

Monitoring obsahu biogenních aminů ve vybraných fermentovaných potravinách živočišného původu

Bc. Ludmila Zálešáková

Diplomová práce
2011



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav biochemie a analýzy potravin

akademický rok: 2010/2011

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Ludmila ZÁLEŠÁKOVÁ**
Osobní číslo: **T090275**
Studijní program: **N 2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Technologie, hygiena a ekonomika výroby potravin**

Téma práce: **Monitoring obsahu biogenních aminů ve vybraných fermentovaných potravinách živočišného původu.**

Zásady pro vypracování:

I. Teoretická část

1. Biogenní aminy, jejich vznik a způsob stanovení.
2. Výskyt biogenních aminů v potravinách a změny během skladování.
3. Legislativní limity pro výskyt biogenních aminů v potravinách.

II. Praktická část

1. Stanovte biogenní aminy ve vybraných vzorcích potravin živočišného původu.
 2. Sledujte obsah biogenních aminů v průběhu chladírenského skladování.
 3. Výsledky vyhodněte a formulujte závěry.
-

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

- [1] SANTOS SILLA, M. Biogenic amines: their importance in foods. *International Journal of Food Microbiology*, 1996.
- [2] MOINARD, CH., CYNOBER, L., BANDT, J. Polyamines: metabolism and implications in human diseases. *Clinical Nutrition*, 2005.
- [3] ÖNAL, A. A review: Current analytical methods for the determination of biogenic amines in foods. *Food Chemistry*, 2007.
- [4] NAILA A., FLINT, S., FLETCHER, G., BREMER, P., MEERDINK, G. Control of biogenic amines in food-existing and emerging approaches, *Journal of Food Science* 2010.
- [5] VELÍŠEK, J. *Chemie potravin 2*, OSSIS, Tábor 2009.

Vedoucí diplomové práce:

doc. Ing. František Buňka, Ph.D.

Ústav technologie a mikrobiologie potravin

Datum zadání diplomové práce:

25. února 2011

Termín odevzdání diplomové práce:

20. května 2011

Ve Zlíně dne 21. března 2011



doc. Ing. Petr Hlaváček, CSc.
děkan



doc. Ing. Miroslav Fišera, CSc.
ředitel ústavu

Příjmení a jméno: Bc. Ludmila Zálešáková

Obor: Technologie, hygiena a ekonomika výroby potravin

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

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

Ve Zlíně 17. května 2011

Ludmila Zálešáková

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ABSTRAKT

Cílem této diplomové práce bylo sledovat obsah biogenních aminů ve vybraných vzorcích fermentovaných potravin živočišného původu získané z běžné obchodní sítě a sledovat jejich změny během chladírenského skladování. Obsah biogenních aminů byl monitorován bezprostředně po zakoupení a na konci doby minimální trvalivosti, resp. použitelnosti. Třetí odběrový termín byl volen tak, aby byl přibližně uprostřed výše zmíněných termínů. Ke stanovení biogenních aminů byla využita iontově-výměnná kapalinová chromatografie s fotometrickou detekcí. Při chladírenském skladování bylo zjištěno, že dochází k nárůstu koncentrace biogenních aminů a tato koncentrace byla vždy nejvyšší na konci doby minimální trvanlivosti, resp. použitelnosti. Nejvyšší obsah biogenních aminů byl zaznamenán u sýrů ementálského typu a sýru zrajících pod mazem, kde množství přesáhlo hodnoty 1000 mg kg^{-1} . Taková množství již mohou představovat zdravotní riziko pro konzumenty. U sýrů s plísní na povrchu byly obsahy biogenních aminů nízké.

Klíčová slova: biogenní aminy, polyaminy, fermentované potraviny, iontově-výměnná kapalinová chromatografie.

ABSTRACT

The aim of this work was to observe content of biogenic amines in selected samples of fermented foods of animal origin obtained from common market and to monitor their changes during storage at 6°C . The content of biogenic amines was noted immediately after the purchase and at the end of the shelf-life. The third time of sampling was chosen to be approximately in the middle of the terms mentioned above. To determine the biogenic amines, ion exchange liquid chromatography with photometric detection was used. During the cold storage, increasing concentration of biogenic amines was detected. This concentration was always higher than at the end of the shelf-life. The highest content of biogenic amines was recorded in Swiss cheeses and smear cheeses, in which the amount exceeded 1000 mg kg^{-1} . Such concentrations may infer a health risk for consumers. Low content of biogenic amines was detected in cheeses with white mould on the surface.

Key words: biogenic amines, polyamines, fermented foods, ion exchange liquid chromatography.

Děkuji vedoucímu své diplomové práce, doc. Ing. Františkovi Buňkovi, Ph.D., za odborné vedení, velkou trpělivost, podnětné připomínky a cenné rady, které mi poskytl při zpracování mé práce.

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

OBSAH

ÚVOD.....	10
I TEORETICKÁ ČÁST	11
1 BIOGENNÍ AMINY A POLYAMINY	12
1.1 BIOGENNÍ AMINY.....	12
1.1.1 Fyziologické účinky biogenních aminů.....	13
1.1.2 Vybrané poznatky o syntéze a katabolizmu biogenních aminů	13
1.2 POLYAMINY.....	18
1.2.1 Vybrané poznatky o syntéze a katabolizmu polyaminů	19
1.2.2 Vybrané interakce polyaminů.....	23
1.3 NĚKTERÉ REAKCE BIOGENNÍCH AMINŮ.....	25
2 VÝSKYT BIOGENNÍCH AMINŮ A POLYAMINŮ V POTRAVINÁCH	26
2.1 BIOGENNÍ AMINY A POLYAMINY V POTRAVINÁCH ROSTLINNÉHO PŮVODU.....	26
2.2 BIOGENNÍ AMINY A POLYAMINY V POTRAVINÁCH ŽIVOČIŠNÉHO PŮVODU	27
3 METODY STANOVENÍ BIOGENNÍCH AMINŮ A POLYAMINŮ	29
3.1 KAPALINOVÁ CHROMATOGRFIE.....	29
3.2 PLYNOVÁ CHROMATOGRFIE	30
3.3 KAPILÁRNÍ ELEKTROFORÉZA	30
3.4 IMUNO-ENZYMATICKE METODY.....	31
4 TOXICITA BIOGENNÍCH AMINŮ A POLYAMINŮ	32
4.1 TOXICKÉ DÁVKY BIOGENNÍ AMINŮ A POLYAMINŮ	32
4.2 LEGISLATIVNÍ LIMITY BIOGENNÍCH AMINŮ A POLYAMINŮ.....	33
II PRAKTICKÁ ČÁST	34
5 CÍL PRÁCE	35
6 MATERIÁL A METODY	36
6.1 CHARAKTERISTIKA VZORKŮ	36
6.2 EXTRAKCE BIOGENNÍCH AMINŮ.....	37
6.3 CHROMATOGRFICKÉ STANOVENÍ.....	37
7 VÝSLEDKY A DISKUZE	39

7.1	OBSAH BIOGENNÍCH AMINŮ VE VZORCÍCH SKUPINY 1.....	39
7.2	OBSAH BIOGENNÍCH AMINŮ VE VZORCÍCH SKUPINY 2.....	41
7.3	OBSAH BIOGENNÍCH AMINŮ VE VZORCÍCH SKUPINY 3.....	44
7.4	OBSAH BIOGENNÍCH AMINŮ VE VZORCÍCH SKUPINY 4.....	44
7.5	OBSAH BIOGENNÍCH AMINŮ VE VZORCÍCH SKUPINY 5.....	47
7.6	OBSAH BIOGENNÍCH AMINŮ VE VZORCÍCH SKUPINY 6.....	49
7.7	SOUHRNNÁ DISKUZE.....	53
ZÁVĚR		57
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....		58
SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK		68
SEZNAM OBRÁZKŮ		70
SEZNAM TABULEK.....		71
SEZNAM PŘÍLOH.....		73

ÚVOD

V současné době je při výrobě potravin kladen velký důraz na jejich kvalitu, bezpečnost a zdravotní nezávadnost. Riziko vzniká při samotné výrobě potravin, kde může dojít ke kontaminaci potravin z výrobního prostředí anebo je spojeno s nežádoucími látkami, které vznikají během výroby přímo v potravině. Do posledně zmíněné skupiny lze zařadit biogenní aminy, které vznikají působením některých mikroorganismů. Producenty biogenních aminů lze najít i mezi zákysovými (starterovými) kulturami, které se využívají při výrobě fermentovaných výrobků.

V České republice jsou od roku 2004 stanoveny maximální povolené limity biogenních aminů pouze v rybách a produktů z ryb, i když lze předpokládat, že tyto látky vznikají i v dalších fermentovaných potravinách. Bylo by tedy zajímavé provést monitoring fermentovaných potravin v obchodní síti z hlediska obsahu biogenních aminů.

Teoretická část diplomové práce je věnována charakteristice biogenních aminů a polyaminů, jejich vzniku a možným reakcím a interakcím. Dále je popsán jejich výskyt, stanovení v potravinách a možný toxikologický účinek a legislativní limity pro tuto skupinu sloučenin.

V praktické části bylo provedeno stanovení biogenních aminů u 24 vzorků fermentovaných potravin živočišného původu získaných z běžné obchodní sítě. U výše zmíněných výrobků byla sledována změna obsahu biogenních aminů během chladírenského skladování po dobu minimální trvanlivosti, resp. použitelnosti.

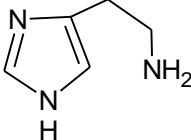
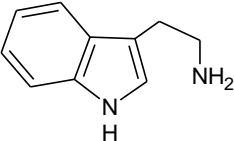
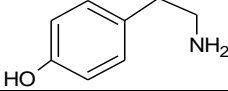
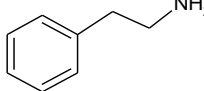
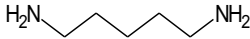
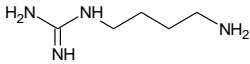
I. TEORETICKÁ ČÁST

1 BIOGENNÍ AMINY A POLYAMINY

1.1 Biogenní aminy

Biogenní aminy jsou organické nízkomolekulární látky, které jsou syntetizovány v mikrobiálních, rostlinných a živočišných buňkách [1-6]. Jsou zdrojem dusíku a mají funkci prekurzorů syntézy hormonů, alkaloidů, nukleových kyselin a proteinů [2,7]. V potravinách bylo objeveno přes 30 psychoaktivních a vazoaktivních aminů [6]. Mezi nejvýznamnější biogenní aminy řadíme histamin, tryptamin, tyramin, fenyletylamin, kadaverin a agmatin. Kalač [8] a někteří autoři zařazují kadaverin a agmatin do skupiny polyaminů. Podle chemické struktury je můžeme rozdělit na alifatické, aromatické a heterocyklické aminy [1-4,7,9]. Přehled biogenních aminů je zobrazen v tabulce 1.

Tabulka 1: Systematický název a chemická struktura významných biogenních aminů [1,2,4].

