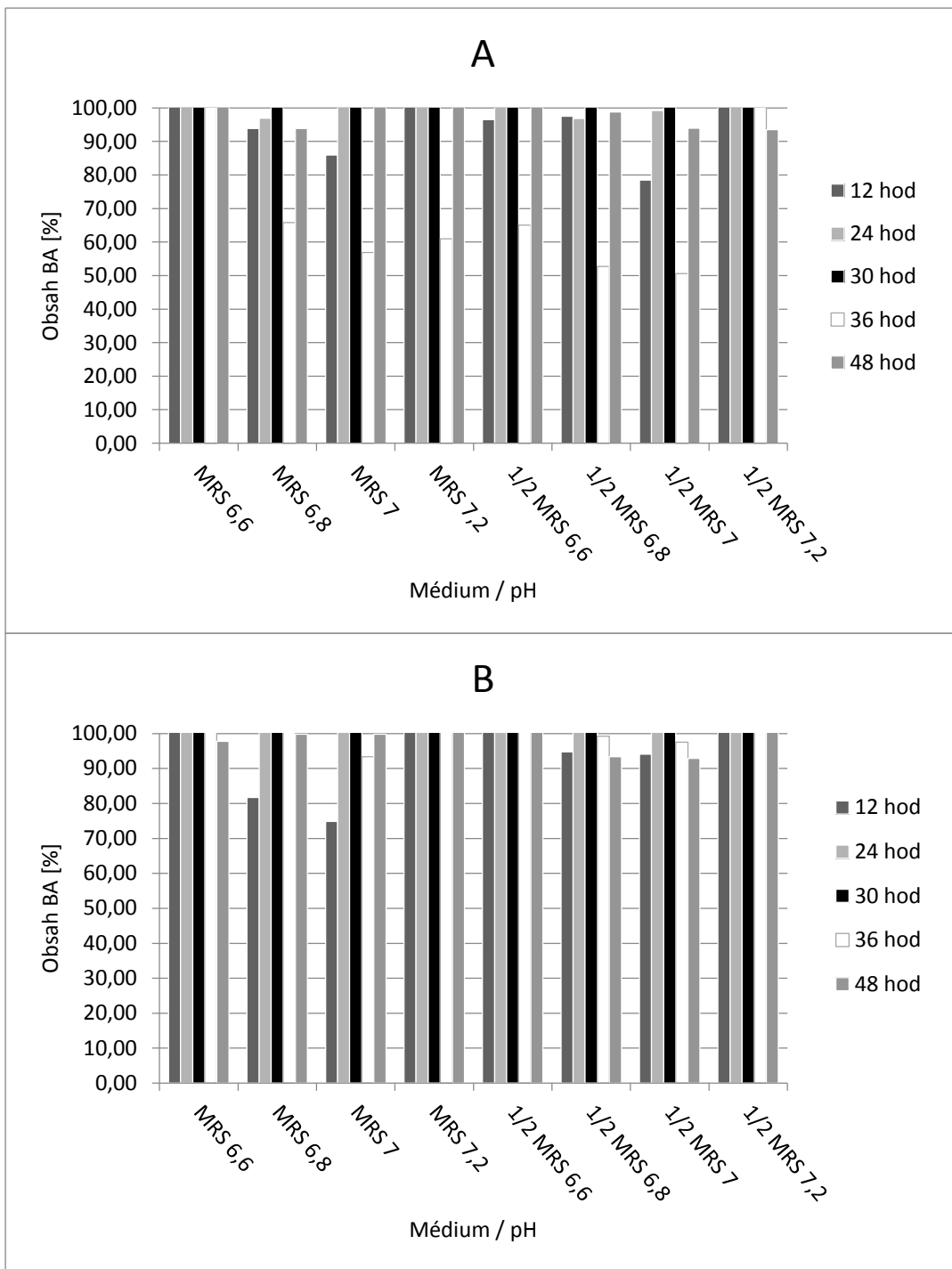
Obrázek 10 znázorňuje srovnání degradace fenyletylaminu kulturou SM-194 v závislosti na faktorech prostředí. Všeobecně nelze jednoznačně určit teplotu, která měla na degradaci fenyletylaminu větší vliv. Při kultivační teplotě 30 °C byl nejvíce degradován fenyletylamin v médiu MRS při pH 7,0 a 7,2, po 36 hodinách kultivace, a to o více jak 30 %. Fenyletylamin byl nejméně degradován v médiu MRS při pH 6,6 a teplotě 30 °C. Při kultivační teplotě 37 °C byl nejvíce degradován fenyletylamin v médiu MRS při pH 7,0, a to hned po 12 hodinách kultivace o 30 %. Jak je patrné z obrázku 10, tak při kultivační teplotě 37 °C měly úbytky fenyletylaminu ve většině případů klesající trend s delší dobou kultivace. Na základě výsledků nelze jednoznačně určit nevhodnější kombinace podmínek, za kterých by kulturou SM-194 docházelo k největší degradaci fenyletylaminu.



Obrázek 10 - Degradace fenyletylaminu kulturou SM-194 při 30 °C (A) a 37 °C (B)

### 11.4.3 Degradace kadaverinu kulturou SM-194 v závislosti na faktorech prostředí

Obrázek 11 znázorňuje srovnání degradace kadaverinu kulturou SM-194 v závislosti na faktorech prostředí. Všeobecně lze tvrdit, že při nižší teplotě (30 °C) docházelo k větší degradaci kadaverinu oproti teplotě vyšší (37 °C). Při teplotě 30 °C nejvíce degradoval kadaverin v médiu MRS s polovičním množstvím živin při pH 7,0 po 36 hodinách kultivace, a to o 50 %. K výrazným úbytkům kadaverinu docházelo při 30 °C i v médiích MRS při pH 6,8; 7,0 a 7,2 po 36 hodinách kultivace a v médiu MRS s polovičním množstvím živin při hodnotách pH 6,8 a 7,0, o více jak 40 % po 36 hodinách kultivace. Při kultivační teplotě 37 °C nejvíce degradoval kadaverin v médiu MRS při hodnotě pH 6,8 a 7,0 po 12 hodinách kultivace o 20 %. K žádnému úbytku kadaverinu nedocházelo v médiu MRS při pH 6,6 při 30 °C, v médiu MRS při pH 7,2 a MRS s polovičním množstvím živin při pH 7,2 a teplotě 37 °C. Na základě výsledků uvedených na obrázku 11 lze konstatovat, že na degradaci kadaverinu měly výrazný vliv jak teplota, tak i dostupnost živin, což se projevilo v médiu MRS s polovičním množstvím živin. Lze tvrdit, že na degradaci kadaverinu kulturou SM-194 byla vhodná kombinace nižší teploty (30 °C), polovičního množství živin v kultivačním médiu MRS (nezávisle na hodnotě pH) a doba kultivace 36 hodin.

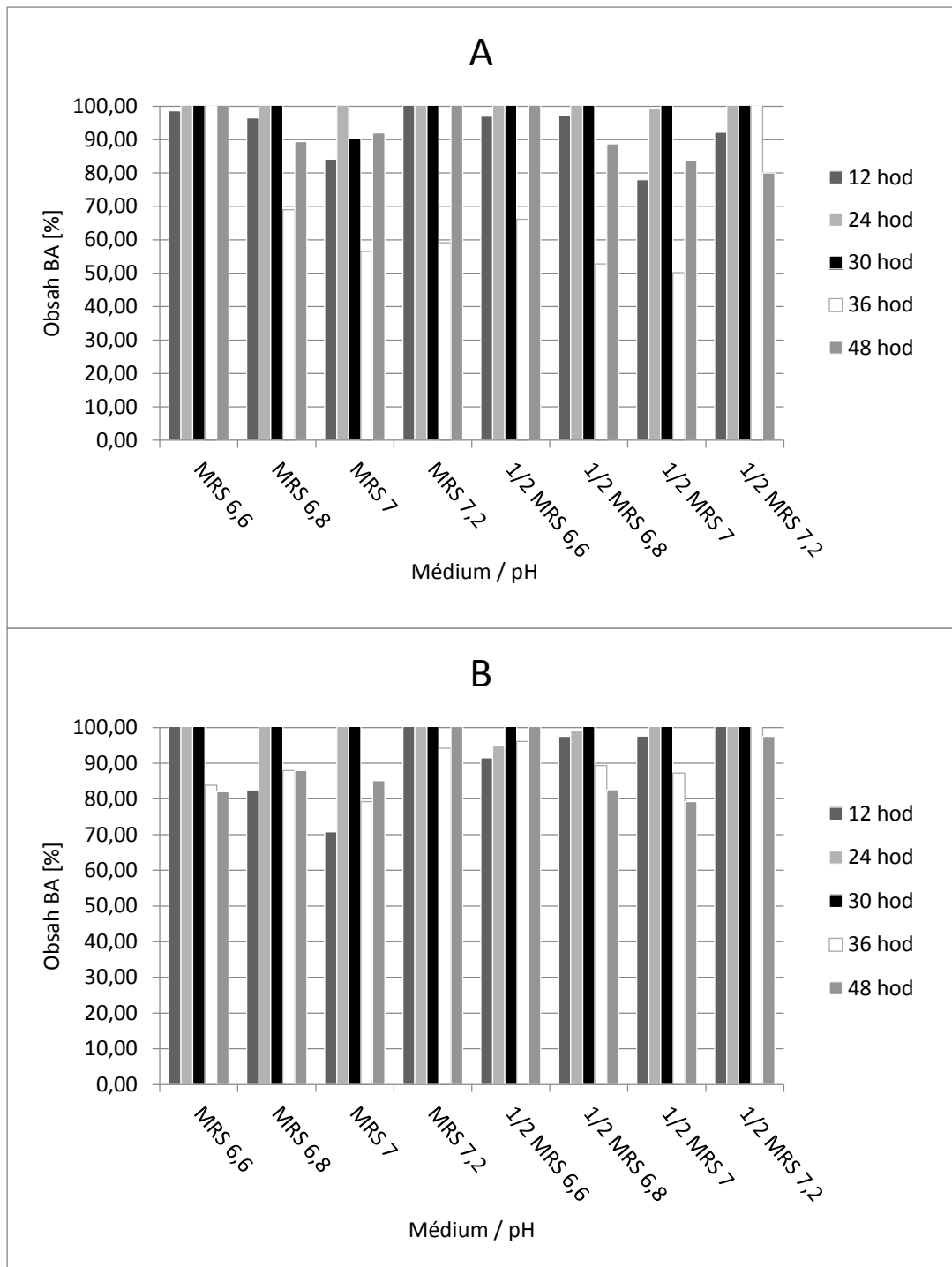


Obrázek 11 - Degradace kadaverinu kulturou SM-194 při 30 °C (A) a 37 °C (B)

#### 11.4.4 Degradace histaminu kulturou SM-194 v závislosti na faktorech prostředí

Obrázek 12 znázorňuje srovnání degradace histaminu kulturou SM-194 v závislosti na faktorech prostředí. Všeobecně lze tvrdit, že při nižší teplotě (30 °C) docházelo k větší degradaci histaminu oproti teplotě vyšší (37 °C). Při teplotě 30 °C nejvíce degradoval histamin v médiu MRS s polovičním množstvím živin při pH 6,8 a 7,0 po 36 hodinách kultivace, a to o 50 %. Při kultivační teplotě 37 °C nejvíce degradoval histamin v médiu MRS při hodnotě pH 7,0 hned po 12 hodinách kultivace, a to o 30 %. Nejméně degradoval histamin při teplotě 30 °C v médiu MRS při pH 6,6 a dále při 37 °C v médiu MRS s polovičním množstvím živin při pH 7,2. Na základě výsledků uvedených na obrázku 12 lze konstatovat, že na degradaci histaminu měly výrazný vliv jak teplota, tak i dostupnost živin, což se projevilo v médiu MRS s polovičním množstvím živin. Lze tvrdit, že na degradaci histaminu kulturou SM-194 byla vhodná kombinace nižší teploty (30 °C), poloviční množství živin v kultivačním médiu MRS (nezávisle na hodnotě pH) a doba kultivace 36 hodin.

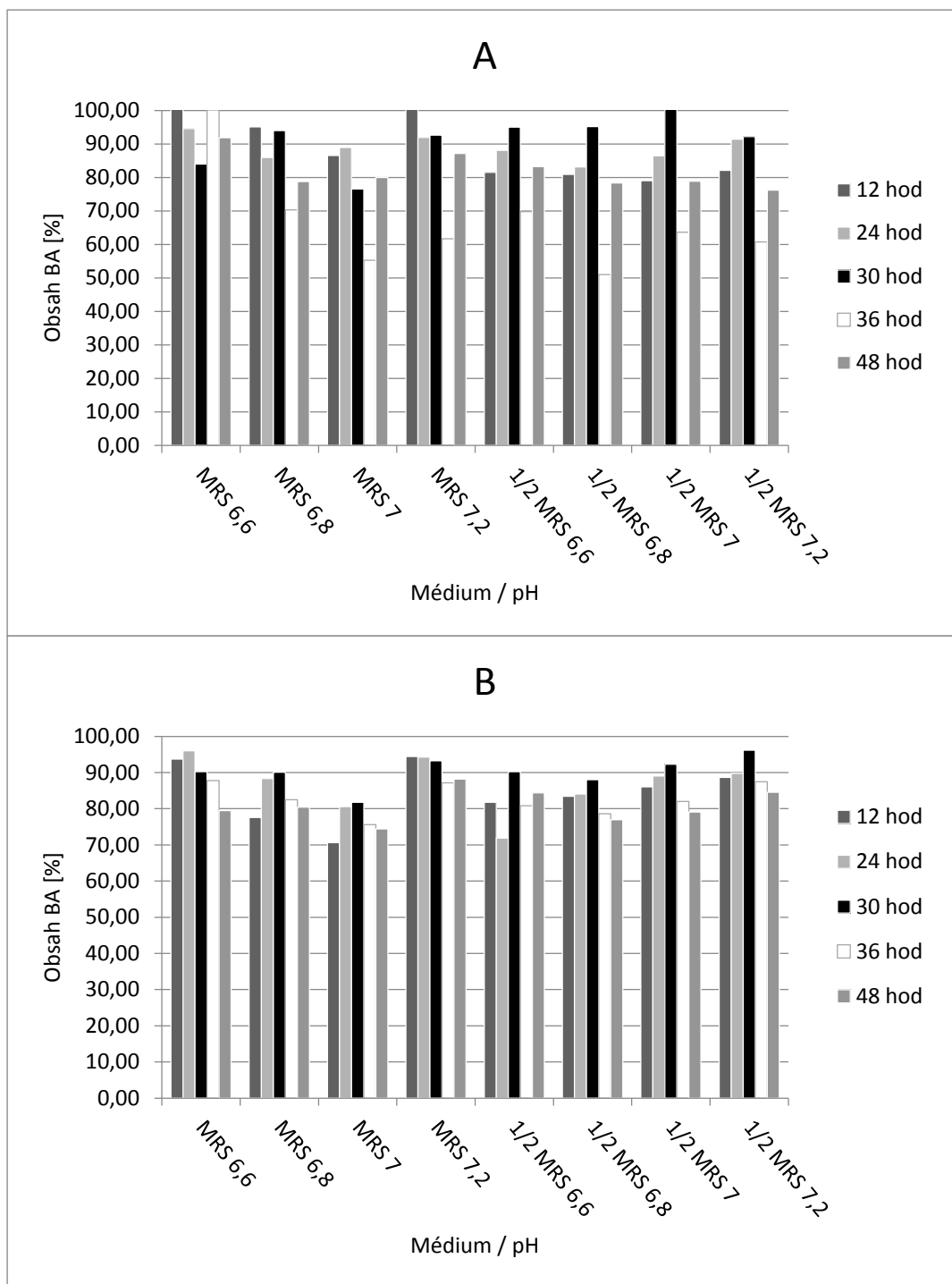




Obrázek 12 - Degradace histaminu kulturou SM-194 při 30 °C (A) a 37 °C (B)