Triviální název	Chemická struktura	Systematický název	Strukturní vzorec
histamin	heterocyklická	2-(1H-imidazol-5-yl)etanamin	
tryptamin	heterocyklická	2-(1H-indol-3-yl)etanamin	
tyramin	aromatická	4-(2-aminoethyl)fenol	
fenyletylamin	aromatická	2-fenyletanamin	
kadaverin	alifatická	pentan-1,5-diamin	
agmatin	alifatická	2-(4-aminobutyl)guanidin	

1.1.1 Fyziologické účinky biogenních aminů

Biogenní aminy syntetizované v lidském organismu mohou ovlivňovat některé zde probíhající procesy. K těmto pochodům patří regulace tělesné teploty, trávení přijaté potravy, snižování a zvyšování krevního tlaku [10].

Histamin objevili v roce 1910 Henry Hallett Dale a Patric Playfair Laidlaw. Poprvé byl izolován z jaterních a plicních buněk. Podílí se na regulaci hladkého svalstva střev a průdušek, ovlivňuje činnost srdce, krevní tlak, vazodilataci, sekreci žaludečních šťáv, imunologické a alergické reakce. Histamin působí na centrální mozkovou soustavu, kde ovlivňuje procesy učení, paměť a fáze spánku [10-12].

Tyramin, fenyletylamin a tryptamin patří do skupiny vazoaktivních biogenních aminů. Vyšší koncentrace tyraminu v lidském organismu může vyvolat zvýšený krevní tlak, migrény, krvácení do mozku a srdeční selhání. Dále ovlivňuje dilataci zorniček, sekreci slz, slin, zvyšuje respiraci a hladinu cukru v krvi [3,13].

Výskyt agmatinu byl do 90. let 20. století omezen pouze na bakterie, rostliny a bezobratlé až v roce 1994 byl izolován z mozkových buněk savců. Agmatin plní řadu fyziologických funkcí, působí jako neurotransmitter nebo neuromodulátor. Jeho vazbou na imidazol a α_2 - receptory může ovlivnit tvorbu inzulinu a katecholaminů [14-16].

1.1.2 Vybrané poznatky o syntéze a katabolizmu biogenních aminů

Endogenní biogenní aminy jsou produkty metabolismu organismů za jejich života a v nízkých koncentracích se mohou vyskytovat ve všech potravinách, kam se prostřednictvím surovin dostanou. Exogenní biogenní aminy vznikají během fermentačních procesů nebo jsou důsledkem mikrobiální kontaminace [2,9].

Pro tvorbu významnějšího množství biogenních aminů v potravinách jsou nutné tři hlavní podmínky: přítomnost volných aminokyselin, výskyt mikroorganismů s pozitivní dekarboxylázovou aktivitou (pro daný biogenní amin) a příznivé podmínky pro růst těchto mikroorganismů, produkci enzymů a jejich aktivitu [1,3,4,7,13].

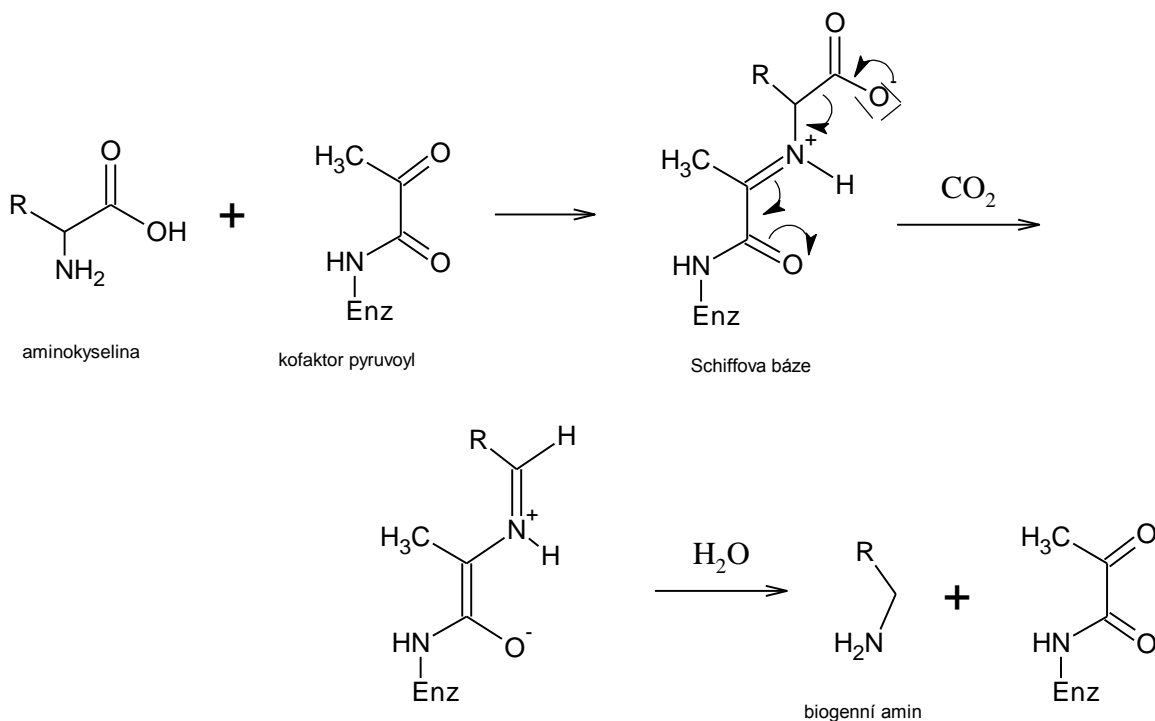
Primární biogenní aminy vznikají převážně dekarboxylací volných aminokyselin, sekundární a terciální aminy jsou tvořeny aminací a transaminací aldehydů a ketonů [1-4,9].

Dekarboxylace volných L-aminokyselin je reakce, při které je odštěpena α -karboxylová skupina a vzniká příslušný amin a oxid uhličitý. Tato reakce může probíhat dvěma mechanismy [4,9,17,18]. Oba mechanismy využívají delokalizaci π -elektronů. Reakcí aminoskupiny α -aminokyseliny s karbonylovou skupinou prosthetické skupiny enzymu vznikají přechodné iminosloučeniny nazývané jako Schiffovy báze [19]. Tyto sloučeniny jsou stabilizovány danými kofaktory. Jako kofaktor se reakce zúčastňuje pyruvoylový zbytek nebo pyridoxalfosfát. Vytvořená nová Schiffova báze je dekarboxylována a eliminací vody vzniká daný amin [4,9,17].

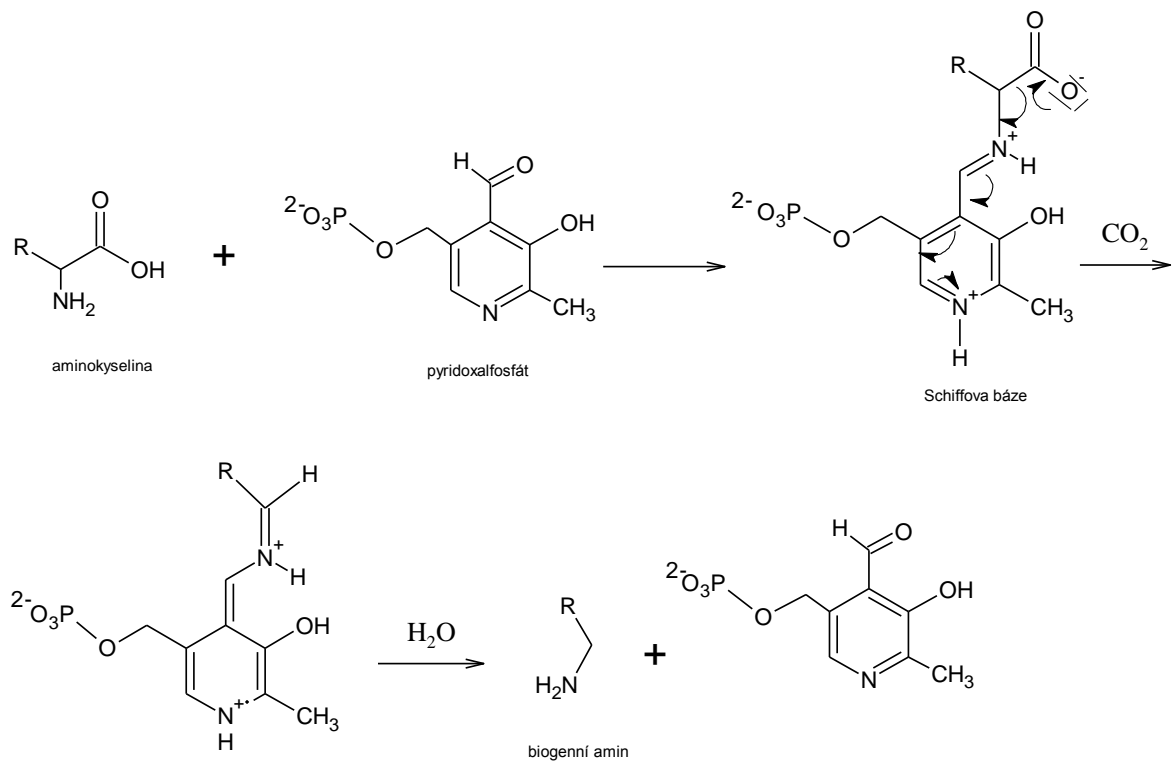
Na obrázku 1 je znázorněna dekarboxylace přes pyruvoylový zbytek a na obrázku 2 dekarboxylace přes pyridoxalfosfát.

Biosyntéza histaminu, na které se podílí enzym pyridoxalfosfát histidindekarboxyláza probíhá u G-negativních bakterií a savců. U G-pozitivních bakterií probíhá biosyntéza přes pyruvoylový zbytek [9,10,11].

Biogenní aminy jsou odvozeny od příslušných aminokyselin, které jsou uvedeny v tabulce 2.



Obrázek 1: Dekarboxylace L-aminokyselin přes pyruvoylový zbytek. Upraveno podle Bach et al [19].



Obrázek 2: Dekarboxylace L-aminokyselin přes pyridoxalfosfát. Upraveno podle Kohajdová et al. [9].

Tabulka 2: Aminokyseliny jako prekurzory biogenních aminů [2,4].

Aminokyselina	Biogenní amin	
histidin	histamin	
tryptofan	tryptamin	
tyrozin	tyramin	
fenylalanin	fenyletylamin	
lyzin	kadaverin	
arginin	agmatin	

Biogenní aminy se mohou dále transformovat na biologicky aktivní látky. Při těchto reakcích se uplatňují různé oxygenázy, transferázy a další enzymy [2,9].

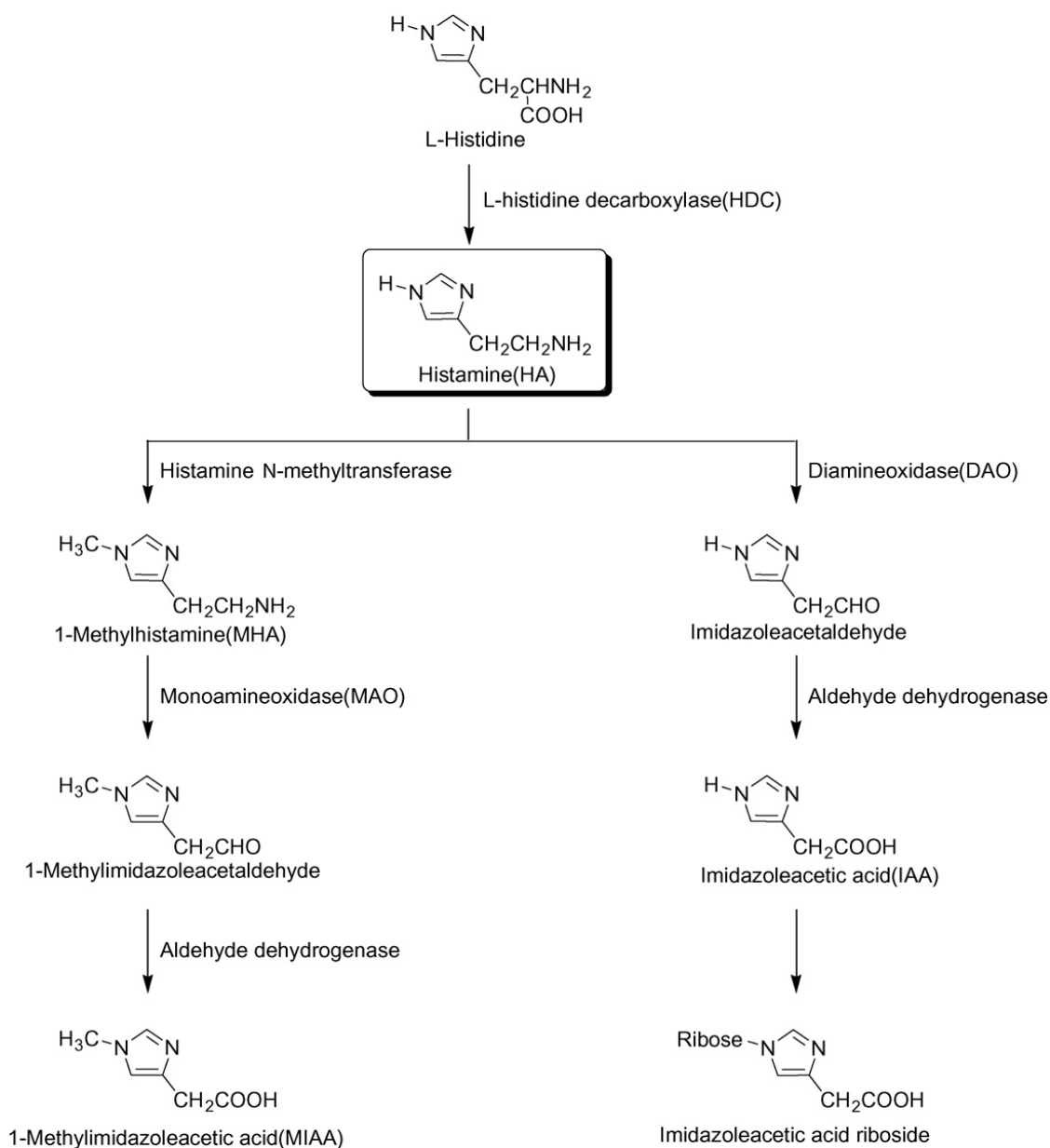
Histamin může být degradován dvěma různými cestami:

1. Metylací imidazolového kruhu enzymem histamin-N-metyltransferázou (HNMT; E.C.2.1.1.8) vzniká 1-methylhistamin, který je dále metabolizován monoaminoxidázou (MAO) a vzniká 1-methylimidazolacetaldehyd. Konečným produktem je 1-methylimidazoloctová kyselina. Reakce je katalyzovaná enzymem aldehyddehydrogená-

zou (ALDH, EC 1.2.1.5). 1-metylimidazoloctová kyselina je dále izomerizována a její izomer je odváděn do mozkomíšního moku [11].

2. Působením diaminooxidázy (DAO; E.C. 1.4.3.6) je tvořen imidazolacetaldehyd. Z imidazolacetaldehydu vzniká imidazoloctová kyselina, reakce se zúčastňuje enzym aldehyddehydrogenáza. Imidazoloctová kyselina je dále vázaná na ribózu [11,12].

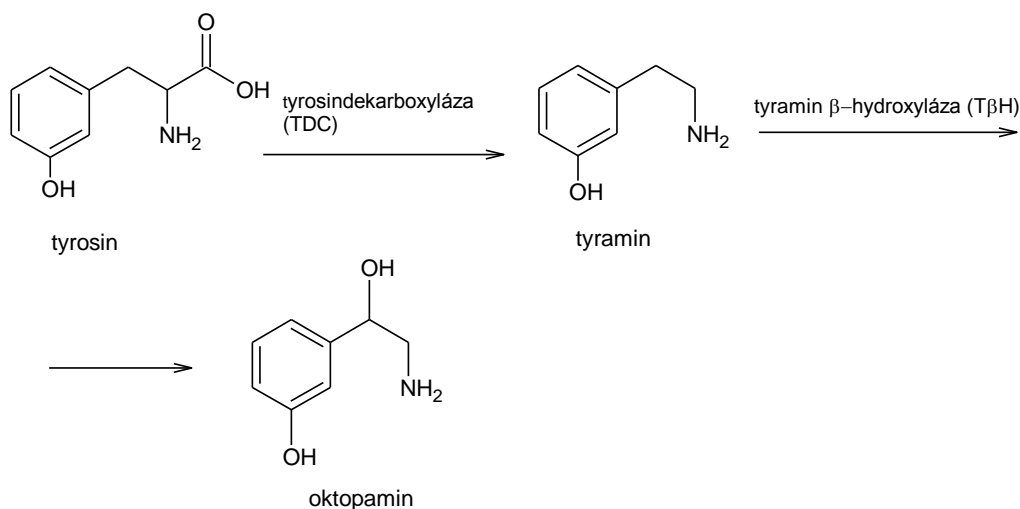
Metabolismus histaminu je znázorněn na obrázku 3.



Obrázek 3: Syntéza a katabolismus histaminu. Upraveno podle Toyo'oko [11].

Tyramin je rozkládán vlivem enzymu tyramin- β -hydroxylázy na oktopamin, který je dále metabolizován na další biologicky významné látky [2,20].

Metabolismus tyraminu je zobrazen na obrázku 4.


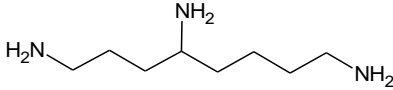
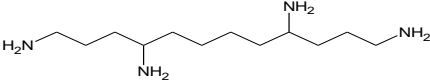


Obrázek 4: Metabolismus tyraminu. Upraveno podle Roeder et al. [20].

1.2 Polyaminy

Polyaminy objevil Antonie van Leeuwenhoek již v roce 1678, ale jako organické báze byly popsány o 150 let později [21,22,23]. Dříve se tyto sloučeniny zařazovaly do skupiny biogenních aminů, ale během 90. let 20. století se vyčlenily jako samostatná skupina [24,25]. Vyskytují se v rostlinných pletivech, mikroorganismech a v živočišných tkáních, kde plní řadu důležitých fyziologických funkcí [15,16,26-31]. Mezi polyaminy patří putrescin, spermin a spermidin [27,29,32]. Jsou to alifatické, nízkomolekulární organické sloučeniny se dvěma, třemi nebo čtyřmi aminoskupinami v molekule [16,28,31]. Jejich chemická struktura je znázorněna v tabulce 3. Ve vodě jsou rozpustné s hodnotou pK kolem 10 a úplně protonovány ve fyziologickém pH [15,26].

Tabulka 3: Systematický název a chemická struktura polyaminů [16,21-24,27,29].

Triviální název	Systematický název	Strukturní vzorec
putrescin	butan-1,4-diamin	
spermidin	<i>N</i> -(3-aminopropyl)butan-1,4-diamin	
spermin	<i>N,N'</i> -bis(3-aminopropyl)butan-1,4-diamin	

Putrescin se i přes svou strukturu diaminu klasifikuje jako polyamin, protože při biosyntéze zastává funkci prekursoru „pravých“ polyaminů spermidinu a sperminu. Tyto dva polyaminy vznikají biochemickou syntézou v živých organizmech [16,22]. Polyaminy se v organismu účastní důležitých pochodů, jako je syntéza DNA, RNA a syntéza proteinů [22,33,34]. Dále stabilizují buněčné membrány, regulují buněčný růst, profilaci a diferenciaci buněk a ovlivňují buněčnou smrt [35]. Spermin a spermidin jsou růstovými faktory pro savčí a bakteriální buňky [17]. Jejich obsah je vyšší v mladých a metabolicky aktivních rostlinných pletivech a živočišných tkáních [25]. Dále se mohou podílet na obnově a funkci střevního epitelu [36]. Spermin byl identifikován jako silný antioxidant [16]. Polyaminy se v těle podílejí na růstu a množení buněk, jako pozitivní projev mají při hojení ran [37].

Vznik polyaminů je v těle zajišťován třemi základními procesy vnitřní biosyntézou, činností střevních mikroorganismů a příjmem potravy [24,29].

1.2.1 Vybrané poznatky o syntéze a katabolismu polyaminů

Biosyntéza polyaminů

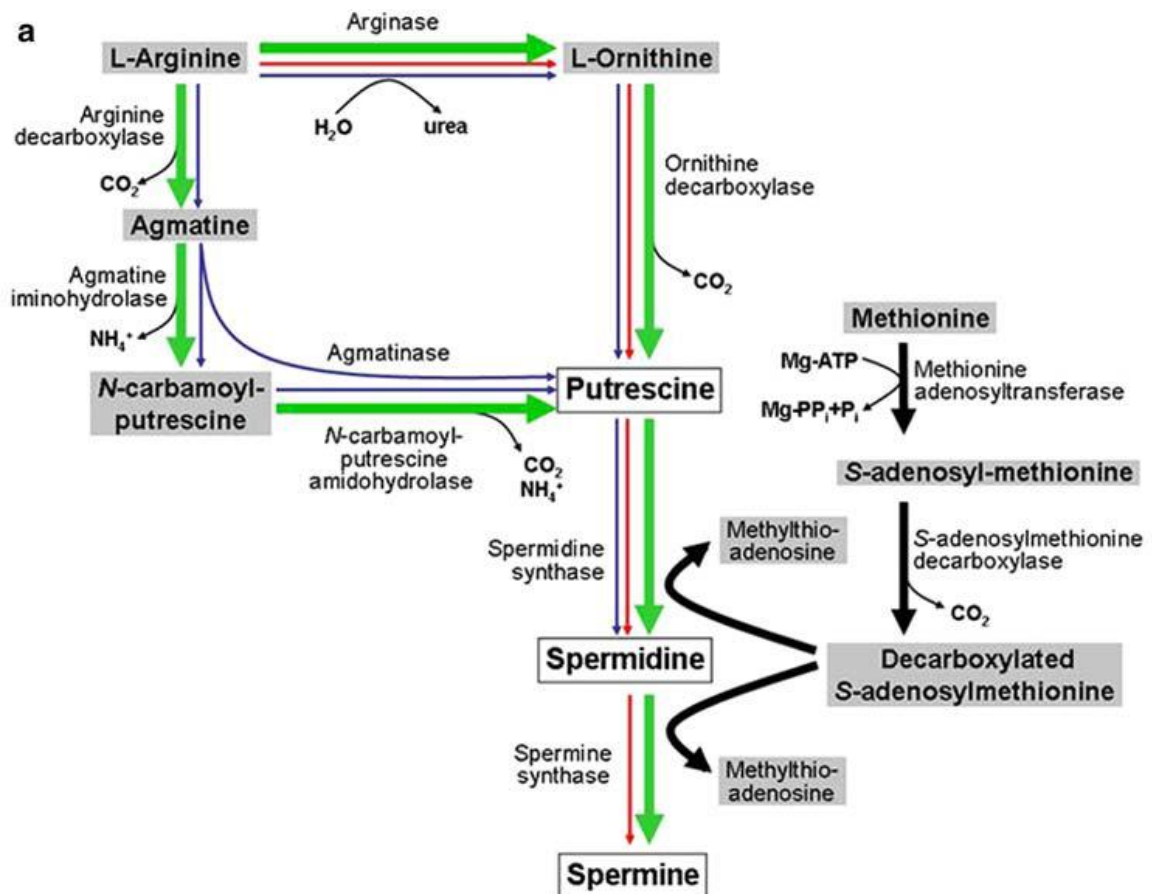
Putrescin může být v buňkách syntetizován z L-argininu přes L-ornitin. Reakce je katalyzovaná ornitindekarboxylázou (ODC, EC 4.1.1.17). Tato syntéza může probíhat ve všech buňkách [15-17,26-29,31,32].