#### 11.4.5 Degradace tyraminu kulturou SM-194 v závislosti na faktorech prostředí

Obrázek 13 znázorňuje srovnání degradace tyraminu kulturou SM-194 v závislosti na faktorech prostředí. Z obrázku je patrné, že nelze jednoznačně určit teplotu, která měla na degradaci tyraminu větší vliv. Při teplotě 30 °C docházelo k největším úbytkům tyraminu po 36 hodinové kultivaci a to v rozmezí od 30 % do 50 %, převážně u média MRS s polovičním množstvím živin. Při teplotě 37 °C byl největší úbytek tyraminu v médiu MRS při pH 7,0 po 12 hodinách kultivace, a to o 30 %. Nejméně degradoval tyramin v médiu MRS při hodnotě pH 6,6 při kultivační teplotě 30 °C. Na základě výsledků uvedených na obrázku 13 lze konstatovat, že na degradaci tyraminu měly výrazný vliv jak teplota, tak i dostupnost živin, což se projevilo v médiu MRS s polovičním množstvím živin.



Obrázek 13 - Degradace tyraminu kulturou SM-194 při 30 °C (A) a 37 °C (B)

## 12 SOUHRNNÁ DISKUZE

Bezpečnost potravin může být ohrožena přítomností nežádoucích mikroorganismů nebo produktů jejich metabolismu, které mohou vykazovat za určitých podmínek toxické účinky. Mezi takové metabolity řadíme biogenní aminy. Vyskytují se v mnohých potravinách, které obsahují určité množství volných aminokyselin nebo proteinů podléhajících mikrobiálnímu rozkladu. V některých potravinách jsou přirozeně přítomny, avšak častěji vznikají činností mikroorganismů, které jsou zodpovědné za dekarboxylaci aminokyselin. Schopnost dekarboxylace aminokyselin byla zjištěna u mikroorganismů disponujících příslušnými enzymy. Mezi potravinářsky nejvýznamnější bakterie s dekarboxylázovou aktivitou lze zařadit bakterie mléčného kvašení a enterobakterie [52].

Biogenní aminy jsou bazické dusíkaté sloučeniny tvořené převážně dekarboxylací aminokyselin nebo aminací a transaminací aldehydů a ketonů [1]. Mohou být tvořeny i degradovány mikrobiálními, rostlinnými a živočišnými metabolismy [2].

Malá množství biogenních aminů jsou v organizmech metabolizována bez vlivu na zdraví jedince. Za normálních podmínek lidské spotřeby potravin či nápojů obsahujících tyto sloučeniny nejsou toxické, protože jsou rychle detoxikovány aktivitou aminových oxidačních enzymů, monoaminoxidáz (MAO) a diaminoxidáz (DAO) [7]. Ovšem vysoká množství, která mohou být přijata potravinami, mohou často způsobit řadu zdravotních problémů, například bolesti hlavy, zvýšení nebo snížení krevního tlaku, nevolnost, zvracení a další. Mohou také způsobovat snižování jakosti a organoleptických vlastností potravin [8, 9].

Startérové kultury způsobující rychlé okyselení masného díla, a které vedou k požadované smyslové kvalitě konečného produktu, se používají pro výrobu fermentovaných masných výrobků. Funkční startérové kultury nabízejí doplňkové funkce ve srovnání s klasickými startérovými kulturami a představují způsob, jak zlepšit a optimalizovat proces fermentace masných výrobků a dosáhnout chutnějších, bezpečnějších a zdravějších produktů. Příklady zahrnují mikroorganismy, které vytvářejí senzory aktivní sloučeniny, bakteriociny nebo jiné antimikrobiální látky a přispívají tak ke stálé barvě masa, mají probiotické vlastnosti nebo postrádají negativní vlastnosti, jako je produkce biogenních aminů a toxických sloučenin [45].

Hygienická kvalita masných surovin a složek je rozhodující pro minimalizaci výskytu mikrobiálních kontaminantů, a proto představuje klíčový bod při kontrole tvorby

biogenních aminů u fermentovaných masných výrobků [14,46,47]. Hygiena je nezbytná, ale ovšem nedostatečná podmínka a jsou obvykle potřebná další technologická opatření zaměřená na kontrolu aminogenní aktivity endogenních mikrobiálních organizmů. Mezi možné technologické strategie je použití startérových kultur, které mají vliv na hromadění biogenních aminů během fermentace masných výrobků [46,47,48,49,50]. Mechanismus startérových kultur je založen na zabránění růstu potenciálních aminogenních endogenních bakterií spolu se svou vlastní neschopností produkovat biogenní aminy [48].

Kmeny LAB a CNS speciálně vybrané jako startérové kultury pro fermentované masné výrobky musí splňovat některá technologická kritéria, což je především přizpůsobení se fermentaci masa, schopnost konkurovat přirozené (endogenní) mikroflóře surovin a neschopnost dekarboxylace aminokyselin [49,50]. Některé kmeny LAB a CNS, které se obvykle používají jako startérové masné kultury, např. *Lactobacillus curvatus* a *Staphylococcus carnosus* byly popsány jako silní producenti biogenních aminů, zejména tyraminu [50].

Fermentační procesy mohou také vést k významné akumulaci diaminů putrescinu a kadaverinu. Přestože obsahy těchto diaminů ve fermentovaných masných výrobcích jsou relativně nízké, v některých případech jsou jejich úrovně extrémně vysoké a překračují až hodnoty tyraminu. Produkce diaminů se obvykle připisuje gram-negativním bakteriím, jako jsou enterobakterie a pseudomonády [48,97,101]. Nicméně, řada publikací ukazuje několik kmenů LAB a CNS se silnou schopností produkovat putrescin nebo kadaverin [95,97,99,102].

Naproti tomu je histamin ve fermentovaných masných výrobcích nalezen méně často. Nicméně v některých vzorcích může dosáhnout poměrně vysokých úrovní, obvykle doprovázených vysokými množstvími jiných biogenních aminů. Tvorba histaminu je omezena na některé kmeny enterobakterií nebo LAB, které se běžně nenacházejí ve vzorku, pokud ovšem nedojde ke kontaminaci [14,97,103,104].

Fenyletylamin a tryptamin mohou být považovány za méně významné aminy vyskytující se ve fermentovaných masných výrobcích. Jejich hromadění je závislé na výskytu vysokého obsahu tyraminu spojeného s některými LAB nebo CNS [105]. Úrovně biogenních aminů u fermentovaných masných výrobků vykazují velké rozdíly mezi různými typy produktů a produktů od stejného výrobce [15].

Kmeny *Lactobacillus sakei* jsou obvykle dobře přizpůsobeny fermentaci masa a jsou konkurenceschopné mezi teplotami 15 a 25 °C, což je teplotní rozsah pro výrobu uzenin v evropských zemích [63,97]. Ve studii, kterou provedli González-Fernández a kol., se mezi všemi testovanými dekarboxyláza-negativními kmeny ukázal *Lactobacillus sakei* K29 jako neúčinnější při redukci produkce aminů, pravděpodobně proto, že tento kmen způsobil rychlý pokles pH během fermentace masných výrobků [127]. Bover-Cid a kol. také popsali, že amin-negativní kmen *Lactobacillus sakei* CTC494 vykazuje silnou schopnost snížit tvorbu biogenních aminů ve španělských klobásách. Avšak když byl tento stejný kmen (*Lactobacillus sakei* CTC494) kombinován se *Staphylococcus carnosus* LHT 2102, *Staphylococcus xylosus* CTC3037 nebo *Staphylococcus xylosus* CTC3050, bylo dosaženo ještě účinnější redukce aminů ve srovnání s účinkem každého použitého kmene [97,126,128].

Cílem první části experimentální práce bylo zjištění míry degradace biogenních aminů pomocí 18 grampozitivních mikrobiálních kultur využívaných při výrobě fermentovaných masných výrobků. Z 18 mikrobiálních kultur byly vybrány ty kultury, které byly schopné nejlépe degradovat pět přidaných biogenních aminů (FEM, PUT, KAD, HIM a TYM) po 48 hodinové kultivaci v kultivačním médiu (Nutrient Broth, MRS a M17 a média s polovičním množstvím živin). Úbytek BA byl srovnáván s kontrolou, což bylo médium s BA bez zaočkovaných mikroorganismů. Jako významní degradéři BA se ukázaly 3 mikrobiální kultury (komerční názvy LHP DRY, SM-194 a BFL-TO3). Dále byly tyto kultury podrobeny identifikační analýze pomocí MALDI-TOF MS. Na identifikaci mikroorganismů pomocí metody MALDI-TOF MS byly vybrány bílé kolonie, které jsou typické pro bakterie mléčného kvašení. Dle výrobce bylo složení mikrobiální kultury LHP DRY pouze *Pediococcus pentosaceus*, ovšem analýza prokázala přítomnost i *Pediococcus acidilactici*. U kultury SM-194 výrobce garantuje složení 5 kmenů, byla ovšem dokázána přítomnost pouze *Pediococcus pentosaceus* a *Staphylococcus carnosus*, který se běžně používá jako startérová kultura v masném průmyslu. U mikrobiální kultury BFL-TO3 nám výrobce neudává složení mikrobiální kultury, ale analýzou byla prokázána přítomnost *Pediococcus pentosaceus* a *Staphylococcus carnosus*. Všechny mikroorganismy, které byly MALDI-TOF MS analýzou identifikovány se využívají jako součást startérových kultur při výrobě fermentovaných masných výrobků. Na druhou stranu analýza MALDI-TOF MS nebyla schopna stoprocentně potvrdit složení udávané výrobcem. Z důvodů dlouhého uchovávání startérových kultur mohlo dojít k usmrcení některých

mikroorganismů, tudíž je analýza nebyla schopna identifikovat anebo naopak mohlo dojít k pomnožení i jiných mikroorganismů, jak žádoucích tak nežádoucích. Použitou metodou není možné od sebe odlišit jednotlivé kmeny náležící do téhož druhu, proto i když výrobce udává složení kultury z 5 kmenů, nemusí toto být v rozporu s uvedenými výsledky z důvodu vyriability identifikovaného druhu. Nicméně pro přesnější složení testovaných kultur by bylo třeba výsledky identifikace pomocí MALD-TOF MS potvrdit dalšími metodami, např. sekvenací genomu izolovaných kmenů mikroorganismů. *Staphylococcus carnosus*, tvoří aroma konverzí aminokyselin a volných mastných kyselin [36,37]. Tvorba aroma však závisí na druhu použité technologie pro daný fermentovaný masný výrobek. Například pro rychle zrající klobásy se zvýšenou inokulací stafylokoků se může zvýšit produkce aldehydů s rozvětveným řetězcem, zatímco u pomalu zrajících klobás je situace složitější. V druhém případě je produkce aroma obzvláště výrazná a zvýšená inokulace podporuje tvorbu methyl-rozvětvených kyselin a siřičitanů, zatímco nízká inokulace tvorbu diacetylu a ethylesterů [38].

Druhý experiment byl zaměřen na srovnání vlivu doby kultivace na degradaci biogenních aminů mikrobiálními kulturami LHP DRY, SM-194 a BFL-TO3, kdy byly odběry prováděny po 24 a 48 hodinách kultivace. Schopnost degradace BA pomocí mikrobiální kultury LHP DRY se zvyšovala s časem. Nejvíce náchylný k degradaci byl putrescin v médiu MRS po 24 hodinách kultivace. Po 48 hodinové kultivaci byl náchylný na degradaci opět putrescin, ovšem v médiu Nutrient Broth s polovičním množstvím živin. Schopnost degradace BA pomocí mikrobiální kultury SM-194 se rovněž zvyšovala s časem. Nejvíce náchylný k degradaci byl putrescin v médiu M17 po 24 hodinách kultivace. Po 48 hodinové kultivaci byl náchylný na degradaci opět putrescin, ovšem v médiu Nutrient Broth. Schopnost degradace BA pomocí mikrobiální kultury BFL-TO3 se zvyšovala s časem. Nejvíce náchylný k degradaci byl putrescin v médiu M17 s polovičním množstvím živin, po 24 hodinách kultivace. Po 48 hodinové kultivaci byl náchylný na degradaci opět putrescin, ovšem v médiu MRS. Souhrnně lze tvrdit, že schopnost degradace BA testovanými mikrobiálními kulturami se zvyšovala s prodlužující se dobou kultivace. Nejvíce náchylný na degradaci byl putrescin po 24 i 48 hodinové kultivaci, ale nebyl zde jednoznačně prokázán vliv kultivačního média. Tudíž je výhodné využívat kratší dobu kultivace.

Třetí experiment byl zaměřen na sledování vlivu vnějších faktorů na degradaci biogenních aminů mikrobiálními kulturami. Ze získaných výsledků byly vybrány 2 mikrobiální kultury LHP DRY a SM-194, u kterých byl dále sledován vliv teploty (30 °C a 37 °C), času (12, 24, 30, 36 a 48 hodin), pH (6,6; 6,8; 7,0 a 7,2) a kultivačního média (MRS a MRS 1/2), na degradaci biogenních aminů. Optimální podmínky degradace BA kulturami LHP DRY a SM-194 jsou uvedeny v následující tabulce (tab. 9).