V rostlinných pletivech a u Gram-negativních bakterií může putrescin vznikat dekarboxylací aminokyseliny L-argininu, působením enzymu arginindekarboxylázy (ADC, EC 4.1.1.19) vzniká agmatin. Reakce přeměny agmatinu na putrescin je katalyzovaná enzymem agmatinázou (EC 3.5.3.11). Agmatin je charakteristický pro rostliny, bakterie

a bezobratlé. U Gram-pozitivních i některých Gram-negativních bakterií například Landete *et al.* [38] uvádí, že bakterie *Pseudomonas aeruginosa*, která patří do skupiny Gram-negativních bakterií, obsahuje gen pro syntézu putrescinu přes *N*-karbamoylputrescin. Syntéza putrescinu probíhá přeměnou agmatinu na *N*-karbamoylputrescin. Reakce je katalyzovaná enzymem agmatiniminohydrolázou (AIH, EC 3.5.3.12). Enzym *N*-karbamoylputrescinamidohydroláza (NCPAH, EC 3.5.1.53) se zúčastňuje přeměny *N*-karbamoylputrescin na putrescin [28,31,38,39]. Spermidin a spermin se odvozují z putrescinu připojením dvou aminopropylových skupin. Tato syntéza se uskutečňuje pomocí aminopropyltransferáz (spermidinsyntázy, EC 2.5.1.16 a sperminsyntázy, EC 2.5.1.22). Aminopropylskupinu do systému poskytuje *S*-adenosyl-*S*-methylhomocysteamin, který vzniká z *S*-adenosylmetioninu (SAM) působením SAM-dekarboxylázy (SAMdc, EC 4.1.1.50) [15-17,27 -29,31,32,38,39]. Diaminopropanová část spermidinu a sperminu je odvozena L-metioninu [17]. Tato aminokyselina při reakci s ATP v přítomnosti Mg^{2+} iontů poskytuje methylovou skupinu komplexu *S*-adenosylmetioninu, který vstupuje do biosyntézy spermidinu a sperminu [15,17,38,39].

Biosyntéza polyaminů je znázorněna na obrázku 5.

Transformace agmatinu je v rostlinných buňkách a bakterií vnímána jako jedna z hlavních cest pro syntézu polyaminů. Z agmatinu vzniká putrescin, meziproduktem reakce je *N*-karbamoylputrescin. Tyto reakce jsou katalyzovány agmatiniminohydrolázou (AIH, EC 3.5.3.12) a *N*-karbamoylputrescinamidohydroláza (NCPAH, EC 3.5.1.53) [14,40].



Obrázek 5: Biosyntéza polyaminů. Upraveno podle Kusano et al. [39].

Katabolismus polyaminů

V živočišných buňkách může vznikat putrescin ze sperminu přes spermidin. Produktem těchto reakcí jsou N^1 -acetylspermidin a spermin [35,41]. Reakce probíhají pomocí acetyl-CoA a jsou katalyzovány enzymy spermidin/spermin N^1 -acetyltransferázy (SSAT, EC 2.3.1.57) [17,35,41]. N^1 -acetyl deriváty jsou oxidovány pomocí flavinadenin dinukleotidu (FAD) působením enzymu polyaminoxidázy (PO, EC 1.5.3.11) a vzniká spermidin respektive putrescin. Konečnými produkty oxidace acetylovaných polyaminů je vznik 3-acetamidopropanolu, 3-aminopropanalu [24,41]. Spermidin ze sperminu také může vznikat přímo působením sperminoxidázy a flavinadenin dinukleotidu (FAD) [39].

V bakteriální buňce přeměna sperminu na spermidin neprobíhá. Spermin i spermidin je oxidován působením enzymu polyaminoxidázy (PO, EC 1.5.3.11) a konečnými produkty reakcí jsou 4-aminobutanal, 1,3-diaminopropan a N-(3-aminopropyl)-4-aminobutanal.

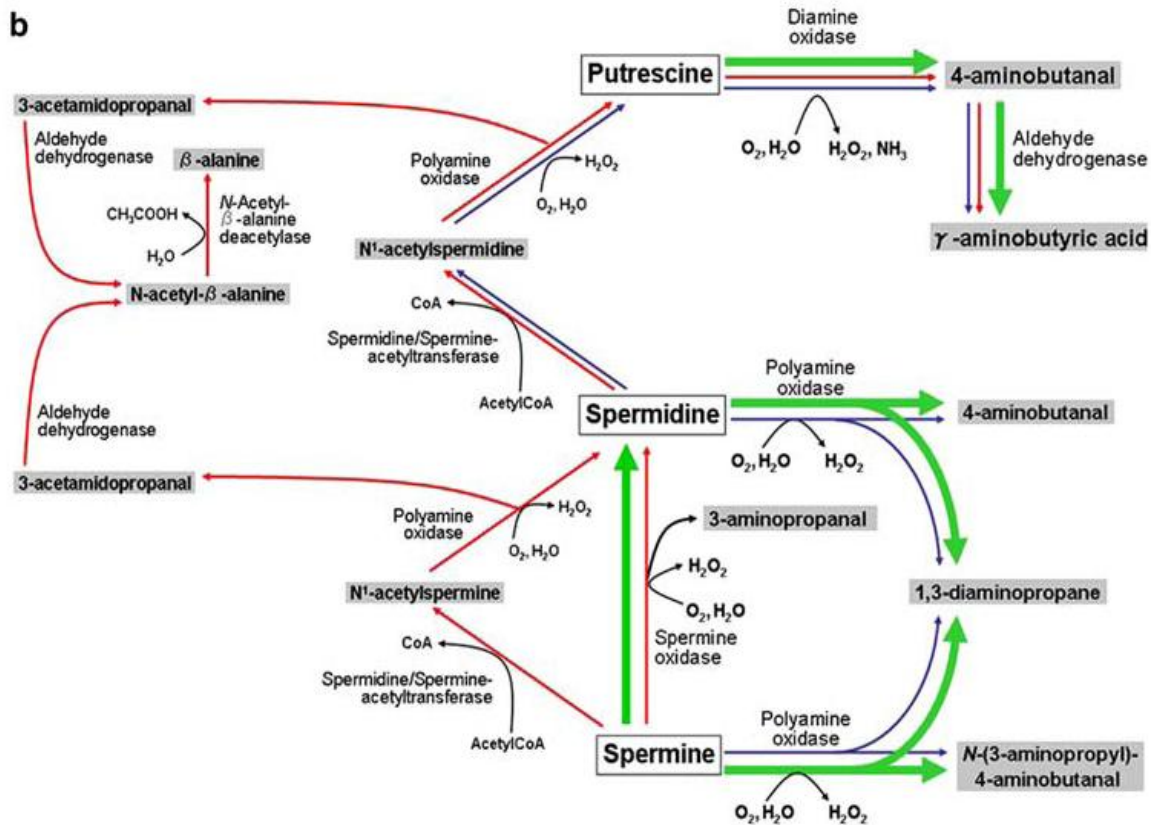
V těchto buňkách vzniká putrescin ze spermidinu přes N^1 -acetyl derivát jako v živočišné buňce [39].

U rostlin probíhá syntéza spermidinu ze sperminu působením sperminoxidázy a flavinadeninukleotidu (FAD). Spermidin podléhá oxidaci a konečnými produkty jsou 4-aminobutanal, 1,3-diaminopropan a N-(3-aminopropyl)-4-aminobutanal. V rostlinných buňkách je tento proces označován jako sekundární metabolismus polyaminů [39].

Některé produkty oxidace jako například peroxid vodíku, akrolein, 4-aminobutanal a 3-acetamidopropanol jsou pro buňky toxické a mohou způsobit jejich smrt. Vzájemná přeměna sperminu, spermidinu a putrescinu probíhá v živém organismu velmi rychle [35,41].

Závěrečná část katabolizmu je oxidační deaminace putrescinu. Putrescin může být při této reakci přeměněn na γ -aminobutyryát (GABA) působením diaminooxidázy (DAO) [15,29,35,41]. Reakce je katalyzována enzymem pyrrolindehydrogenáza (PDH). GABA je transaminována a následně oxidována na sukcinát, který vstupuje do citrátového cyklu. Zde je zajištěna recyklace uhlíku a dusíku z putrescinu [17]. Oxidace putrescinu probíhá ve všech typech buněk [39].

Katabolizmus polyaminů je znázorněn na obrázku 6.



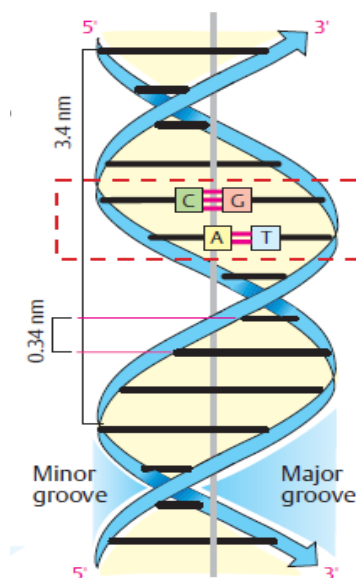
Obrázek 6: Katabolismus polyaminů. Upraveno podle Kusano et al. [39].

1.2.2 Vybrané interakce polyaminů

Polyaminy se v buňkách vyskytují ve třech různých formách jako volné kationty, vázané k malým molekulám jako jsou fenolické kyseliny [33,34] a dále se mohou vázat elektrostatickými silami k negativně nabitým makromolekulám, jako jsou nukleové kyseliny (DNA, RNA a tRNA) a fosfolipidy [22,33,34]. Tyto iontové interakce jsou vratné a vedou ke stabilizaci makromolekul, membrán a některých proteinů [22,24] Z těchto vazeb mohou být uvolněny hydrolýzou silnou kyselinou [24].

Interakce polyaminů s nukleovými kyselinami mohou chránit DNA proti tepelné denaturaci a rentgenovému záření. Dále mohou vyvolávat změny ve struktuře DNA a RNA a tak ovlivňují přenos genetické informace [22].