Tabulka 9 – Optimální podmínky degradace biogenních aminů kulturami LHP DRY a SM-194

	Mikrobiální kultura									
	LHP DRY					SM-194				
	Teplota [ °C]	pH	Kultivační médium	Doba kultivace [hod]	Obsah BA [%]	Teplota [ °C]	pH	Kultivační médium	Doba kultivace [hod]	Obsah BA [%]
<b>PUT</b>	30	7,2	MRS	30	70	30	7,0	MRS 1/2	36	62
<b>FEM</b>	30	6,6	MRS	12	20	30	7,0	MRS	36	30
<b>KAD</b>	37	7,2	MRS	12	60	30	7,0	MRS 1/2	36	50
<b>HIM</b>	30	7,2	MRS	30	45	30	7,0	MRS 1/2	36	50
<b>TYR</b>	37	7,2	MRS	12	18	30	-	MRS 1/2	36	30-50

Z výsledků je patrné, že u kultury LHP DRY docházelo k největším úbytkům biogenních aminů v médiu MRS při pH 7,2 po 12 či 30 hodinách kultivace při kultivační teplotě 30 °C. Zbytkový obsah BA se pohyboval v rozmezí od 18 % do 70 %. U kultury SM-194 docházelo k největším úbytkům BA v médiu MRS s polovičním množstvím živin při neutrálním pH, po 36 hodinách kultivace a teplotě 30 °C. Obsah BA v kultivačním médiu se pohyboval v rozmezí od 30 % do 62 %. Lze tvrdit, že u mikrobiální kultury SM-194 probíhala degradace BA lépe při nižší teplotě, pH a v médiu s polovičním množstvím živin, ale byla potřeba delší doba kultivace, tudíž je pro nás výhodné použití této startérové kultury z důvodu nižších nároků na kultivaci. U výše zmíněné kultury se rovněž potvrdil předpoklad, že v médiu s nižším obsahem živin bude degradace probíhat rychleji, protože mikroorganismy budou nuceny využívat jako zdroj uhlíku a dusíku právě biogenní aminy. Delší doba odbourávání biogenních aminů také nemusí být významnější překážkou,



protože pokud by byla kultura aplikována při výrobě fermentovaného masného výrobku, tak zrání probíhá při teplotách mezi 18 – 25 °C (dle typu výrobku) po dobu několika dnů. Pokud došlo ke zvýšení pH kultivačního média u kultury LHP DRY, bylo pozorováno snížení doby kultivace potřebné k degradaci BA. Také lze tvrdit, že obě kultury nejlépe degradovaly putrescin. Naopak u kultury LHP DRY docházelo k nejmenším či žádným úbytkům BA v MRS při pH 6,8 a v MRS s polovičním množstvím živin při pH 6,6 a 7,2 (nezávisle na teplotě kultivace). Po 48 hodinové kultivaci již nedocházelo k degradaci žádného z biogenních aminů u obou mikrobiálních kultur, pravděpodobně z důvodu vyčerpání živin kultivačního média a zpomalení nebo zastavení látkové výměny u testované kultury. Nejdolnějším BA proti degradaci se ukázal tyramin. Ani jedna z testovaných mikrobiálních kultur jej nebyla schopna ve větším množství degradovat, pravděpodobně z důvodu, že nebyly nalezeny optimální podmínky degradace tohoto biogenního aminu, což může být zapříčiněno např. strukturou molekuly tohoto aminu (sloučenina s aromatickým kruhem). Tyramin je obvykle nejčastěji se vyskytující biogenní amin nacházející se ve fermentovaných masných výrobcích. Pokud jde o průměrné hodnoty, bylo zjištěno, že fermentované klobásy vykazují nejvyšší obsah tyraminu mezi fermentovanými produkty [49]. Ve fermentovaných masných výrobcích je tyramin produkován zejména bakteriemi mléčného kvašení (LAB, včetně laktobacilů a enterokoků) a méně pak koaguláza-negativními stafylokoky (CNS) [95,96,97,98,99,100]. Latorre-Moratalla a kol. uvádějí, že 48 % LAB a 13 % stafylokoků izolovaných ze spontánně fermentovaných klobás jsou schopny dekarboxylace jedné nebo více aminokyselin [99].

Možnosti minimalizace hromadění biogenních aminů mohou zahrnovat použití neprodukcujících anebo degradujících mikroorganismů a použití enzymů k oxidaci biogenních aminů. Jako další metoda, která snižuje možnost výskytu biogenních aminů v potravinách, může být použití vhodných startérových kultur [14].

Jako startérové kultury lze využít bakterie mléčného kvašení a koaguláza-negativní stafylokoky, jež musí splňovat některá technologická kritéria, což je především přizpůsobení se fermentaci masa, schopnost konkurovat přirozené (endogenní) mikroflóře surovin a neschopnost dekarboxylace aminokyselin [45].

Schopnost degradace biogenních aminů byla v této práci studována v kultivačních médiích, která jsou pro testované bakterie optimálním prostředím. Proto se mohou odlišovat od podmínek fermentovaných masných výrobků, kde se tyto kultury, schopné degradace aminů, mohou chovat jinak vlivem odlišného prostředí. Výsledky této práce i přes to

mohou přispět ke studiu schopnosti degradace biogenních aminů testovanými kulturami, nicméně je bude třeba ověřit v potravinových matricích.

## ZÁVĚR

Cílem diplomové práce bylo otestovat gram-pozitivní mikrobiální kultury používané při výrobě fermentovaných masných výrobků a hledání takových kultur, které jsou schopny degradovat biogenní aminy v závislosti na dostupnosti živin.

Cílem prvního experimentu bylo ověření schopnosti degradace biogenních aminů u 18 gram-pozitivních mikrobiálních kultur používaných v masném průmyslu po 48 hodinách kultivace. Na základě získaných výsledků lze tvrdit, že:

- významnými degradéry biogenních aminů se ukázaly 3 mikrobiální kultury s komerčními názvy LHP DRY, SM-194 a BFL-TO3.

Druhý experiment byl zaměřen na srovnání úbytku biogenních aminů v kultivačním médiu u mikrobiálních kultur LHP DRY, SM-194 a BFL-TO3 po 24 a 48 hodinách kultivace. Na základě uvedených výsledků lze tvrdit, že:

- schopnost degradace testovaných mikrobiálních kultur se zvyšovala s prodlužující se dobou kultivace,
- nejvíce náchylný na degradaci testovanými kulturami byl putrescin po 24 i 48 hodinách kultivace,
- nebyl zde jednoznačně prokázán vliv složení kultivačního média ani polovičního množství živin.

Třetí experiment byl zaměřen na sledování vlivu vnějších faktorů na degradaci biogenních aminů u dvou mikrobiálních kultur LHP DRY a SM-194, u kterých byl sledován vliv teploty (30 °C a 37 °C), času (12, 24, 30, 36 a 48 hodin), pH (6,6; 6,8; 7,0 a 7,2) a dostupnosti živin v kultivačním médiu (MRS a MRS 1/2). Na základě uvedených výsledků lze tvrdit, že:

- u kultury LHP DRY nebyl jednoznačně prokázán vliv kultivační teploty ani polovičního množství živin na degradaci biogenních aminů,
- největší schopnost degradace všech biogenních aminů kulturou LHP DRY byla v médiu MRS při pH 7,2 po 12 hodinách kultivace (nezávisle na kultivační teplotě), a to o 20 % až 70 %,
- největší schopnost degradace všech biogenních aminů kulturou SM-194 byla zjištěna v médiu MRS s polovičním množstvím živin při pH 7,0 a 7,2, a to o 20 % až 60 %,

- při teplotě 30 °C docházelo k degradaci biogenních aminů kulturou SM-194 většinou až po 36 hodinách kultivace,
- při teplotě 37 °C docházelo k degradaci biogenních aminů kulturou SM-194 již po 12 hodinách kultivace,
- u kultury SM-194 byl jednoznačně prokázán vliv kultivační teploty i polovičního množství živin na degradaci biogenních aminů.

**SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY**

- [1] Ascar, A. and Treptow, H. (1988). Biogene Amine in Lebensmitteln. *Molecular Nutrition and Food Research* 32, 420.
- [2] Greif, G., Greifová, M., and Drdák, M. (1997). Stanovenie biogénnych amínov v potravinách živočíšneho pôvodu metódou HPLC. *Potravinářské Vědy* 15, 119-129.
- [3] Křížek, M. and Kalač, P. (1998). Concentrations of seven biogenic amines in sauerkraut. *Food Chemistry* 67, 275-280.
- [4] Silla-Santos, H. (1998). Amino acid decarboxylase capability of microorganisms isolated in Spanish fermented meat products. *International Journal of Food Microbiology* 39, 227-230.
- [5] Halász, A., Baráth, A., Simon-Sakradi, L., Holzapfel, W. (1994). Biogenic amines and their production by microorganisms in food. *Trends in Food Science and Technology* 5, 49.
- [6] Bardócz, A., (1995). Polyamines in food and their consequences for food quality and human health. *Trends in Food Science and Technology* 6, 341-346.
- [7] Torriani, S., Suzzi, G. (2015). Biogenic amines in foods. *Frontiers in Microbiology* 6, 472.
- [8] Santon, M. S. (1996). Biogenic amines: their importance in foods. *International Journal of Food Microbiology*. 29 (2-3): 213-231.
- [9] Alvarez, M. A., Moreno-Arribas M. V. (2014). The problem of biogenic amines in fermented foods and the use of potential biogenic amine-degrading microorganisms as a solution. *Food Science and Technology*. 146-155. ISSN: 00236438
- [10] Dabrowski, V. M., Sikorski I, Z. E. (2004). *Toxins in Food*. 1. London: CRC Press. ISBN 978-020-3502-358.
- [11] Smělá, D., Pechová, P., Komprda, T., Klejbus, B., Kubáň, V. (2004). Chromatografické stanovení biogenních aminů v trvanlivých salámech během fermentace a skladování, *Chemické listy* 98, 432-437.
- [12] Velíšek, J., Hajšlová, J. *Chemie potravin 2. Rozš. a přepac.* 3. vyd. Tábor: OSSIS, 2009. ISBN 978-80-86659-16-9.

- [13] Önal, A. (2006). Current analytical methods for determination of biogenic amines in foods. *Food Chemistry*. 103: 1475-1486. ISSN: 03088146
- [14] Maijala, R. L. (1993). The effect of gdl-induced pH decrease on the formation of biogenic amines in meat. *Journal of Food Protection* 56, 129.
- [15] Maijala, R. L. (1995). Formation of biogenic amines during ripening of dry sausages affected by starter culture and thawing time of raw materials. *Journal of Food Science* 60, 1190.
- [16] Beljaars, P. R., J. (1998). Liquid chromatographic determination of histamine in fish, sauerkraut, and wine: Interlaboratory study. *Journal of AOAC International* 81, 998.
- [17] Wei, C. I. (2010). Effects of organic acids on the pasting properties of rice flour from waxy and nonwaxy varieties. *Journal of Food Quality* 33, 137-154.
- [18] Cobo, M. and Silva, M., J. (1999). Continuous solid-phase extraction and dansylation of low-molecular-mass amines coupled on-line with liquid chromatography and peroxyoxalate chemiluminescence-based detection. *Journal of Chromatography A* 848, 115.
- [19] Seiler, N., J. (1986). Polyamines. *Journal of Chromatography* 379, 176.
- [20] Bockhardt, A., Krause, I., and Klostermeyer, K., Z. (1996). Determination of biogenic amines by RP HPLC of dansyl derivatives. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und-Forschung* 203, 70.
- [21] Beljaars, P. R., J. (1998). Liquid chromatographic determination of histamine in fish, sauerkraut, and wine: Interlaboratory study. *Journal of AOAC International* 81, 998.
- [22] Shalaby, A. R. (1995). Multidetector, semiquantitative method for determining biogenic amines in food. *Food Chemistry* 52, 372.
- [23] Shalaby, A. R. (1994). Separation, identification and estimation of biogenic amines in foods by thin-layer chromatography. *Food Chemistry* 49, 310.
- [24] Karovičová, J., Kohajdová, Z. (2002). Using capillary isotachopheresis for determination of biogenic amines and D-isocitric acid in food product. *Nahrung-Food* 47, 188-190.
- [25] Straub, B. (1993). Extraction and determination of biogenic amines in fermented sausages and other meat-product using reversed-phase-HPLC. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und-Forschung* 197, 232.

- [26] Molly, K., Demeyer, D., Civera, T., Verplaetse, A. (1996). Lipolysis in a Belgian sausage: relative importance of endogenous and bacterial enzymes. *Meat Science* 43, 235 – 244.
- [27] Demeyer, D., Raemaekers, M., Rizzo, A., Holck, A., De Smedt, A., ten Brink, B., Hagen, B., Montel, C., Zanardi, E., Murbrekk, E., Leroy, F., Vandendriessche, F., Lorentsen, K., Venema, K., Sunesen, L., Stahnke, L., De Vuyst, L., Talon, R., Chizzolini, R., Eerola, S., (2000). Control of bioflavour and safety in fermented sausages: first results of a European project. *Food Research International* 33, 171 – 180.
- [28] Papamanoli, E., Tzanetakis, N., Litopoulou-Tzanetaki, E., Kotzekidou, P. (2003). Characterization of lactic acid bacteria isolated from a Greek dry fermented sausage in respect of their technological and probiotic properties. *Meat Science* 65, 859 – 867.
- [29] Larrouture, C., Ardaillon, V., Pépin, M., Montel, M. C. (2000). Ability of meat starter cultures to catabolize leucine and evaluation of the degradation products by using an HPLC method. *Food Microbiology* 17, 563 – 570.
- [30] Lopes, M.D.S., Cunha, A.E., Clemente, J.J., Carrondo, M.J.T., Crespo, M.T.B. (1999). Influence of environmental factors on lipase production by *Lactobacillus plantarum*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 51, 249 – 254.
- [31] Sarantinopoulos, P., Leroy, F., Leontopoulou, E., Georgalaki, M.D., Kalantzopoulos, G., Tsakalidou, E., De Vuyst, L. (2002). Bacteriocin production by *Enterococcus faecium* FAIR-E 198 in view of its application as adjunct starter in Greek Feta cheese making. *International Journal of Food Microbiology* 72, 125 – 136.
- [32] Centeno, J.A., Menéndez, S., Rodríguez-Otero, J.L. (1996). Main microbial flora present as natural starters in Cebreiro raw cow's-milk cheese (Northwest Spain). *International Journal of Food Microbiology* 33, 307 – 313.
- [33] Giraffa, G. (2003). Functionality of enterococci in dairy products. *International Journal of Food Microbiology* 88, 215 – 222.
- [34] Franz, C.M.A.P., Stiles, M.E., Schleifer, K.H., Holzapfel, W.H. (2003). Enterococci in foods a conundrum for food safety. *International Journal of Food Microbiology* 88, 105 – 122.