Spermin se váže vodíkovými vazbami na velký žlábek, zatímco spermidin a putrescin na malý žlábek molekuly DNA [22,32]. Malý a velký žlábek jsou místa na povrchu molekuly DNA, která umožňují interakce [17,42,43] například s bílkovinami, antibiotiky a dalšími látkami [18]. Vodrážka [18] tyto místa nazývá jako malá a velká rýha. Molekula DNA je vyobrazena na obrázku 7. K reaktivním místům na molekule DNA patří na velkém žlábku atom dusíku na sedmé pozici na purinu, atom kyslíku a metylová skupina na thyminu a na malém žlábku je to atom dusíku na třetí pozici na purinu a atom kyslíku na pyrimidinu. Polyaminy se k těmto místům DNA vážou elektrostatickými vazbami a mohou tak chránit molekulu DNA před degradací [32].



Obrázek 7 Struktura molekuly DNA. Upraveno podle Koolman et. al. [43].

Vazby mezi polyaminy a RNA jsou podle některých studií slabé interakce, protože musí zajistit rychlý přenos informace z DNA do proteosyntetických pochodů. Rychle rostoucí prokaryotická buňka obsahuje hlavně putrescin a spermidin. Protože spermin se v eukaryotické buňce na proteosyntéze podílí v malých koncentracích, je tato syntéza biochemicky a energeticky výhodná [27].

Polyaminy se podílí na regulaci některých enzymů například proteinkináz [22,32]. Dále mohou vytvářet komplexy s kovovými ionty. Ionty kovů se běžně vyskytují v živých buňkách, a proto mají vliv na reakce mezi polyaminem a nukleotidem. Tyto ionty mohou blo-

kovat reaktivní místa na molekule polyaminu a tím ovlivnit interakce mezi molekuly DNA. Mezi tyto kovy patří měďnaté, kobaltnaté nebo platinové ionty [44].

1.3 Některé reakce biogenních aminů

Biogenní aminy a polyaminy jsou reaktivní látky [2]. Jejich reaktivita je způsobena volným elektronovým párem na atomu dusíku [46,45]. Histamin ve své struktuře obsahuje dva atomy dusíku, jeden na imidazolovém kruhu a druhý na postranním řetězci. Ve fyziologickém pH existují dva tautomery histaminu a do reakce vstupuje aminoskupina imidazolového kruhu i postranního řetězce [47].

Aminoskupina biogenních aminů může reagovat s oxidy dusíku a poskytovat nitrosaminy. Tato skupina představuje pro lidský organizmus zdravotní riziko [2,7,9,18,48].

Látky N-nitrosodimethylamin a N-nitrosodiethylamin patří do skupiny karcinogenních látek, u N-nitrosodibutylaminu, N-nitrosopiperidinu a N-nitrosopyrrolidinu je možné zdravotní riziko očekávat. Při zvýšené koncentraci biogenních aminů zvláště spermidinu, dusitanu sodného a teploty je očekáván zvýšený vznik N-nitrosodimethylaminu. Vznik N-nitrosopiperidinu je průkazný v přítomnosti spermidinu a kadaverinu, reakce probíhá za zvýšené teploty [48].

Dále mohou biogenní aminy reagovat s triacylglyceroly za zvýšené teploty nebo dlouhodobým skladováním a vznikají amidy mastných kyselin. Mohou vstupovat do reakcí neenzymového hnědnutí a s reakcí s bílkovinami vznikají β -N-substituované deriváty diaminopropionové kyseliny [2].

2 VÝSKYT BIOGENNÍCH AMINŮ A POLYAMINŮ V POTRAVINÁCH

Mezi důležité biogenní aminy obsažené v potravinách patří histamin, β -fenyletylamin, tyramin, tryptamin, kadaverin a z polyaminů putrescin, spermidin a spermin [13,49]. Biogenní aminy a polyaminy se vyskytují v potravinách rostlinného i živočišného původu [29]. Tyto potraviny obsahují bílkoviny nebo volné aminokyseliny, které umožňují jejich mikrobiální nebo biochemickou přeměnu [3,7,49]. Množství kolísá od několika nmol až μ mol/g a je závislé na druhu, zpracování (např. ve fermentovaných potravinách jsou biogenní aminy a polyaminy přirozenou složkou, u nefermentovaných je jejich výskyt spojen s nežádoucím rozkladem bílkovin) a skladování potraviny [3,29].

Polyaminy spermin a spermidin, které jsou v čerstvé potravíně, pochází z rostlinných pletiv a jsou tedy přirozenou složkou potravin. Jen nepatrné množství je tvořeno přítomnou mikroflórou. V potravinách rostlinného původu se ve vyšších koncentracích vyskytuje putrescin, pak následuje spermidin a spermin. Tyto dva polyaminy se objevují souběžně ve stejných potravinách. U potravin rostlinného původu je obsah spermidinu vyšší než sperminu, v potravinách živočišného původu je to naopak [24,29]. V rostlinných pletivech je spermin zpětně syntetizován na spermidin a pro rostlinné buňky je spermin využitelný jen v prahových koncentracích [50]. Zvýšený obsah putrescinu je obvykle spojen s nežádoucím rozkladem bílkovin [24,29].

2.1 Biogenní aminy a polyaminy v potravinách rostlinného původu

Ovoce a zelenina obsahují biogenní aminy v různých koncentracích, obsah se zvyšuje se stupněm zralosti [51]. Nejčastějším biogenním aminem vyskytující se v ovoci a zelenině je tryptamin dále to je tyramin a noradrenalin [3,51], z polyaminů je to především putrescin [29]. Tyramin byl nalezen ve vyšších koncentracích v bramborách, paprice, rajčatech a kapustě [52]. Histamin a kadaverin byl stanoven v karagenanech z řas a ve špenátu. Fenylylamin můžeme nalézt v kakaových bobech. Dále byl detekován v některých druzích hub [3,51]. V houbách byl stanoven vyšší obsah spermidinu [29]. Obsah biogenních aminů v ovoci a zelenině se může zvyšovat během nevhodného skladování [2]. Biogenní aminy jsou v ovoci přirozenou složkou rostlinných pletiv, a proto mohou být stanoveny ve finálních výrobcích. Například putrescin byl stanoven v ovocných džusech [3,52], tyramin

v kečupech a rajském protlaku [52], fenyletylamin se vyskytuje v čokoládě a cukrovinkách, které obsahují čokoládu [3,51].

V kysaném zelí byl stanoven histamin po deseti týdnech kvašení, v solném láku to byl putrescin [3,51].

Zelené kávové boby obsahují především polyaminy putrescin, spermidin a spermin, ze skupiny biogenních aminů to jsou v nízkých koncentracích tyramin, kadaverin a histamin. Přítomnost biogenních aminů závisí na druhu, původu, podmínkách skladování a sensorických vlastnostech kávy. Méně kvalitní káva může obsahovat větší koncentraci putrescinu, histaminu a tryptaminu. Během pražení kávy se výskyt biogenních aminů snižuje nebo úplně vylučuje. V pražené kávě byl stanoven agmatin, který byl při tepelném zpracování vyváznut z konjugovaných forem [53].

Pivo může obsahovat vyšší koncentrace aminů. Ze surovin pro výrobu piva je za zdroj biogenních aminů považován slad, který obsahuje putrescin, spermidin, spermin a agmatin. Koncentrace histaminu, fenyletylaminu, tryptaminu a kadaverinu se zvyšuje během klíčení ječmene. Obsah tyraminu se zvýšil nepatrně. Největší nárůst histaminu, tyraminu a kadaverinu je patrný při hlavním kvašení piva. Aminy mohou být tvořeny i během skladování piva. Zvýšení obsahu biogenních aminů může docházet při sekundárním kvašení speciálních piv v láhvi. Množství putrescinu a kadaverinu se významně nemění [54]. Zvýšená koncentrace histaminu, tyraminu a kadaverinu může signalizovat aktivitu kontaminujících mikroorganismů vznikající během výroby piva [3,54].

Víno patří mezi potraviny, ve kterých se vyskytují různé biogenní aminy ve velkém množství [4]. Obsah biogenních aminů a polyaminů je vyšší u červených vín. Nejčastěji jsou přítomny putrescin, spermidin a histamin. Tyto látky do vína přechází z hroznů při lisování. Biogenní aminy mohou být tvořeny převážně během jablečno-mléčného kvašení. V první fázi výroby vína vzniká histamin a tyramin. V další fázi se tvoří kadaverin a putrescin. Přítomnost biogenních aminů ve víně vytváří charakteristické organoleptické vlastnosti [55,56].

2.2 Biogenní aminy a polyaminy v potravinách živočišného původu

V rybím mase se ve velké míře vyskytuje především histamin. Mikroorganismy běžně přítomné v rybím mase dekarboxylují histidin za nízkých teplot a vytváří histamin [1-3,51].

K dalším biogenním aminům a polyaminům, které byly detekovány v rybím mase, patří putrescin, kadaverin, tyramin, spermin a spermidin. Tyto látky mohou přecházet i po zpracování do finálních výrobků. Ani nízké teploty při skladování nezabrání tvorbě biogenních aminů a polyaminů a to představuje velké toxikologické riziko pro konzumenty [3,51]. Přípustný obsah histaminu v rybách a výrobků z ryb je v rámci Evropské unie ošetřen Nařízením komise (ES) č. 2073/2005 v platném znění [57].

V mase převažují tyramin, kadaverin, putrescin a histamin. Spermin a spermidin jsou přirozenou součástí čerstvého masa [3,49,51]. Tyramin, kadaverin, putrescin jsou tvořeny během skladování masa a masných výrobků [3,49]. Vyšší obsah tyraminu byl stanoven na povrchu hovězího masa, který jde odstranit důkladným omytím před zpracováním [49].

Kadaverin a histamin mohou sloužit jako indikátory hygienické kvality surovin a výrobních prostorů. Velký rozdíl obsahu biogenních aminů je mezi domácí a průmyslovou výrobou. Vyšší obsah je očekáván při domácí výrobě [49,51]. Vznik biogenních aminů ve fermentovaných masných výrobcích je závislý na mnoha vnějších a vnitřních faktorech jako jsou podmínky skladování, vstupní surovina a přídatné látky a fyzikálně-chemické a proteolytické parametry [59,60,58]. K nejvíce zastoupeným biogenním aminem je tyramin a kadaverin a polyamin putrescin [49,58].

Polyaminy jsou přirozenou složkou kravského mléka [36], nejvyšší obsah ve mléce má putrescin a spermidin a tyto polyaminy lze stanovit i po zpracování ve finálních výrobcích [29].

Sýry patří mezi potraviny s vyšším rizikem tvorby biogenních aminů a polyaminů. Obsahují histamin, tyramin, tryptamin, kadaverin, fenylethylamin a polyamin putrescin [3,51]. Obsah je závislý na druhu použité startovací kultury při výrobě daného sýra [3,61]. Koncentrace se může zvyšovat vlivem působení kontaminující mikroflóry. Množství roste během zrání a skladování [61-64].

3 METODY STANOVENÍ BIOGENNÍCH AMINŮ A POLYAMINŮ

Stanovení biogenních aminů a polyaminů je důležité vzhledem jejich možné toxicitě a ke sledování zdravotní nezávadnosti potravin. Analýza může být provedena pro zjištění kvality vstupních surovin, meziproduktů, finálních výrobků, ale také při sledování fermentačních procesů, skladování a dalších technologických operací např. zrání [65,67,68,72].