- [35] Herranz, B., Fernández, M., Hierro, E., Bruna, J.M., Ordóñez, J.A., de la Hoz, L. (2004). Use of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* NCDO 763 and a ketoglutarate to improve the sensory quality of dry fermented sausages. *Meat Science* 66, 151 – 163.
- [36] Stahnke, L.H., Holck, A., Jensen, A., Nilsen, A., Zanardi, E. (2002). Maturity acceleration of Italian dried sausage by *Staphylococcus carnosus* relationship between maturity and flavor compounds. *Journal of Food Science* 67, 1914 – 1921.
- [37] Olesen, P.T., Stahnke, L.H. (2004). The influence of environmental parameters on the catabolism of branched-chain amino acids by *Staphylococcus xylosus* and *Staphylococcus carnosus*. *Food Microbiology* 20, 621 – 629.
- [38] Tjener, K., Stahnke, L.H., Andersen, L., Martinussen, J. (2004b). Growth and production of volatiles by *Staphylococcus carnosus* in dry sausages: influence of inoculation level and ripening time. *Meat Science* 67, 447 – 452.
- [39] Samelis, J., Metaxopoulos, J., Vlassi, M., Pappa, A. (1998). Stability and safety of traditional Greek salami a microbiological ecology study. *International Journal of Food Microbiology* 44, 69 – 82.
- [40] Montel, M.C., Reitz, J., Talon, R., Berdagué, R., Rousset-Akrim, J.L. (1996). Biochemical activities of *Micrococcaceae* and their effects on the aromatic profiles and odours of a dry sausage model. *Food Microbiology* 13, 489 – 499.
- [41] Bruna, J.M., Hierro, E.M., de la Hoz, L., Mottram, D.S., Fernández, M., Ordóñez, J.A., (2003). Changes in selected biochemical and sensory parameters as affected by the superficial inoculation of *Penicillium camemberti* on dry fermented sausages. *Meat Science* 85, 111 – 125.
- [42] Sunesen, L.O., Stahnke, L.H. (2003). Mould starter cultures for dry sausages selection, application and effects. *Meat Science* 65, 935 – 948.
- [43] Benito, M.J., Rodríguez, M., Martín, A., Aranda, E., Córdoba, J.J. (2004). Effect of the fungal protease EPg222 on the sensory characteristics of dry fermented sausage “salchichon” ripened with commercial starter cultures. *Meat Science* 67, 497 – 505.
- [44] Durá, M.A., Flores, M., Toldrá, F. (2004). Effect of *Debaryomyces* spp. on the proteolysis of dry-fermented sausages. *Meat Science* 68, 319 – 328.
- [45] De Vuyst, L., Vandamme, E.J. (1994). *Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria: Microbiology, Genetics and Applications*. Blackie Academic and Professional, London.



- [46] Bover-Cid, S., Izquierdo-Pulido, M., and Vidal-Carou, M. C. (2000a). Influence of hygienic quality of raw materials on biogenic amine production during ripening and storage of dry fermented sausages. *Journal of Food Protection* 63, 1544–1550.
- [47] Naila, A., Flint, S., Fletcher, G., Bremer, P., and Meerdink, G. (2010). Control of biogenic amines in food-existing and emerging approaches. *Journal of Food Science* 75, 139–150.
- [48] Suzzi, G., and Gardini, F. (2003). Biogenic amines in dry fermented sausages: a review. *International Journal of Food Microbiology* 88, 41–54.
- [49] EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ). (2011). Scientific opinion on risk based control of biogenic amine formation in fermented foods. *EFSA J.* 9, 2393.
- [50] Talon, R., and Leroy, S. (2011). Diversity and safety hazards of bacteria involved in meat fermentation. *Meat Science* 89, 303–309.
- [51] Lonvaud-Funel, A. (2001). Biogenic amines in wines: role of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Letters* 199, 9–13.
- [52] Aymerich, T., Martín, B., Garriga, M., Vidal-Carou, M. C., Bover-Cid, S., and Hugas, M. (2006). Safety properties and molecular strain typing of lactic acid bacteria from slightly fermented sausages. *Journal of Applied Microbiology* 100, 40–49.
- [53] Latorre-Moratalla, M. L., Bover-Cid, S., Talon, R., Garriga, M., Aymerich, T., Zanardi, E., Ianieri, A., Fraqueza, M. J., Elias, M., Drosinos, E. H., Lauková, A., and Vidal-Carou, M. C. (2010a). Distribution of aminogenic activity among potential autochthonous starter cultures. *Journal of Food Protection* 73, 524–525.
- [54] Linares, D. M., Martín, M. C., Ladero, V., Álvarez, M. A., and Fernández, M. (2011). Biogenic amines in dairy products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 51, 691–703.
- [55] Marcobal, A., de las Rivas, B., and Muñoz, R. (2006). Methods for the detection of bacteria producing biogenic amines on foods: a survey. *Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit* 1, 187–196.
- [56] Lücke, F.-K. (2000). Utilization of microbes to process and preserve meat. *Meat Science* 56, 105 – 115.

- [58] Cintas, L.M., Casaus, M.P., Herranz, C., Nes, I.F., Hernández, P.E. (2001). Review: bacteriocins of lactic acid bacteria. *Food Science and Technology International* 7, 281 – 305
- [59] Cleveland, J., Montville, T.J., Nes, I.F., Chikindas, M.L. (2001). Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *International Journal of Food Microbiology* 71, 1 – 20.
- [60] Eijsink, V.G.H., Axelsson, L., Diep, D.B., Havarstein, L.S., Holo, H., Nes, I.F. (2002). Production of class II bacteriocins by lactic acid bacteria; an example of biological warfare and communication. *Antonie van Leeuwenhoek* 81, 639 – 654.
- [61] Ennahar, S., Sonomoto, K., Ishizaki, A. (1999). Class IIa bacteriocins from lactic acid bacteria: antibacterial activity and food preservation. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 87, 705 – 716.
- [62] Stiles, M.E., Hastings, J.W. (1991). Bacteriocin production by lactic acid bacteria: potential for use in meat preservation. *Trends in Food Science & Technology* 2, 247 – 251.
- [63] Hugas, M., Monfort, J.M. (1997). Bacterial starter cultures for meat fermentation. *Food Chemistry* 59, 547 – 554.
- [64] De Martinis, E.C.P., Alves, V.F., Franco, B.D.G.M. (2002). Fundamentals and perspectives for the use of bacteriocins produced by lactic acid bacteria in meat products. *Food Reviews International* 18, 191 – 208.
- [65] Sobrino, O.J., Rodríguez, J.M., Moreira, W.L., Fernández, M.F., Sanz, B., Hernández, P.E. (1991). Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from dry fermented sausages. *International Journal of Food Microbiology* 13, 1 – 10.
- [66] Tichaczek, P.S., Nissen-Meyer, J., Nes, I.F., Vogel, R.F., Hammes, W.P. (1992). Characterization of the bacteriocins curvacin A from *Lactobacillus curvatus* LTH 1174 and sakacin P from *L. sake* LTH 673. *Systematic and Applied Microbiology* 15, 460 – 468.
- [67] Garriga, M., Hugas, M., Aymerich, T., Monfort, J.M. (1993). Bacteriocinogenic activity of lactobacilli from fermented sausages. *Journal of Applied Bacteriology* 75, 142 – 148.
- [68] Aymerich, M.T., Garriga, M., Monfort, J.M., Nes, I., Hugas, M. (2000b). Bacteriocin-producing lactobacilli in Spanish-style fermented sausages: characterization of bacteriocins. *Food Microbiology* 17, 33 – 45

- [69] Benoit, V., Mathis, R., Lefebvre, G. (1994). Characterization of brevicin 27, a bacteriocin synthesized by *Lactobacillus brevis* SB27. *Current Microbiology* 28, 53 – 61.
- [70] Vignolo, G.M., Suriani, F., de Ruiz Holgado, A.P., Oliver, G. (1993). Antibacterial activity of *Lactobacillus* strains isolated from dry fermented sausage. *Journal of Applied Bacteriology* 75, 344 – 349.
- [71] Schillinger, U., Kaya, M., Lücke, F.-K., (1991). Behaviour of *Listeria monocytogenes* in meat and its control by a bacteriocin-producing strain of *Lactobacillus sake*. *Journal of Applied Bacteriology* 70, 473 – 478.
- [72] Berry, E.D., Liewen, M.B., Mandigo, R.W., Hutkins, R.W. (1990). Inhibition of *Listeria monocytogenes* by bacteriocin-producing *Pediococcus* during the manufacture of fermented semidry sausage. *Journal of Food Protection* 53, 194 – 197.
- [73] Franz, C.M.A.P., Holzzapfel, W.H., Stiles, M.E. (1999). Enterococci at the crossroads of food safety? *International Journal of Food Microbiology* 47, 1 – 24.
- [74] De Vuyst, L., Vandamme, E.J. (1994). *Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria: Microbiology, Genetics and Applications*. Blackie Academic and Professional, London.
- [75] Giraffa, G., Picchioni, N., Neviani, E., Carminati, D. (1995). Production and stability of an *Enterococcus faecium* bacteriocin during Taleggio cheese making and ripening. *Food Microbiology* 12, 301 – 307.
- [76] Rodríguez, J.M., Cintas, L.M., Casaus, P., Dodd, H.M., Hernández, P.E., Gasson, M.J. (1995). Isolation of nisin-producing *Lactococcus lactis* strains from dry fermented sausages. *Journal of Applied Bacteriology* 78, 109 – 115.
- [77] Mataragas, M., Metaxopoulos, J., Galiotou, M., Drosinos, E.H. (2003). Influence of pH and temperature on growth and bacteriocin production by *Leuconostoc mesenteroides* L124 and *Lactobacillus curvatus* L442. *Meat Science* 64, 265 – 271.
- [78] Coffey, A., Ryan, M., Ross, R.P., Hill, C., Arendt, E., Schwarz, G. (1998). Use of a broad-host-range bacteriocin-producing *Lactococcus lactis* transconjugant as an alternative starter for salami manufacture. *International Journal of Food Microbiology* 43, 231 – 235.
- [79] Schillinger, U., Kaya, M., Lücke, F.-K. (1991). Behaviour of *Listeria monocytogenes* in meat and its control by a bacteriocin-producing strain of *Lactobacillus sake*. *Journal of Applied Bacteriology* 70, 473 – 478.

- [80] Knorr, D. (1998). Technology aspects related to microorganisms in functional foods. *Trends in Food Science & Technology* 9, 295 – 306.
- [81] Leroy, F., De Vuyst, L. (1999a). Temperature and pH conditions that prevail during fermentation of sausages are optimal for production of the antilisterial bacteriocin sakacin K. *Applied and Environmental Microbiology* 65, 974 – 981
- [82] Messens, W., Verluyten, J., Leroy, F., De Vuyst, L. (2003). Modelling growth and bacteriocin production by *Lactobacillus curvatus* LTH 1174 in response to temperature and pH values used for European sausage fermentation processes. *International Journal of Food Microbiology* 81, 41 – 52.
- [83] Barrière, C., Centeno, D., Lebert, A., Leroy-Se'trin, S., Berdagué, J.L., Talon, R. (2001a). Roles of superoxide dismutase and catalase of *Staphylococcus xylosum* in the inhibition of linoleic acid oxidation. *FEMS Microbiology Letters* 201, 181 – 185.
- [84] Campbell-Platt, G., Cook, P.E. (1995). *Fermented Meats*. Blackie Academic and Professional, London.
- [85] Moller, J.K.S., Jensen, J.S., Skibsted, L.H., Knochel, S. (2003). Microbial formation of nitrite-cured pigment, nitrosylmyoglobin, from metmyoglobin in model systems and smoked fermented sausages by *Lactobacillus fermentum* strains and a commercial starter culture. *European Food Research and Technology* 216, 463 – 469.
- [86] Blom, H., Hagen, B.F., Pedersen, B.O., Holck, A.L., Axelsson, L., Naes, H. (1996). Accelerated production of dry fermented sausage. *Meat Science* 43, 229 – 242.
- [87] Zambonelli, C., Chiavari, C., Benevelli, M., Coloretti, F. (2002). Effects of lactic acid bacteria autolysis on sensorial characteristics of fermented foods. *Food Technology and Biotechnology* 40, 347 – 351.
- [88] Jiménez-Colmenero, F., Carballo, J., Cofrades, S. (2001). Healthier meat and meat products: their role as functional foods. *Meat Science* 59, 5 – 13.
- [89] Holzapfel, W. H., Haberer, P., Snel, J., Schillinger, U., Huis in't Veld, J. H. J. (1998). Overview of gut flora and probiotics. *International Journal of Food Microbiology* 41, 85 – 101.
- [90] Franz, C.M.A.P., Stiles, M.E., Schleifer, K.H., Holzapfel, W.H. (2003). Enterococci in foods a conundrum for food safety. *International Journal of Food Microbiology* 88, 105 – 122.

- [91] Hammes, W. P., Hertel, C. (1998). New developments in meat starter cultures. *Meat Science* 49 (Suppl. 1), 125 – 138.
- [92] Arihara, K., Ota, H., Itoh, M., Kondo, Y., Sameshima, T., Yamanaka, H., Akimoto, M., Kanai, S., Miki, T. (1998). *Lactobacillus acidophilus* group lactic acid bacteria applied to meat fermentation. *Journal of Food Science* 63, 544 – 547.
- [93] Sameshima, T., Magome, C., Takeshita, K., Arihara, K., Itoh, M., Kondo, Y., (1998). Effect of intestinal *Lactobacillus* starter cultures on the behaviour of *Staphylococcus aureus* in fermented sausage. *International Journal of Food Microbiology* 41, 1 – 7.
- [94] Spano, G., Russo, P., Lonvaud-Funel, A., Lucas, P., Alexandre, H., Grandvalet, C., Coton, E., Coton, M., Barnavon, L., Bach, B., Rattray, F., Bunte, A., Magni, C., Ladero, V., Alvarez, M., Fernández, M., Lopez, P., de Palencia, P. F., Corbi, A., Trip, H., and Lolkema, J. S. (2010). Biogenic amine in fermented foods. *European Journal of Clinical Nutrition* 64, 95–100.
- [95] Straub, B. W., Tichaczek, P. S., Kicherer, M., Schilcher, S. M., and Hammes, W. P. (1994). Formation of tyramine by *Lactobacillus curvatus* lth-972. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und-Forschung* 199, 9–12.
- [96] Masson, F., Talon, R., and Montel, M. (1996). Histamine and tyramine production by bacteria from meat products. *International Journal of Food Microbiology* 32, 199–207.
- [97] Bover-Cid, S., Izquierdo-Pulido, M., and Vidal-Carou, M. C. (2001b). Effectiveness of a *Lactobacillus sakei* starter culture in the reduction of biogenic amines accumulation as a function of the raw material quality. *Journal of Food Protection* 64, 367–373.
- [98] Aymerich, T., Martín, B., Garriga, M., Vidal-Carou, M. C., Bover-Cid, S., and Hugas, M. (2006). Safety properties and molecular strain typing of lactic acid bacteria from slightly fermented sausages. *Journal of Applied Microbiology* 100, 40–49.
- [99] Latorre-Moratalla, M. L., Bover-Cid, S., Talon, R., Garriga, M., Aymerich, T., Zanardi, E., Ianieri, A., Fraqueza, M. J., Elias, M., Drosinos, E. H., Lauková, A., and Vidal-Carou, M. C. (2010b). Strategies to reduce biogenic amine accumulation in traditional sausage manufacturing. *LWT - Food Science and Technology* 43, 20–25.
- [100] Talon, R., Leroy, S., and Lebert, I. (2007). Microbial ecosystems of traditional fermented meat products: the importance of indigenous starters. *Meat Science* 77, 55–62.