Pro stanovení biogenních aminů a polyaminů v potravinách byla vyvinuta celá řada metod [37,65]. Vzhledem různé struktuře těchto látek a charakteru vzorku není jednoduché vybrat vhodnou metodu [68]. Ke stanovení biogenních aminů se nejčastěji používají chromatografické metody. Jako je kapalinová chromatografie (LC), iontově–výměnná chromatografie (IEC), tenkovrstvá chromatografie (TLC) a plynová chromatografie (GC) [7,37,65,67-75].

K dalším metodám patří elektromigrační metody (kapilární elektroforéza (CE)) [37,56,65,68,69,71,74,75], enzymatické (ELISA) a imuno-enzymatické metody [56,69].

Pro stanovení producentů biogenních aminů a polyaminů se využívají molekulární metody. K základní molekulární metodě patří polymerázová řetězová reakce (PCR) [56,73,76].

3.1 Kapalinová chromatografie

Pro stanovení biogenních aminů a polyaminů se využívá vysoce účinná kapalinová chromatografie (HPLC) [7,37,56,65-68,72]. Je to varianta kolonové chromatografie [77,78]. Výhodami této metody jsou vysoká citlivost a rychlost analýzy a značná reprodukovatelnost [77].

Biogenní aminy a polyaminy nelze přímo detekovat v UV/VIS oblasti a ani fluorimetricky, a proto je nutné vzorky před detekcí derivatizovat. Mezi derivatizační činidla v pre-kolonovém uspořádání patří: dansylchlorid (5-(diametylamino)naftalen-1-sulfonylchlorid), fluorescein, isothiokyanát, fenylisothiokyanát, benzoylchlorid, fluorescamin, o-phtalaldehyd, 9-fluorenylmethoxycarbonylchlorid [7,37,56,65,67,68,72,79].

Pro post-kolonovou derivatizaci se využívá nihydrin nebo o-phtalaldehyd [7,72,79].

Dansylchlorid je nejběžnějším derivatizačním činidlem pro pre-kolonovou derivatizaci. Poskytuje barevné produkty, které jsou při pokojové teplotě stabilní a lze je detekovat spektrofotometricky při 254 nm [7,68,79,80].

Metoda HPLC je využívána v různých modifikacích například RP-HPLC (chromatografie s reverzními fázemi), kdy stacionární fáze je nepolární a mobilní fáze je polární [77]. Nově je využívána ultra vysoce účinná kapalinová chromatografie UHPLC [68,72,75].

Mezi další chromatografické metody patří iontově–výměnná chromatografie. Tato metoda je založena na adsorpci složek vzorku na opačně nabitě skupiny imobilizované v částicích nosiče. K uvolnění složek dochází změnou podmínek, většinou pH, iontové síly a teploty [77,81]. Hlavní nevýhoda této metody je derivatizace. Derivatizace může být pre-kolonová, post-kolonová a na koloně. Dalšími nevýhodami je dlouhá doba analýzy, nízká reprodukovatelnost a nízká stabilita derivatizačních produktů. Výhodou se zdá být spojení post-kolonové derivatizace a úprava pH [82]. Při použití konduktometru jako detektoru, odpadá krok derivatizace a k detekci se využívá měření vodivosti eluátu. Faravo *et al.* [82] stanovil biogenní aminy v mase a masných výrobcích pomocí iontově–výměnné chromatografie s pulsní amperometrickou detekcí na Au elektrodě.

Tenkovrstvá chromatografie (TLC) patří mezi první metody pro kvalitativní analýzu biogenních aminů v potravinách. Je to jednoduchá, rychlá metoda a je nenáročná na instrumentaci [7,13,56,65,71,77,83]. Ke stanovení lze použít modifikaci TLC vysoce účinnou tenkovrstvou chromatografií HPTLC [71,77]. Detekce je prováděna po derivatizaci dan-sylchloridem vizuálně nebo denzitometricky při 254 nm [13,65].

3.2 Plynová chromatografie

Plynová chromatografie se pro stanovení biogenních aminů a polyaminů často nevyužívá. Biogenní aminy polyaminy jsou stanoveny jako trifluoroacetyl-, trimetylsilyl- nebo 2,4-dinitrofenylderiváty [7]. K detekci se používá plamenový ionizační detektor (FID), detektor elektronového záchytu (ECD), plamenový ionizační detektor s alkalickým kovem (AFID) a hmotnostní spektrometr (MS) [7,71].

3.3 Kapilární elektroforéza

Kapilární elektroforéza (CE) patří mezi elektromigrační metody a využívá elektrokinetických principů elektroforézy a elektroosmózy k separaci látek uvnitř křemenné kapiláry [77].

Metoda je vhodná pro separaci biogenních aminů polyaminů ze složitých biologických vzorků. Vyznačuje se především vysokou účinností, krátkou dobou analýzy a minimálním množstvím činidel a vzorku [56,74].

Aromatické a heterocyklické biogenní aminy se mohou stanovit bez derivatizace po výběru vhodného pufru. Polyaminy se detekují buď v derivatizovaném vzorku kapilární elektroforézou nebo bez derivatizace, ale musí být použita nepřímá metoda detekce například konduktometrická detekce [56,74,84].

Při stanovení se využívá technika micelární elektrokinetická kapilární chromatografie (MECC) [56,71] a použitím povrchově aktivních látek jako dodecylsulfát sodný (SDS) nebo cetylamonium bromid. K dalším technikám patří spojení kapilární chromatografie s fluorescenčním detektorem (LEDIF) [74], vysokotlaká kapilární elektroforéza (HPCE) pro stanovení biogenních aminů ve víně [56].

3.4 Imuno-enzymatické metody

K imuno-enzymatickým metodám patří tzv. ELISA metody (enzyme linked immunosorbent assay). Metoda využívá imunochemické reakce antigenu a protilátky. Tyto metody jsou kvalitativní a slouží pro rutinní analýzu. V praxi se tato metoda využívá pro stanovení histaminu. Technika využívá různou schopnost absorpce biogenních aminů a polyaminů s polymerní vrstvou. Detekce je prováděna vizuálně srovnáním s referenční barevnou škálou a v poslední době se využívá počítačových programů pro vyhodnocení zbarvení nebo optických metod [56,69].

4 TOXICITA BIOGENNÍCH AMINŮ A POLYAMINŮ

Biogenní aminy a polyaminy mají v lidském organismu své fyziologické účinky, ale konzumace potravin s vysokým obsahem těchto látek může vést až k toxickým účinkům. Intoxikace má obvykle mírný průběh a příznaky mizí během několika hodin, ale u některých jedinců mohou vést k vážným zdravotním komplikacím. Mezi projevy intoxikace patří kožní (kopřivky, vyrážky, otoky), nervové poruchy, nevolnost, zvracení, průjmy, bušení srdce a další [36].

Normální příjem biogenních aminů a polyaminů je u savců metabolizován v trávicím traktu. Hlavní úlohu zde mají přítomné enzymy monoaminoxidázy a diaminoxidázy. Mají omezenou kapacitu a při zvýšeném příjmu se do krevního oběhu dostávají oxidační produkty biogenních aminů a polyaminů. Aktivitu enzymů může snižovat příjem alkoholu, který je odbouráván přednostně, dále to mohou být léky tzv. inhibitory monoaminoxidáz [4,9,10,13,36].

V praxi je známa otrava histaminem a tyraminem. Toxicitu histaminu může zvyšovat přítomnost putrescinu a kadaverinu, protože mají vyšší afinitu k diaminoxidázám, dochází k vyčerpání diaminoxidáz pro histamin. Příznaky se mohou projevit do pěti minut. Mezi rizikové potraviny patří ryby makrelovitého nebo sledřovitého typu. Tyramin může vyvolat migrény a hypertenzní krize, které jsou někdy popisovány jako tzv. „reakce na sýr“ [85].

Toxicita polyaminů nebyla popsána, ale jsou nebezpečné pro jejich možné reakce s oxidem dusnatým za vzniku stabilních karcinogenních N-nitrosoaminů, během skladování, konzervace a vaření potravin [1,7,9,79] Iniciátorem této reakce je oxid dusnatý, který vzniká z dusitanů, které jsou součástí přísad hlavně v masném průmyslu [18]. Zahříváním putrescinu se tvoří pyrolidin a z kadaverinu piperidin a z těchto sloučenin působením tepla vznikají N-nitrosopyrolidin a N-nitrosopiperidin [1,7,9,48].

4.1 Toxické dávky biogenní aminů a polyaminů

Toxické dávky biogenních aminů a polyaminů je v potravinách obtížné stanovit, protože jsou velké rozdíly ve funkčnosti detoxifikačního systému konzumentů [3,7,64]. Dále záleží na charakteru potraviny a nápojů a na přítomnosti biogenních aminů a polyaminů [54,65].

Obecně se předpokládá, že koncentrace histaminu 8-40 mg kg⁻¹ je netoxická [3,65]. Množství 40-100 mg kg⁻¹ vyvolá mírnou otravu a obsah nad 100 mg kg⁻¹ se považuje za toxický [54,65]. Toxická dávka v potravinách bývá uváděna pro tyramin 1080 mg kg⁻¹ [65]. Ruiz-Capillas a Jiménez-Colmenero [66] uvádí, že toxická dávka pro tyramin je již 125 mg kg⁻¹, McCabe-Sellers *et al.*[85] pokládá za mezní limity v potravinách pro tyramin 200-800 mg kg⁻¹, zatímco Silla-Santos [3] pokládá za toxickou dávku pro tyramin 100 mg kg⁻¹. Za toxické hodnoty pro fenyletylamin se uvádí 30 mg kg⁻¹ [2]. Pro ostatní biogenní aminy nebyly mezní hodnoty uvedeny. Některé potraviny mohou obsahovat více biogenních aminů, a proto např. u sýrů součet tyraminu, histaminu, putrescinu a kadaverinu by neměl překročit 900 mg kg⁻¹ [55].

4.2 Legislativní limity biogenních aminů a polyaminů

V České republice je podle Nařízení komise (ES) č. 2073/2005 stanoven limit pouze pro histamin. A to pro produkty rybolovu z druhů ryb spojovaných s vysokým množstvím histidinu. Povolený limit je 100 – 200 mg kg⁻¹. A pro produkty rybolovu, které byly ošetřeny enzymatickým zráním v láku vyrobených z ryb s vysokým obsahem histidinu. Pro tuto skupinu je povolený limit 200-400 mg kg⁻¹ [57].

V 90. letech 20. století a v první části minulé dekády byly vyhláškou č.298/1997 Sb. stanoveny limity pro histamin v rybách, rybích výrobcích 200 mg kg⁻¹, pivu a vínu 20 mg kg⁻¹. Dále to byl tyramin pro sýry tvrdé, měkké, zrající 200 mg kg⁻¹, olomoucké tvarůžky 350 mg kg⁻¹ a pro červená vína 50 mg kg⁻¹ a pro vybranou skupinu potravin ve vyhlášce označenou jako skupina A 100 mg kg⁻¹. Do skupiny A patří například tyto potraviny mléko, kojenecká a dětská výživa, vepřové a hovězí maso, hotové pokrmy, zmrazené hotové pokrmy a polotovary, drůbež, mouka, rýže, pečivo, těstoviny, zelenina a výrobky ze zeleniny, nealkoholické nápoje, čaj a další [86].

II. PRAKTICKÁ ČÁST

5 CÍL PRÁCE

Cílem diplomové práce byl monitoring obsahu biogenních aminů ve vybraných vzorcích fermentovaných potravin živočišného původu získané z běžné obchodní sítě a sledovat změnu jejich obsahu během chladírenského skladování.