- [101] Durlu-Özkaya, F., Ayhan, K., and Vural, N. (2001). Biogenic amines produced by Enterobacteriaceae isolated from meat products. *Meat Science* 58, 163–166.
- [102] Martín, B., Garriga, M., Hugas, M., Bover-Cid, S., Veciana-Nogués, M. T., and Aymerich, T. (2006). Molecular, technological and safety characterization of Gram-positive catalase-positive cocci from slightly fermented sausages. *International Journal of Food Microbiology* 107, 148–158.
- [103] Roig-Sagués, A. X., Hernández-Herrero, M., Rodríguez-Jerez, J. J., López-Sabater, E. I., and Mora-Ventura, M. T. (1997). Occurrence of tyramine producing microorganisms in “salchichón” and tyramine production in sausages inoculated with a tyramine producing strain of *Lactobacillus brevis*. *Journal of Food Safety* 17, 13–22.
- [104] Silla-Santos, H. (1998). Amino acid decarboxylase capability of microorganisms isolated in Spanish fermented meat products. *International Journal of Food Microbiology* 39, 227–230.
- [105] Vidal-Carou, M. C., Latorre-Moratalla, M. L., Veciana-Nogués, M. T., and Bover-Cid, S. (2007). “Biogenic amines: risks and control,” in *Handbook of Fermented Meat and Poultry*, eds F. Todrà, Y. H. Hui, I. Astiasarán, Wai-Kit Nip, J. G. Sebranek, E. T. F. Silveira, L. H. Stahnke, and R. Talon (Oxford: Blackwell Publishing), 455–468.
- [106] Parente, E., Martuscelli, M., Gardini, F., Grieco, S., Crudele, M. A., and Suzzi, G. (2001). Evolution of microbial populations and biogenic amine production in dry sausages produced in southern Italy. *Journal of Applied Microbiology* 90, 882–891
- [107] Bozkurt, H., and Erkmen, O. (2004). Effects of temperature, humidity and additives on the formation of biogenic amines in Sucuk during ripening and storage periods. *Food Science and Technology International* 10, 21–28
- [108] Komprda, T., Smela, D., Pechova, P., Kalhotka, L., Stencl, J., and Klejdus, B. (2004). Effect of starter culture, spice mix and storage time and temperature on biogenic amine content of dry fermented sausages. *Meat Science* 67, 607–616.
- [109] Wang, C. C., Billett, E., Borchert, A., Hartmut, K., & Christoph, U. (2013). Monoamine oxidases in development. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 70, 599-630.
- [110] Fadda, S., Vignolo, G., & Oliver, G. (2001). Tyramine degradation and tyramine/histamine production by lactic acid bacteria and *Kocuria* strains. *Biotechnology Letters*, 23, 2015-2019.

- [111] Gardini, F., Martuscelli, M., Crudele, M. A., Paparella, A., & Suzzi, G. (2002). Use of *Staphylococcus xylosus* as a starter culture in dried sausages: effect on the biogenic amine content. *Meat Science*, 61, 275-283.
- [112] Martuscelli, M., Crudele, M. A., Gardini, F., & Suzzi, G. (2000). Biogenic amine formation and oxidation by *Staphylococcus xylosus* strains from artisanal fermented sausages. *Letters in Applied Microbiology*, 31, 228-232
- [113] Zaman, M. Z., Bakar, F. A., Selamat, J., & Bakar, J. (2010). Occurrence of biogenic amines and amines degrading bacteria in fish sauce. *Czech Journal of Food Sciences*, 28, 440-449.
- [114] Hernández-Jover, T., Izquierdo- Pulido, M., Veciana-Nogués, M. T., Mariné-Font, A., and Vidal-Carou, M. C. (1997b). Effect of starter cultures on biogenic amine formation during fermented sausage production. *Journal of Food Protection* 60, 825–830.
- [115] Bover-Cid, S., and Holzapfel, W. (1999). Improved screening procedure for biogenic amine production by lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology* 53, 33–41.
- [116] González-Fernández, C., Santos, E., Jaime, I., and Rovira, J. (2003). Influence of starter cultures and sugar concentrations of biogenic amine contents in chorizo dry sausage. *Food Microbiology* 20, 275–284.
- [117] Gücükoglu, A., and Küplülü, Ö. (2010). The effect of different starter cultures and ripening temperatures on formation of biogenic amine in Turkish fermented sausages. *European Food Research and Technology* 230, 875–884.
- [118] Lu, S., Xu, X., Zhou, G., Zhu, Z., Meng, Y., and Sun, Y. (2010). Effect of starter cultures on microbial ecosystem and biogenic amines in fermented sausage. *Food Control* 21, 444–449.
- [119] Rice, S., and Koehler, P. (1976). Tyrosine and histidine decarboxylase activities of *Pediococcus cerevisiae* and *Lactobacillus* species and the production of tyramine in fermented sausages. *Journal of Milk and Food Technology* 39, 353–358.
- [120] Buncic, S., Paunovic, L., Radisic, D., Vojinovic, G., Smiljanic, D., and Baltic, M. (1993). Effects of gluconodeltalactone and *Lactobacillus plantarum* on the production of histamine and tyramine in fermented sausages. *International Journal of Food Microbiology* 17, 303–309.

- [121] Bauer, F., Seuss, I., Paulsen, P., and Vali, S. (1994). "The formation of biogenic amines in meat and meat products," in Proceedings of the 40th International Congress Meat Science and Technology (ICoMST), The Hague, S-V25.
- [122] Paulsen, P., and Bauer, F. (1997). Biogenic amines in fermented sausages. II. Factors influencing the formation of biogenic amines in fermented sausages. *Fleischwirtschaft* 77, 32–34.
- [123] Coloretti, F., Chiavari, C., Armaforte, E., Carri, S., and Castagnetti, B. (2008). Combined use of starter cultures and preservatives to control production of biogenic amines and improve sensorial profile in low acid salami. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56, 11238–11244.
- [124] Baka, A. M., Papavergou, E. J., Pragalaki, T., Bloukas, J. G., and Kotzekidou, P. (2011). Effect of selected autochthonous starter cultures on processing and quality characteristics of Greek fermented sausages. *LWT – Food Science and Technology* 44, 54–61.
- [125] Tosukhowong, A., Visessanguan, W., Pumpuang, L., Tepkasikul, P., Panya, A., and Vallyasevi, R. (2011). Biogenic amines formation in Nham, a Thai fermented sausage and the reduction by commercial starter culture, *Lactobacillus plantarum* BCC 9546. *Food Chemistry* 129, 846–853.
- [126] Bover-Cid, S., Izquierdo-Pulido, M., and Vidal-Carou, M. C. (1999b). Effect of proteolytic starter cultures of *Staphylococcus* spp. on biogenic amine formation during the ripening of dry fermented sausages. *International Journal of Food Science Technology* 46, 95–104.
- [127] González-Fernández, C., Santos, E., Jaime, I., and Rovira, J. (2003). Influence of starter cultures and sugar concentrations of biogenic amine contents in chorizo dry sausage. *Food Microbiology* 20, 275–284.
- [128] Bover-Cid, S., Izquierdo-Pulido, M., and Vidal-Carou, M. C. (2000c). Mixed starter cultures to control biogenic amine production in dry fermented sausages. *Journal of Food Protection* 63, 1556–1562.
- [129] Benito, M. J., Martín, A., Aranda, E., Pérez-Nevado, F., Ruiz-Moyano, S., and Córdoba, M. (2007). Characterization and selection of autochthonous lactic acid bacteria isolated from traditional Iberian dry-fermented salchichón and chorizo sausages. *Food Science* 72, 193–201.



- [130] Casquete, R., Benito, M. J., Martín, A., Ruiz-Moyano, S., Hernández, A., and Córdoba, M. G. (2011). Effect of autochthonous starter cultures in the production of “salchichón”, a traditional Iberian dry-fermented sausage, with different ripening processes. *International Journal of Food Science Technology* 44, 1562–1571.
- [131] Ayhan, K., Kolsarici, N., and Özkan, G. A. (1999). The effects a starter culture on the formation of biogenic amines in Turkish soudjoucks. *Meat Science* 53, 183–188.
- [132] Talon, R., Leroy, S., Lebert, I., Giammarinaro, P., Chacornac, J. P., Latorre-Moratalla, M. L., Vidal-Carou, M. C., Zanardi, E., Conter, M., and Lebecque, A. (2008). Safety improvement and preservation of typical sensory qualities of traditional dry fermented sausages using autochthonous starter cultures. *International Journal of Food Microbiology* 126, 227–234.
- [133] Leuschner, R. G. K., and Hammes, W. P. (1998). Tyramine degradation by micrococci during ripening of fermented sausage. *Meat Science* 49, 189–196.

**SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK**

BA	Biogenní amin
CE	Kapilární chromatografie
CNS	Koaguláza-negativní stafylokoky
DAO	Diaminooxidáza
GC	Plynová chromatografie
HIM	Histamin
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie
KAD	Kadaverin
LAB	Bakterie mléčného kvašení
MAO	Monoaminooxidáza
MRS	De Man, Rogosa a Sharpe agar
NB	Nutrient Broth
PUT	Putrescin
SPD	Spermidin
SPM	Spermin
TLC	Chromatografie na tenké vrstvě
TRM	Tryptamin
TYM	Tyramin
UV	Ultrafialové záření
VIS	Viditelné záření

**SEZNAM OBRÁZKŮ**

<i>Obrázek 1 - Degradace BA pomocí mikrobiální kultury LHP DRY po 24 hod (A) a 48 hod (B) kultivace .....</i>	<i>45</i>
<i>Obrázek 2 - Degradace BA pomocí mikrobiální kultury SM-194 po 24 hod (A) a 48 hod (B) kultivace .....</i>	<i>46</i>
<i>Obrázek 3 - Degradace BA pomocí mikrobiální kultury BFL-TO3 po 24 hod (A) a 48 hod (B) kultivace .....</i>	<i>47</i>
<i>Obrázek 4 - Degradace putrescinu kulturou LHP DRY při 30 °C (A) a 37 °C (B) .....</i>	<i>49</i>
<i>Obrázek 5 - Degradace fenyletylaminu kulturou LHP DRY při 30 °C (A) a 37 °C (B) .....</i>	<i>51</i>
<i>Obrázek 6 - Degradace kadaverinu kulturou LHP DRY při 30 °C (A) a 37 °C (B) .....</i>	<i>53</i>
<i>Obrázek 7 - Degradace histaminu kulturou LHP DRY při 30 °C (A) a 37 °C (B) .....</i>	<i>55</i>
<i>Obrázek 8 - Degradace tyraminu kulturou LHP DRY při 30 °C (A) a 37 °C (B) .....</i>	<i>57</i>
<i>Obrázek 9 - Degradace putrescinu kulturou SM-194 při 30 °C (A) a 37 °C (B) .....</i>	<i>59</i>
<i>Obrázek 10 - Degradace fenyletylaminu kulturou SM-194 při 30 °C (A) a 37 °C (B) .....</i>	<i>61</i>
<i>Obrázek 11 - Degradace kadaverinu kulturou SM-194 při 30 °C (A) a 37 °C (B) .....</i>	<i>63</i>
<i>Obrázek 12 - Degradace histaminu kulturou SM-194 při 30 °C (A) a 37 °C (B) .....</i>	<i>65</i>
<i>Obrázek 13 - Degradace tyraminu kulturou SM-194 při 30 °C (A) a 37 °C (B) .....</i>	<i>67</i>