Pro dosažení výše zmíněného cíle bylo nutné:

v teoretické části popsat:

- Vznik biogenních aminů a způsob jejich stanovení,
- Výskyt biogenních aminů v potravinách a změny během skladování,
- Charakterizovat legislativní limity pro výskyt biogenních aminů v potravinách.

v praktické části bylo nutné naplnit tyto dílčí cíle:

- Stanovit biogenní aminy ve vybraných skupinách vzorků,
- Sledovat změny obsahu biogenních aminů během chladírenského skladování,
- Na základě teoretické části a výsledků formulovat závěr.

6 MATERIÁL A METODY

6.1 Charakteristika vzorků

V experimentální části diplomové práce byl stanoven obsah biogenních aminů ve vybraných fermentovaných potravinách živočišného původu. Potraviny byly zakoupeny v běžné obchodní síti. Ke stanovení bylo použito 24 vzorků (15 vzorků sýrů a 9 vzorků fermentovaných masných výrobků). Vzorky byly rozděleny do 6 skupin. Skupiny vzorků jsou uvedeny v tabulce 4. Všechny vzorky byly skladovány po celou dobu experimentu (od zakoupení do konce doby použitelnosti, resp. doby minimální trvanlivosti) v lednici při teplotě $6\pm 2^\circ\text{C}$.

Tabulka 4: Skupiny vzorků.

Skupina	Označení skupiny	Počet vzorků	Označení vzorků	Počet dní skladování
1.	sýry s plísní na povrchu	3	A	18
			B	22
			C	18
2.	sýry s plísní uvnitř hmoty	5	D	14
			E	20
			F	19
			G	17
3.	sýry dvouplísňové	1	I	18
4.	sýry s ementálského typu	3	J	78
			K	65
			L	70
5.	sýry ostatní	3	M	17
			N	17
			O	17
6.	trvanlivé fermentované masné výrobky	9	P	70
			Q	36
			R	24
			S	70
			T	62
			U	70
			V	58
			X	63
Z	46			

6.2 Extrakce biogenních aminů

Před stanovením biogenních aminů byla provedena lyofilizace. Vzorek byl navážen (10–15 g) do hliníkového kelímku, který byl na 24 hodin umístěn do hlubokomrazicího boxu o teplotě -80°C a následně zlyofilizován (ALPHA 1-4 LSC, CHRIST). Po lyofilizaci byl vzorek dezintegrován a 1g lyofilizátu byl navážen do centrifugačních zkumavek. K navážce bylo přidáno 5 ml sodno-citrátového pufru o pH 2,2. Zkumavky byly umístěny do laboratorní třepačky na dobu 45 min, poté byly odstředěny na odstředivce (Odstředivka EBA 21, Hettich ZENTRIFUGEN, Germany, Tuttlingen) při 6000 g, po dobu 20 min. Supernatant byl převeden do 10ml odměrné baňky a sediment resuspendován dalšími 5 ml sodno-citrátového pufru. Postup extrakce byl opakován a oba supernatanty byly převedeny do 10ml odměrné baňky, která byla sodno-citrátovým pufrům doplněna po rysku. Z odměrné baňky byl vzorek napipetován do eppendorfových zkumavek a následovalo odstředění při 15000 g po dobu 45 minut při teplotě 4°C (MIKRO 200R, Hettich ZENTRIFUGEN, Tuttlingen, Německo). Supernatant byl zfiltrován přes $0,45\mu\text{m}$ nylonový filtr a dávkován do automatického analyzátoru aminokyselin. U každého vzorku byla extrakce provedena třikrát.

6.3 Chromatografické stanovení

Biogenní aminy byly stanoveny pomocí iontově-výměnné chromatografie (kolona $55 \times 3,7$ mm naplněná iontoměničem OSTION Lg ANB) s post-kolonovou derivatizací ninhydrinem a fotometrickou detekcí ($\lambda = 570$ nm). Analýza biogenních aminů byla provedena pomocí Automatického analyzátoru aminokyselin AAA 400 (Ingos, Praha, Česká republika). Použitý teplotní a eluční program při chromatografické analýze byl 0-41 min pufr A a 42-93 min pufr B. Pak následovala regenerace $0,2 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ roztokem hydroxidu sodného, která trvala 12 minut. V dalších 19 minutách proběhla stabilizace kolony pufrům A. Teplota kolony byla 65°C (0-40 a 116-120 min) a 45°C (41-115 min). Složení použitých pufrů je popsáno v tabulce Tabulka 5. Standard byl připraven smícháním 8 biogenních aminů (histamin, fenyletylamin, agmatin, spermin, spermidin, kadaverin, putrescin a tyramin) v sodno-citrátovém pufru (pH = 2,2) o koncentraci $500 \text{ nmol}\cdot\text{ml}^{-1}$ každého biogenního aminu. Standardy biogenních aminů byly získány ze Sigma – Aldrich (St. Louis, USA). Každý extrakt byl stanoven dvakrát.

Tabulka 5: Složení (g) elučních a extrakčních sodno – citrátových pufrů pro stanovení biogenních aminů na objem 1l [73].

	Pufr A	Pufr B	Extrakční pufr pH 2,2
Kyselina citronová	1,25	14,00	14,00
Citronan sodný	21,00	-	-
Chlorid sodný	5,00	-	11,50
Bromid draselný	41,65	-	-
Chlorid draselný	-	171,50	-
Isopropanol (ml)	300	-	-
Azid sodný	0,10	0,10	0,10
Hydroxid draselný		5,00	
Thiodiglykol (ml)	-	-	5,00

7 VÝSLEDKY A DISKUZE

7.1 Obsah biogenních aminů ve vzorcích skupiny 1

První skupina vzorků obsahovala 3 vzorky sýrů s plísní na povrchu. Tyto sýry patří do skupiny sladkých sýrů. Na srážení mléka se podílí koagulační enzymy syřidla a proteolytické enzymy mikrobiálních kultur. K výrobě těchto sýrů bylo použito pasterované mléko, smetana, jedlá sůl, mlékařská kultura a plísňová kultura *Penicillium candidum*. Vyznačují se jemnou sýrovou chutí a pikantní chutí po žampionech. Doba zrání u této skupiny sýrů je 3 – 5 týdnů.

Obsah biogenních aminů u vzorků první skupiny (A – C) je uveden v tabulkách 6 a 7.

Tabulka 6: Obsah histaminu, tyraminu, fenyletylaminu, putrescinu, kadaverinu, agmatinu, spermidinu a sperminu v sýrech s plísní na povrchu (skupina 1, vzorky A – B)*

	Vzorek A (mg·kg ⁻¹)			Vzorek B (mg·kg ⁻¹)		
	I. odběr	II. odběr	III. odběr	I. odběr	II. odběr	III. odběr
Histamin	ND**	ND**	ND**	12,4±0,6	18,2±0,6	35,4±1,5
Tyramin	ND**	ND**	ND**	18,8±1,1	42,8±1,8	93,0±3,8
Fenyletylamin	ND**	ND**	ND**	ND**	ND**	ND**
Putrescin	5,0±0,1	6,6±0,2	11,0±0,5	2,6±0,1	6,7±0,4	6,9±0,4
Kadaverin	ND**	ND**	ND**	20,1±0,7	27,7±0,5	31,0±0,5
Agmatin	ND**	ND**	ND**	ND**	ND**	ND**
Spermidin	ND**	ND**	ND**	ND**	ND**	ND**
Spermin	ND**	ND**	ND**	ND**	ND**	ND**

* výsledky vyjádřeny jako průměr±směrodatná odchylka, n = 6

** ND – nebylo detekováno

Tabulka 7: Obsah histaminu, tyraminu, fenyletylaminu, putrescinu, kadaverinu, agmatinu, spermidinu a sperminu v sýrech s plísní na povrchu (skupina 1, vzorek C)*

	Vzorek C (mg·kg ⁻¹)		
	I. odběr	II. odběr	III. odběr
Histamin	ND**	ND**	ND**
Tyramin	ND**	ND**	ND**
Fenyletylamin	ND**	ND**	ND**
Putrescin	6,5±0,3	2,9±0,1	2,9±0,1
Kadaverin	ND**	ND**	ND**
Agmatin	ND**	ND**	ND**
Spermidin	0,9±0,1	2,5±0,1	4,4±0,1
Spermin	ND**	ND**	ND**

* výsledky vyjádřeny jako průměr±směrodatná odchylka, n = 6, (mg·kg⁻¹)

** ND – nebylo detekováno

Biogenní amin histamin, tyramin a kadaverin byl stanoven jen ve vzorku B po celou dobu chladírenského skladování. Koncentrace těchto biogenních aminů se během skladování zvyšovala. Putrescin byl detekován ve všech vzorcích této skupiny, jeho množství se ve vzorku A a B během skladování zvyšovalo, zatímco ve vzorku C byla koncentrace putrescinu nejvyšší ihned po zakoupení, pak došlo ke snížení a koncentrace se do konce minimální doby nezměnila. Spermidin byl detekován jen ve vzorku C a jeho koncentrace se do konce minimální doby trvanlivosti zvyšovala. Biogenní amin fenyletylamin, agmatin a spermin nebyl stanoven v žádném vzorku této skupiny.

Obsah putrescinu ve vzorku A se zvyšoval a na konci minimální doby trvanlivosti dosáhl 11,0±0,5 mg·kg⁻¹. Ve vzorku B došlo ke zvýšení všech stanovených biogenních aminů a jejich množství na konci minimální doby trvanlivosti bylo u histaminu 35,4±1,5 mg·kg⁻¹, tyraminu 93,0±3,8 mg·kg⁻¹, putrescinu 6,9±0,4 mg·kg⁻¹ a kadaverinu 31,0±0,5 mg·kg⁻¹. U biogenních aminů ve vzorku C došlo ke snížení koncentrace putrescinu na hodnotu 2,9±0,1 mg·kg⁻¹ a toto množství od 10. dne skladování stagnovalo. Koncentrace spermidinu se během skladování zvyšovala a dosáhla úrovně 4,4±0,1 mg·kg⁻¹.

Celkový obsah biogenních aminů v sýrech s plísní na povrchu je zobrazen v tabulce 8.

Tabulka 8: Celkový obsah biogenních aminů v $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ v sýrech s plísní na povrchu (skupina 1).

	Celkové množství biogenních aminů skupiny 1 ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)		
	I. odběr	II. odběr	III. odběr
Vzorek A	5,0	6,6	5,5
Vzorek B	53,9	95,4	166,3
Vzorek C	7,4	5,4	7,3

U vzorků A a B se celkové množství biogenních aminů po dobu chladírenského skladování zvyšovalo. U vzorku C došlo nejdříve ke snížení koncentrace biogenních aminů a pak ke zvýšení jejich obsahu. Bylo to způsobeno snížením množství putrescinu a následně zvýšením množstvím spermidinu.

7.2 Obsah biogenních aminů ve vzorcích skupiny 2

Druhá skupina vzorků obsahovala 5 vzorky sýrů s plísní uvnitř hmoty. Tyto sýry patří do skupiny sladkých sýrů. Na srážení mléka se podílí koagulační enzymy syřidla a proteolytické enzymy mikrobiálních kultur. K výrobě těchto sýrů bylo použito pasterované mléko, smetana, jedlá sůl, mlékařská kultura a plísňová kultura *Penicillium roqueforti*. Sýr je krémové barvy s modrým porostem plísně a slanou pikantní chutí po ušlechtilé plísní. Doba zrání u této skupiny sýrů je 3 – 5 týdnů.