**SEZNAM TABULEK**

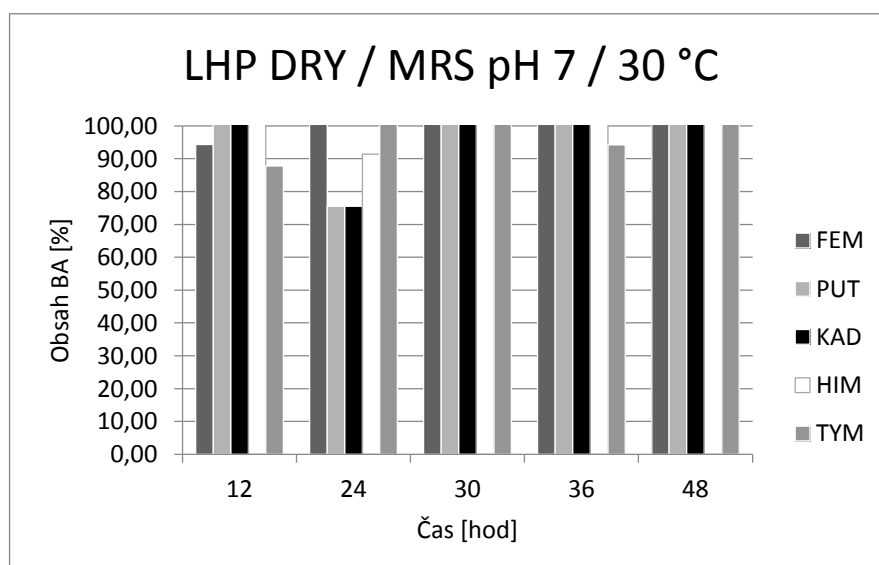
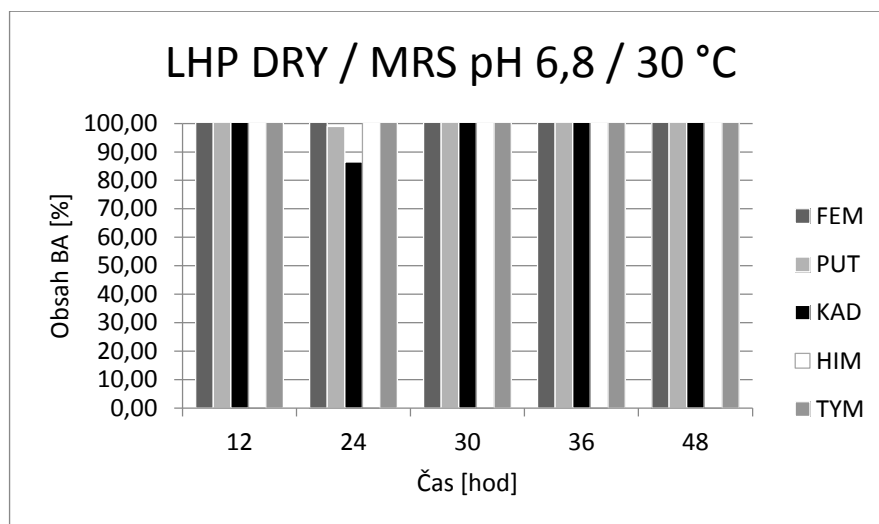
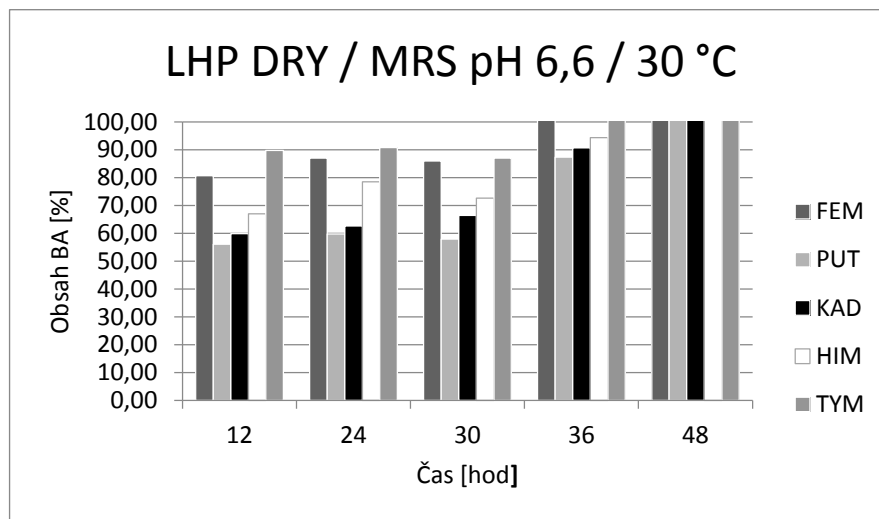
<i>Tabulka 1 - Odběr a příprava vzorků fermentovaných masných výrobků pro HPLC</i>	
[25].....	19
<i>Tabulka 2 - Testované mikrobiální kultury</i> .....	36
<i>Tabulka 3 - Složení média M17</i> .....	37
<i>Tabulka 4 - Složení média MRS</i> .....	38
<i>Tabulka 5 - Složení média Nutrient Broth</i> .....	38
<i>Tabulka 6 - Složení zásobního roztoku BA</i> .....	39
<i>Tabulka 7 - Složení kultur dle výrobce a výsledky identifikace metodou MALDI-TOF</i>	
MS.....	43
<i>Tabulka 8 - Degradace BA 18 mikrobiálními kulturami</i> .....	44
<i>Tabulka 9 – Optimální podmínky degradace biogenních aminů kulturami LHP DRY a SM-194</i> .....	72

**SEZNAM PŘÍLOH**

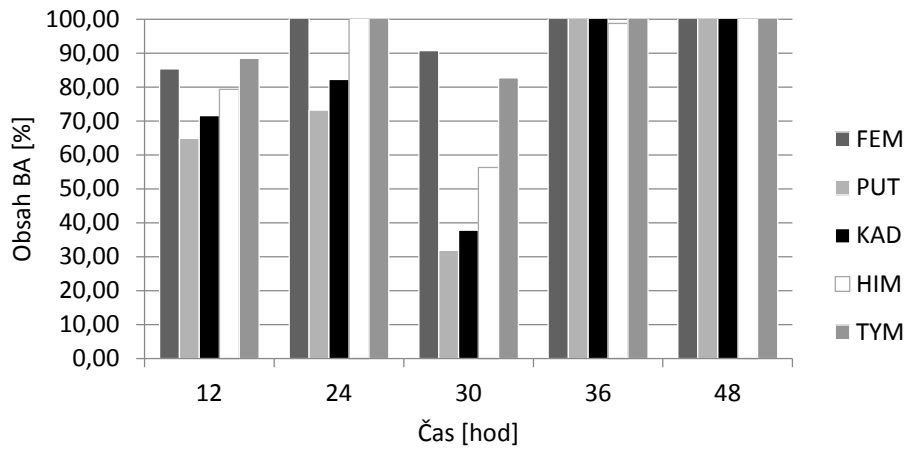
<i>Příloha P I - Degradace 18 mikrobiálních kultur.....</i>	<i>95</i>
<i>Příloha P II - Vliv vybraných faktorů na degradaci BA u kultury LHP DRY.....</i>	<i>96</i>
<i>Příloha P III - Vliv vybraných faktorů na degradaci BA u kultury SM-194.....</i>	<i>101</i>



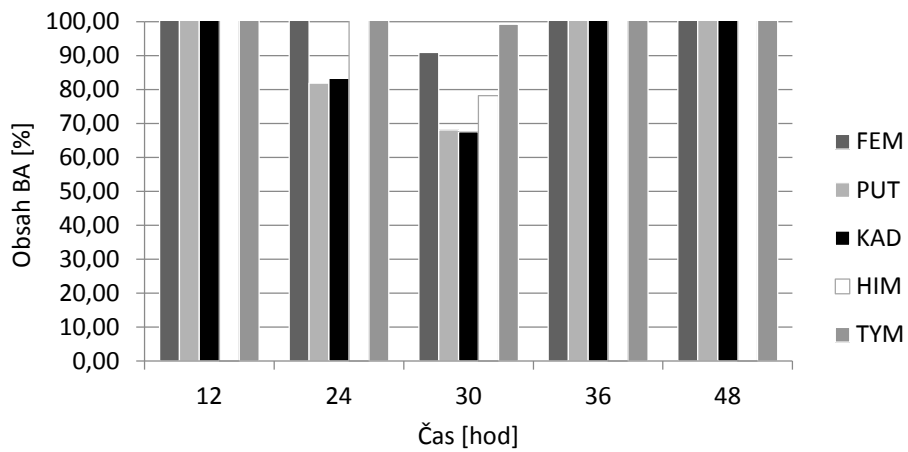
## PŘÍLOHA P II: VLIV VYBRANÝCH FAKTORŮ NA DEGRADACI BA U KULTURY LHP DRY



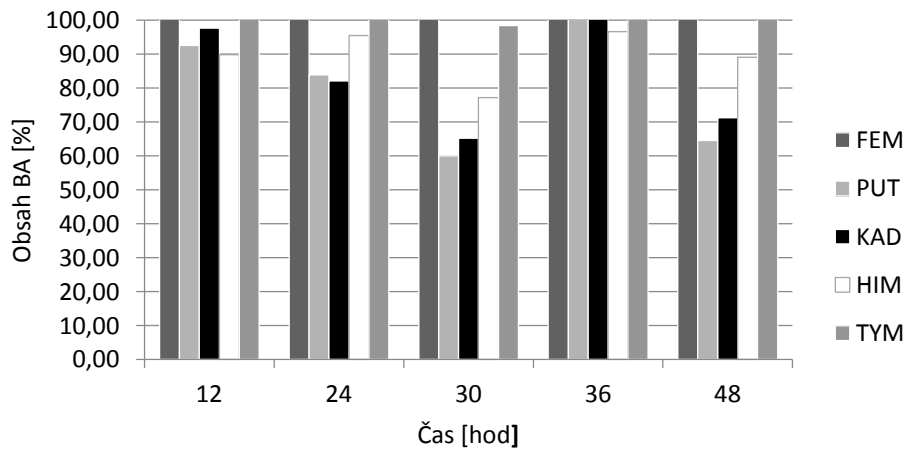
### LHP DRY / MRS pH 7,2 / 30 °C



### LHP DRY / MRS 1/2 pH 6,6 / 30 °C

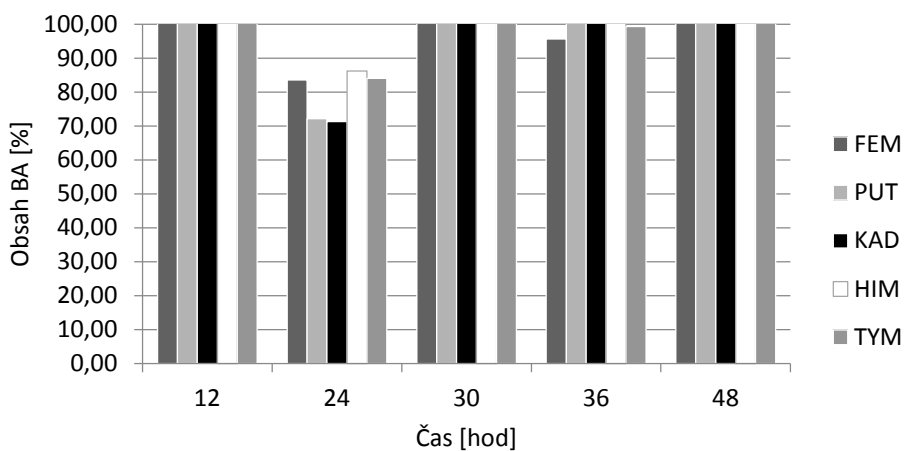


### LHP DRY / MRS 1/2 pH 7 / 30 °C

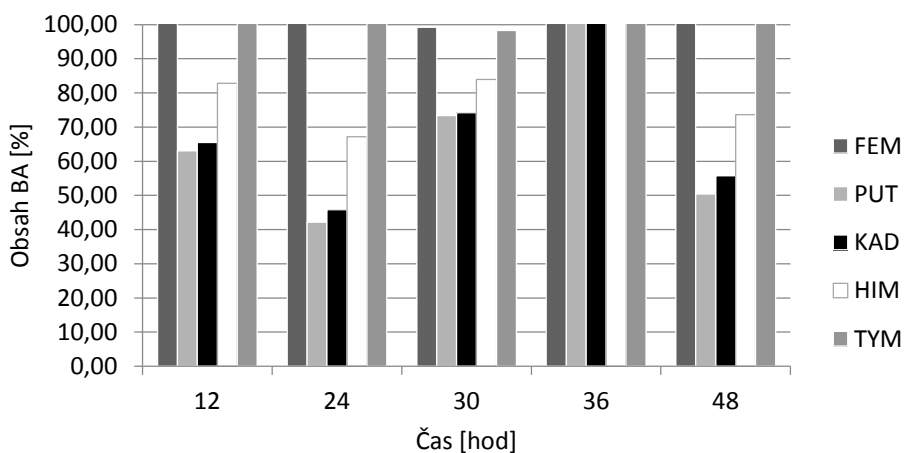




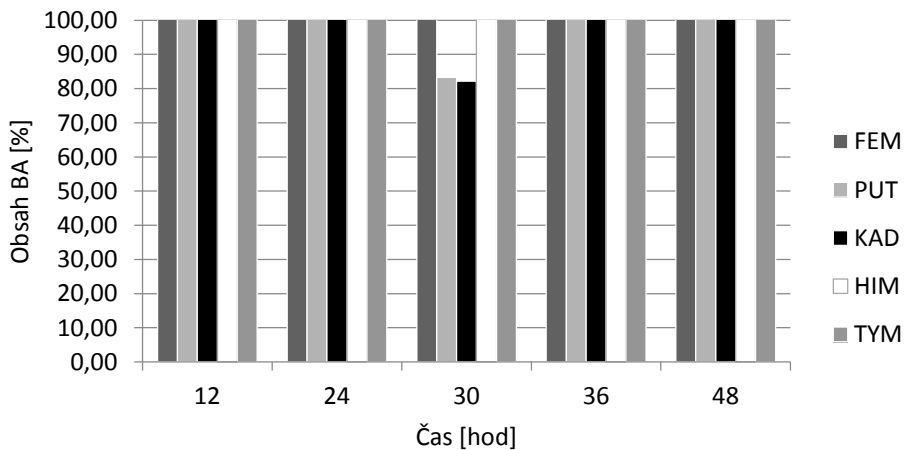
### LHP DRY / MRS 1/2 pH 7,2 / 30 °C



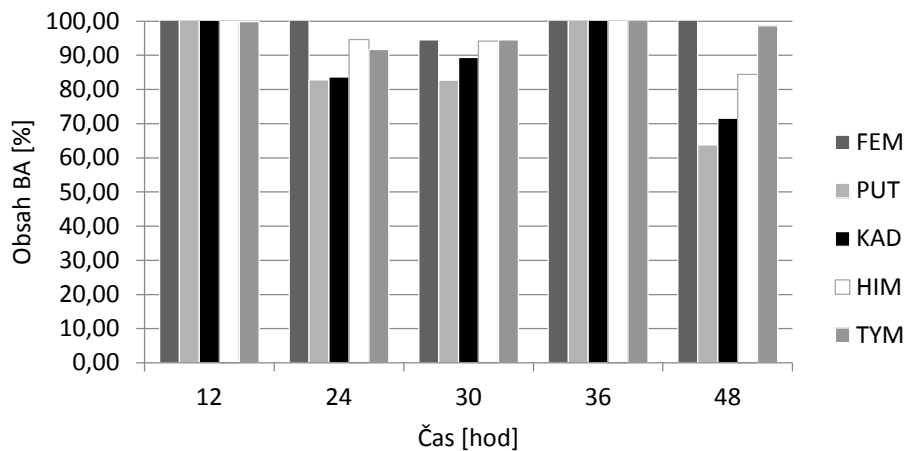
### LHP DRY / MRS pH 6,6 / 37 °C



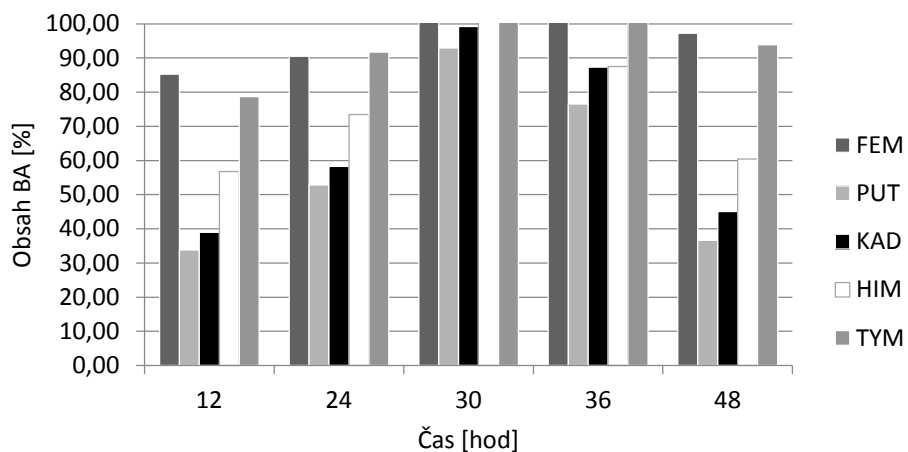
### LHP DRY / MRS pH 6,8 / 37 °C



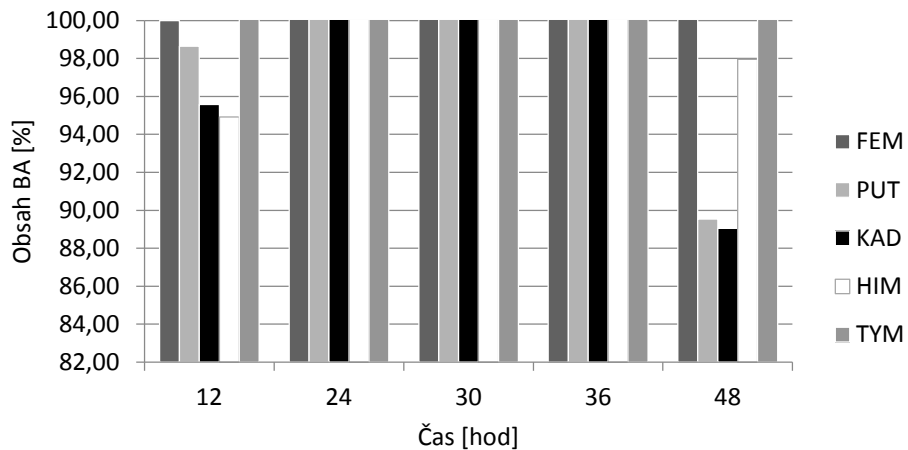
### LHP DRY / MRS pH 7 / 37 °C



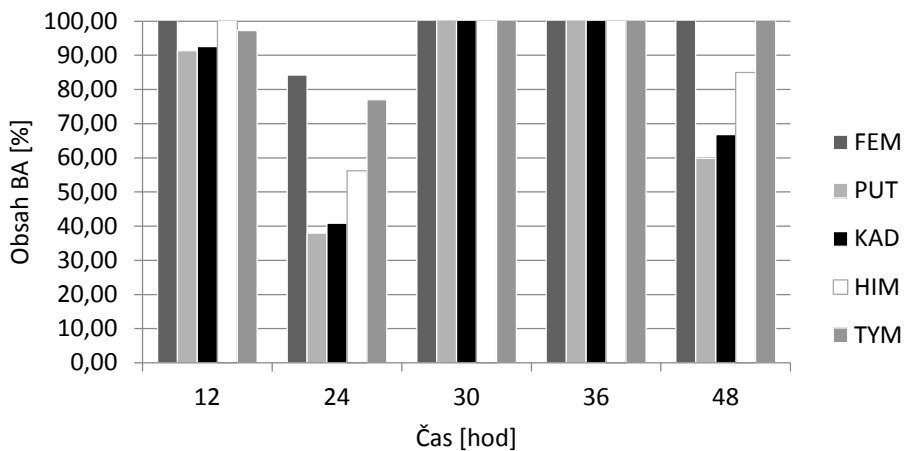
### LHP DRY / MRS pH 7,2 / 37 °C



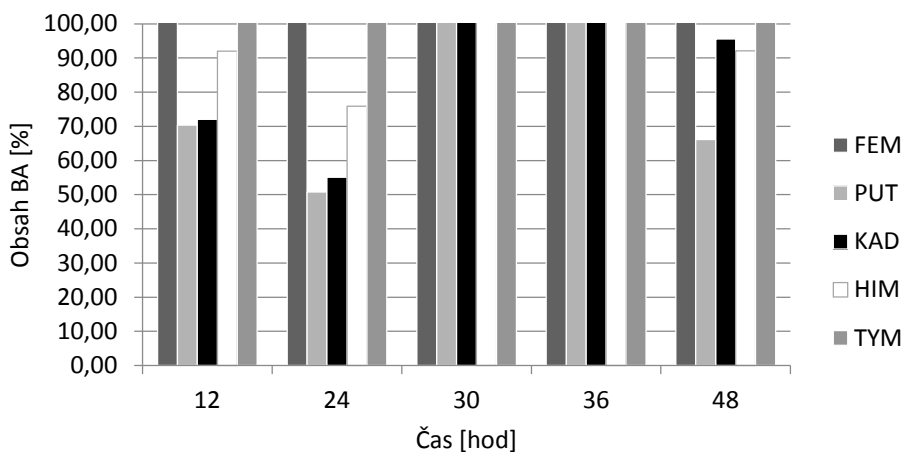
### LHP DRY / MRS 1/2 pH 6,6 / 37 °C



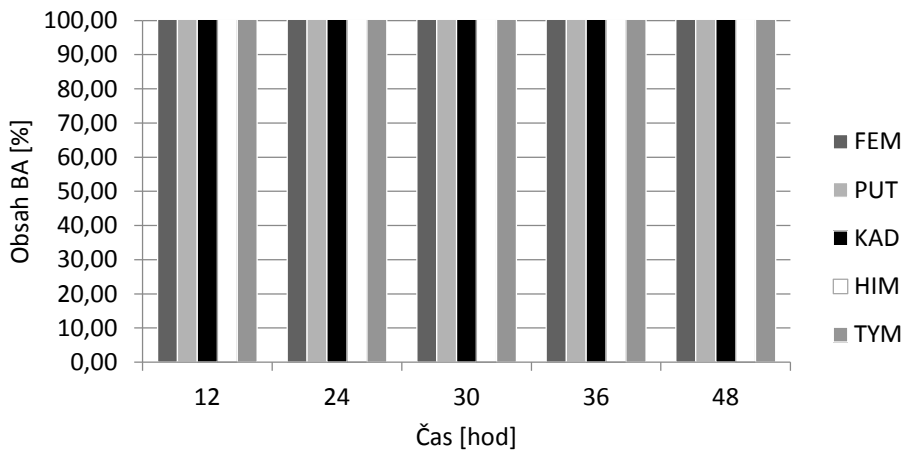
### LHP DRY / MRS 1/2 pH 6,8 / 37 °C



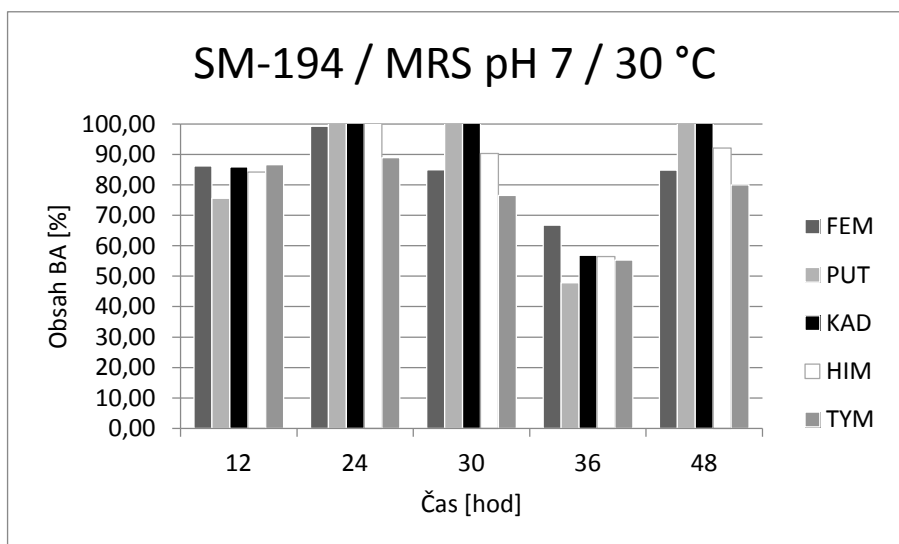
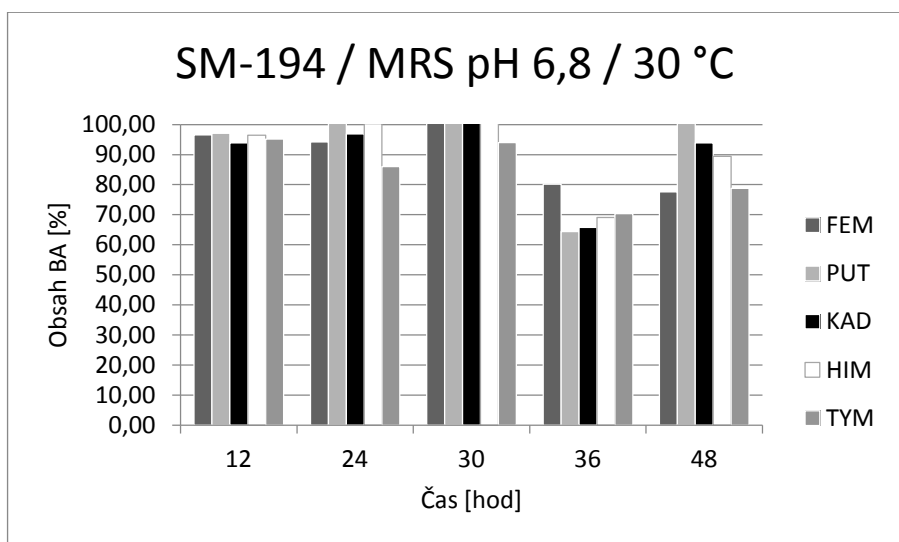
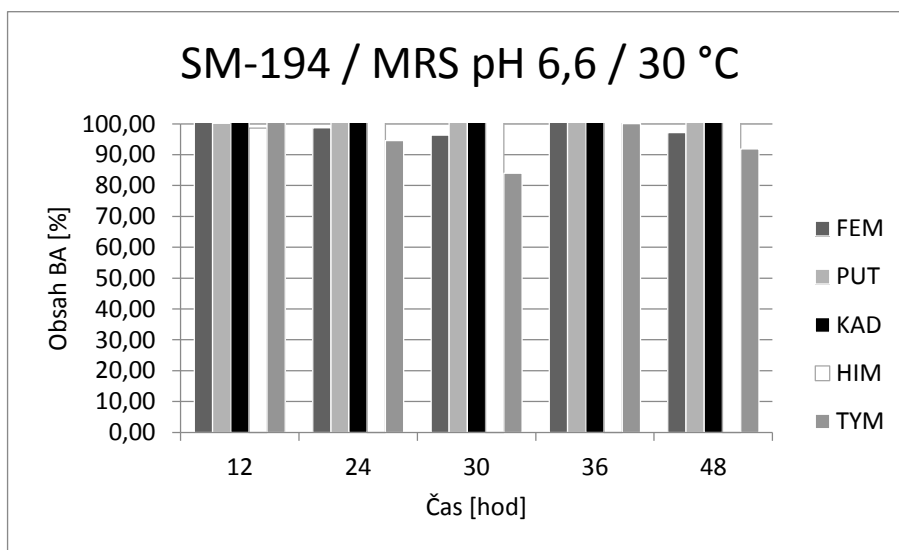
### LHP DRY / MRS 1/2 pH 7 / 37 °C



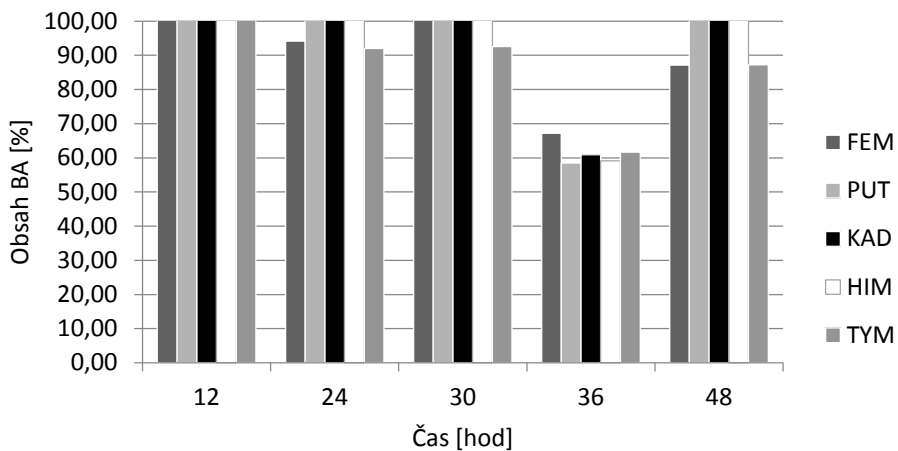
### LHP DRY / MRS 1/2 pH 7,2 / 37 °C



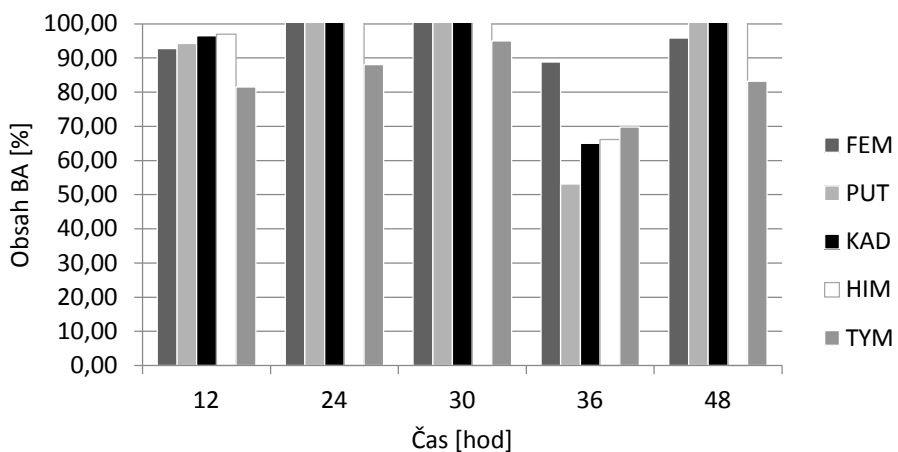
## PŘÍLOHA P III: VLIV VYBRANÝCH FAKTORŮ NA DEGRADACI BA U KULTURY SM-194



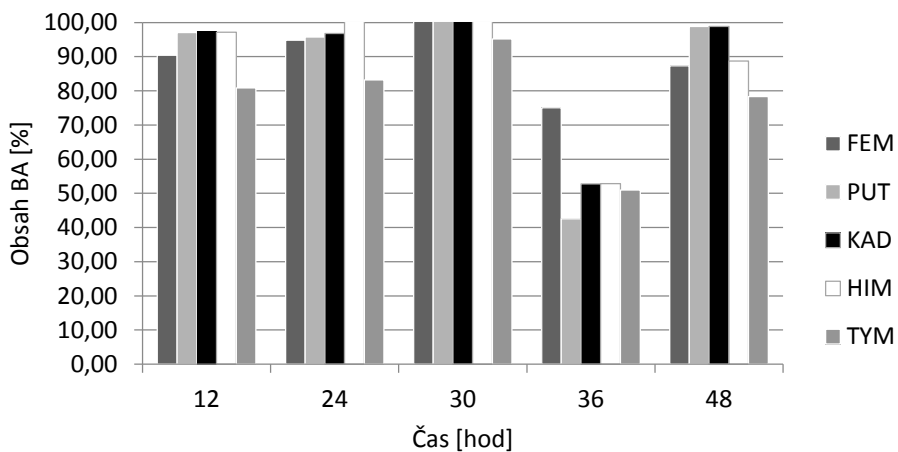
### SM-194 / MRS pH 7,2 / 30 °C



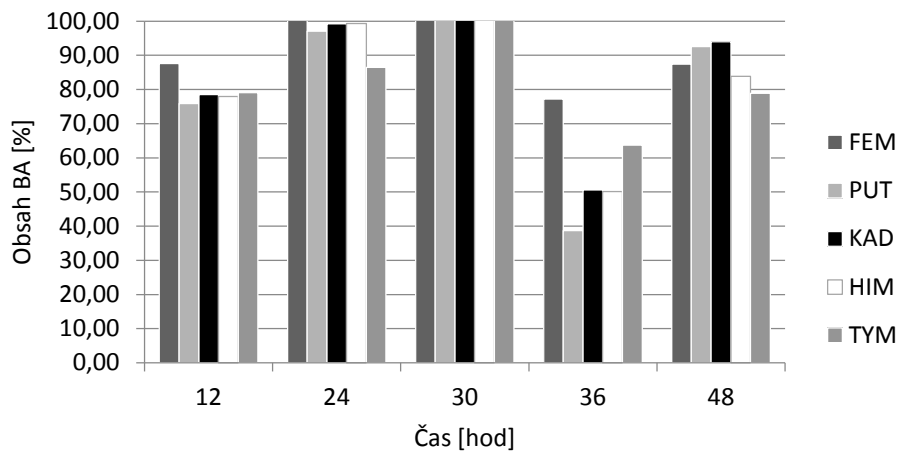
### SM-194 / MRS 1/2 pH 6,6 / 30 °C



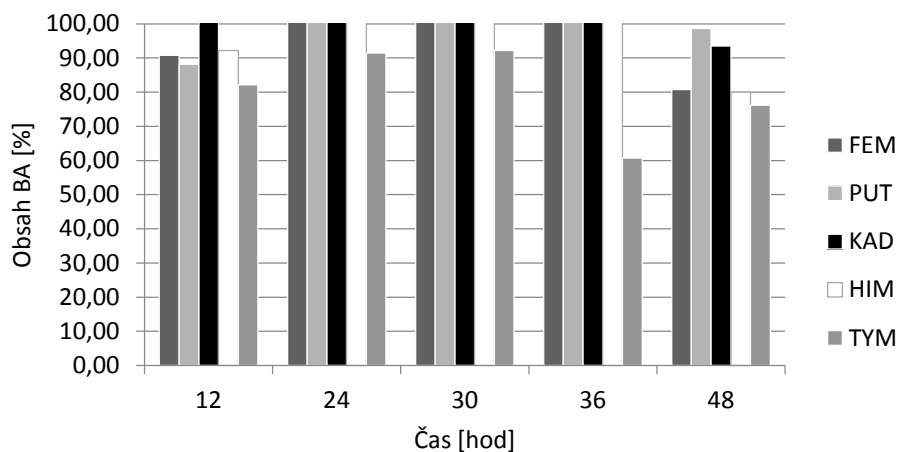
### SM-194 / MRS 1/2 pH 6,8 / 30 °C



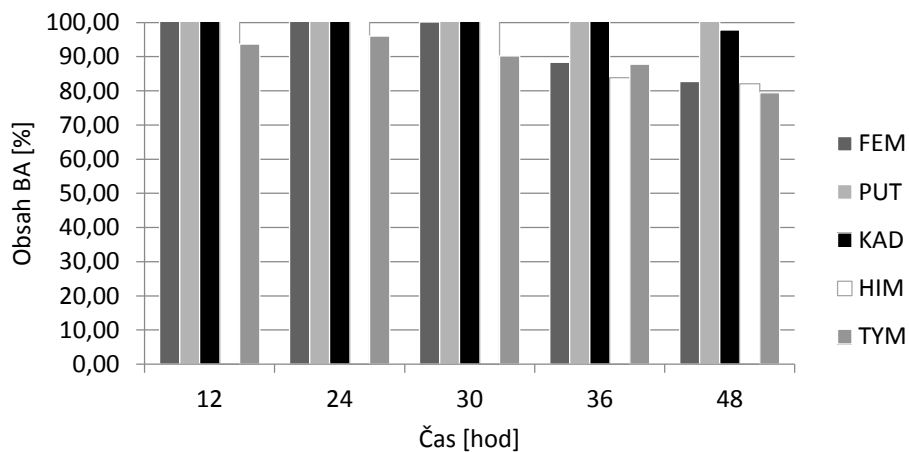
### SM-194 / MRS 1/2 pH 7 / 30 °C



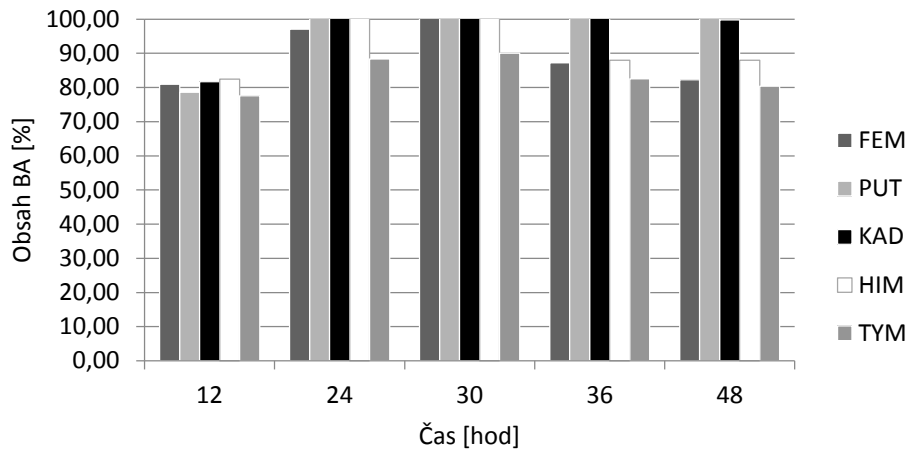
### SM-194 / MRS 1/2 pH 7,2 / 30 °C



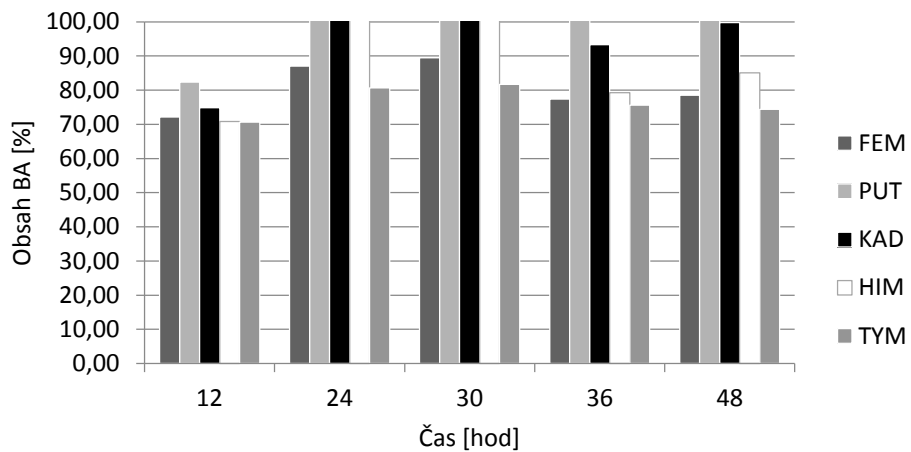
### SM-194 / MRS pH 6,6 / 37 °C



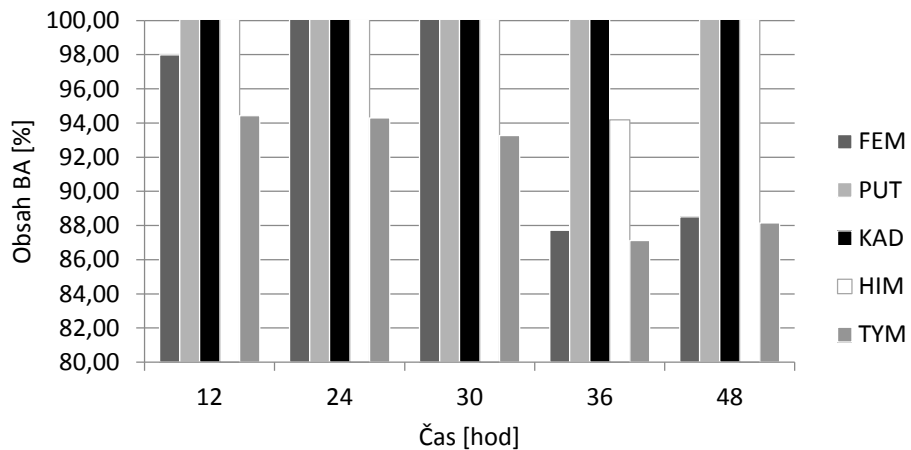
### SM-194 / MRS pH 6,8 / 37 °C



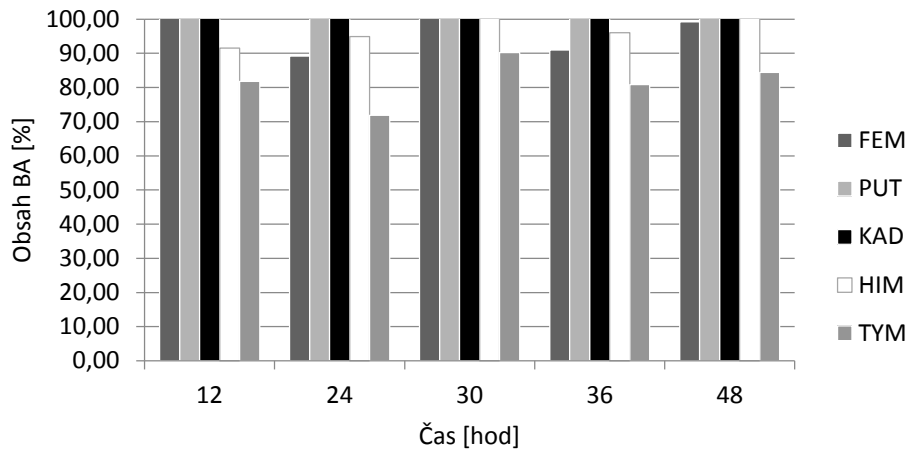
### SM-194 / MRS pH 7 / 37 °C



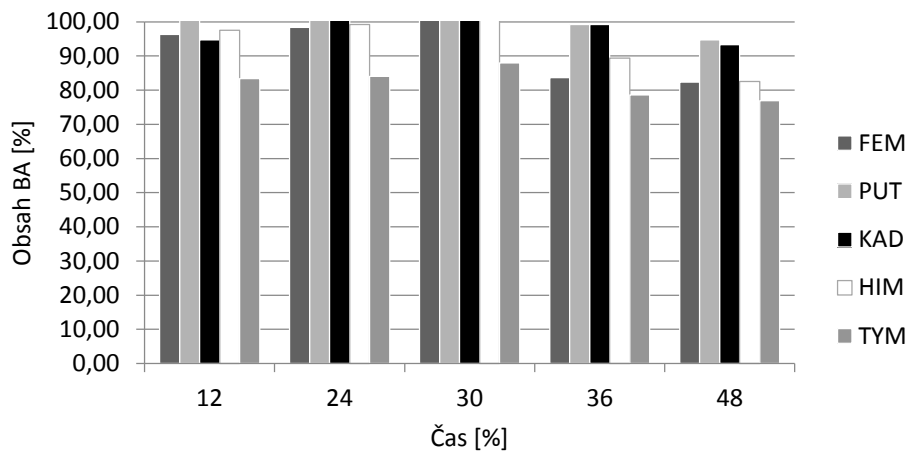
### SM-194 / MRS pH 7,2 / 37 °C



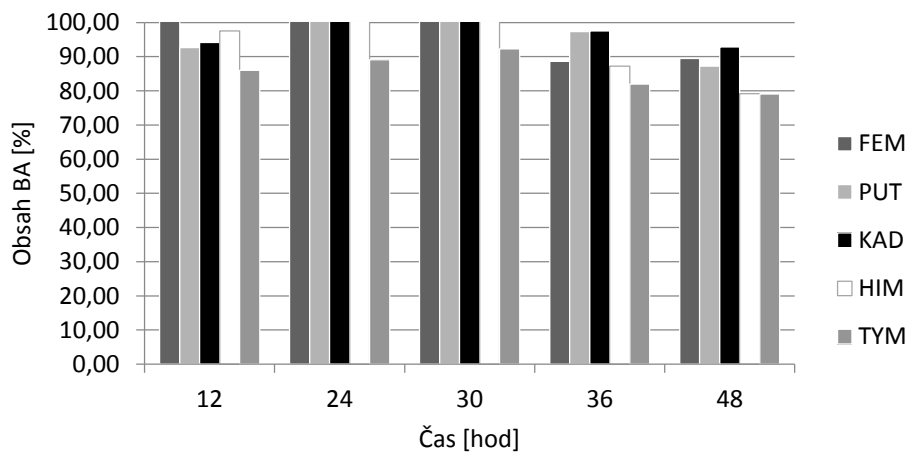
### SM-194 / MRS 1/2 pH 6,6 / 37 °C



### SM-194 / MRS 1/2 pH 6,8 / 37 °C



### SM-194 / MRS 1/2 pH 7 / 37 °C





### SM-194 / MRS 1/2 pH 7,2 / 37 °C