Obsah biogenních aminů u vzorků druhé skupiny (D – G) je uveden v tabulkách 9 a 10.

Biogenní aminy histamin a kadaverin byly stanoveny jen vzorku G a F. Koncentrace histaminu se zvyšovala během skladování v obou vzorcích. Kadaverin vznikl ve vzorku F během skladování a byl stanoven až na konci minimální doby trvanlivosti. Ve vzorku G byl detekován ihned po zakoupení a koncentrace se nejdříve zvýšila a do konce minimální doby trvanlivosti se zvýšila již jen nepatrně. Putrescin byl detekován ve vzorcích D, E, F a G.

Tabulka 9: Obsah histaminu, tyraminu, fenyletylaminu, putrescinu, kadaverinu, agmatinu, spermidinu a sperminu v sýrech s plísní uvnitř hmoty (skupina 2, vzorky D – E)*

	Vzorek D (mg·kg ⁻¹)			Vzorek E (mg·kg ⁻¹)		
	I. odběr	II. odběr	III. odběr	I. odběr	II. odběr	III. odběr
Histamin	ND**	ND**	ND**	ND**	ND**	ND**
Tyramin	ND**	ND**	ND**	ND**	2,7±0,1	15,4±0,4
Fenyletylamin	ND**	ND**	ND**	ND**	ND**	ND**
Putrescin	2,0±0,1	3,4±0,1	6,3±0,3	ND**	1,7±0,1	2,0±0,1
Kadaverin	ND**	ND**	ND**	ND**	ND**	ND**
Agmatin	ND**	ND**	ND**	ND**	ND**	ND**
Spermidin	2,2±0,1	3,0±0,1	14,0±0,4	1,6±0,1	3,6±0,2	15,3±0,7
Spermin	ND**	ND**	ND**	ND**	ND**	ND**

* výsledky vyjádřeny jako průměr±směrodatná odchylka, n = 6

** ND – nebylo detekováno

Tabulka 10: Obsah histaminu, tyraminu, fenyletylaminu, putrescinu, kadaverinu, agmatinu, spermidinu a sperminu v sýrech s plísní uvnitř hmoty (skupina 2, vzorky F – G)*

	Vzorek F (mg·kg ⁻¹)			Vzorek G (mg·kg ⁻¹)		
	I. odběr	II. odběr	III. odběr	I. odběr	II. odběr	III. odběr
Histamin	4,9±0,2	6,0±0,3	7,4±0,3	3,2±0,1	4,3±0,2	6,0±0,1
Tyramin	10,7±0,5	126,9±2,8	140,6±5,8	142,9±6,0	600,1±18,3	1069,6±9,6
Fenyletylamin	ND**	ND**	ND**	ND**	ND**	ND**
Putrescin	10,5±0,4	30,0±1,2	30,4±0,7	14,8±0,6	54,3±1,7	81,2±0,5
Kadaverin	ND**	ND**	3,0±0,1	2,3±0,1	9,2±0,2	10,2±0,1
Agmatin	ND**	ND**	ND**	ND**	ND**	ND**
Spermidin	2,0±0,1	2,0±0,1	7,7±0,4	1,4±0,1	2,5±0,2	17,1±0,5
Spermin	ND**	ND**	ND**	ND**	ND**	ND**

* výsledky vyjádřeny jako průměr±směrodatná odchylka, n = 6

** ND – nebylo detekováno

Ve vzorcích D, F a G byl stanoven ihned po zakoupení a jeho množství se během skladování zvýšilo, zatímco ve vzorku E vznikl během skladování a jeho koncentrace se zvýšila nepatrně. Tyramin byl nalezen ve vzorcích E, F a G. Ve vzorku F a G byl opět detekován po celou dobu skladování a ve vzorku G došlo k významnému zvýšení koncentrace na kon-

ci minimální doby trvanlivosti. Tyramin byl ve vzorku E stanoven až v jedenáctém dnu skladování a množství se do konce minimální doby trvanlivosti zvyšovalo. Spermidin byl detekován ve všech vzorcích této skupiny a jeho koncentrace se do konce minimální doby trvanlivosti nepatrně zvýšila. Biogenní aminy fenyletylamin, agmatin a spermin nebyl stanoven v žádném vzorku této skupiny.

Obsah putrescinu a spermidinu ve vzorku D se zvyšoval a na konci minimální doby trvanlivosti dosáhl hodnoty $6,3 \pm 0,3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ pro putrescin a $14,0 \pm 0,4 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ pro spermidin. Ve vzorku E došlo ke zvýšení všech stanovených biogenních aminů a jejich množství na konci minimální doby trvanlivosti bylo u tyraminu $15,4 \pm 0,4 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, putrescinu $2,0 \pm 0,1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ a spermidinu $15,3 \pm 0,7 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$. U biogenních aminů ve vzorku F došlo ke zvýšení koncentrace všech biogenních aminů a to histaminu na hodnotu $7,4 \pm 0,3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, tyraminu $140,6 \pm 5,8 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, putrescinu $30,4 \pm 0,7 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, kadaverinu $3,0 \pm 0,1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ a spermidinu $7,7 \pm 0,4 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$. Stejný zvyšující se trend byl patrný i u biogenních aminů stanovených ve vzorku G. U tohoto vzorku dosáhly koncentrace na konci minimální doby trvanlivosti histaminu $6,0 \pm 0,1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, tyraminu $1069,6 \pm 9,6 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, putrescinu $81,2 \pm 0,5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, kadaverinu $10,2 \pm 0,1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ a spermidinu $17,1 \pm 0,5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$.

Ve vzorku H nebyl stanoven žádný biogenní amin během našeho chladírenského skladování.

Tabulka 11 uvádí celkové množství biogenních aminů ve vzorcích skupiny 2.

Tabulka 11: Celkový obsah biogenních aminů v $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ v sýrech s plísní uvnitř hmoty (skupina 2).

	Celkové množství biogenních aminů skupiny 2 ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)		
	I. odběr	II. odběr	III. odběr
Vzorek D	4,2	6,4	20,3
Vzorek E	1,6	7,9	32,7
Vzorek F	28,0	164,9	189,1
Vzorek G	164,5	670,4	1184,1
Vzorek H	-	-	-

U vzorků D, E, F a G se celkové množství biogenních aminů po dobu chladírenského skladování zvyšuje. Významné zvýšení celkové koncentrace biogenních aminů je patrné u vzorku G.

7.3 Obsah biogenních aminů ve vzorcích skupiny 3

Třetí skupina obsahovala 1 vzorek dvouplísňového sýra. Tento sýr patří do skupiny sladkých sýrů. Na srážení mléka se podílí koagulační enzymy syřidla a proteolytické enzymy mikrobiálních kultur. K výrobě tohoto sýra bylo použito pasterované mléko, smetana, jedlá sůl, mlékařská kultura a plísňová kultura *Penicillium roqueforti* a *Penicillium candidum*. Sýr je tvořen hermelínovou slupkou na povrchu a zelenou plísní uvnitř hmoty. Dále se vyznačuje chutí po žampionech a slanou pikantní chutí po ušlechtilé plísni. Doba zrání u této skupiny sýrů je 3 – 5 týdnů.

Obsah biogenních aminů u vzorku I skupiny 3 je uveden v tabulce 12.

Tabulka 12: Obsah histaminu, tyraminu, fenyletylaminu, putrescinu, kadaverinu, agmatinu, spermidinu a sperminu v dvouplísňovém sýru (skupina 3, vzorek I)*

	Vzorek I (mg·kg ⁻¹)		
	I. odběr	II. odběr	III. odběr
Histamin	ND**	ND**	ND**
Tyramin	ND**	ND**	ND**
Fenyletylamin	ND**	ND**	ND**
Putrescin	1,8±0,1	4,0±0,1	5,6±0,1
Kadaverin	ND**	ND**	ND**
Agmatin	ND**	ND**	ND**
Spermidin	ND**	1,5±0,1	12,2±0,2
Spermin	ND**	ND**	ND**

* výsledky vyjádřeny jako průměr±směrodatná odchylka, n = 6

** ND – nebylo detekováno

U vzorku I byl stanoven putrescin po celou dobu skladování, obsah se zvyšoval a dosáhl hodnoty 5,6±0,1 mg·kg⁻¹. Spermidin vznikl během skladování a jeho množství na konci minimální doby trvanlivosti mělo hodnotu 12,2±0,2 mg·kg⁻¹. Histamin, tyramin, fenyletylamin, kadaverin, agmatin a spermin nebyl u vzorku I detekován.

7.4 Obsah biogenních aminů ve vzorcích skupiny 4

Do čtvrté skupiny byly zařazeny 3 vzorky sýrů ementálského typu. Tyto sýry patří do skupiny sladkých sýrů. Na srážení mléka se podílí koagulační enzymy syřidla a proteolytické

enzymy mikrobiálních kultur. K výrobě tohoto sýra bylo použito pasterované mléko, smetana, jedlá sůl, mlékařská kultura. Sýr může vytvářet oka velikosti vlašského ořechu. Dále se vyznačuje nasládlou chutí a jeho konzistence může být až drobivá. Doba zrání u této skupiny sýrů je 2 – 3 měsíce.

Obsah biogenních aminů u vzorků druhé skupiny (J – L) je uveden v tabulkách 13 a 14.

Tabulka 13: Obsah histaminu, tyraminu, fenyletylaminu, putrescinu, kadaverinu, agmatinu, spermidinu a sperminu v sýrech ementálského typu (skupina 4, vzorky J – K)*

	Vzorek J (mg·kg ⁻¹)			Vzorek K (mg·kg ⁻¹)		
	I. odběr	II. odběr	III. odběr	I. odběr	II. odběr	III. odběr
Histamin	ND**	ND**	ND**	ND**	ND**	ND**
Tyramin	54,0±0,1	795,2±3,4	1015,0±20,1	25,2±1,1	869,7±14,4	973,5±19,5
Fenyletylamin	ND**	56,4±3,4	74,2±0,7	35,3±1,4	154,6±5,9	163,5±1,3
Putrescin	ND**	4,4±0,2	11,2±0,1	ND**	52,6±0,4	108,9±0,7
Kadaverin	ND**	ND**	ND**	ND**	42,2±1,2	67,0±0,4
Agmatin	ND**	ND**	ND**	ND**	ND**	ND**
Spermidin	ND**	ND**	ND**	ND**	ND**	ND**
Spermin	ND**	ND**	ND**	ND**	ND**	ND**

* výsledky vyjádřeny jako průměr±směrodatná odchylka, n = 6

** ND – nebylo detekováno

Tabulka 14: Obsah histaminu, tyraminu, fenyletylaminu, putrescinu, kadaverinu, agmatinu, spermidinu a sperminu v sýrech ementálského typu (skupina 4, vzorek L)*

	Vzorek L (mg·kg ⁻¹)		
	I. odběr	II. odběr	III. odběr
Histamin	ND**	ND**	ND**
Tyramin	365,1±8,2	984,4±43,9	991,5±19,6
Fenyletylamin	ND**	113,9±6,5	140,0±1,7
Putrescin	37,4±1,32	358,4±18,0	459,8±13,0
Kadaverin	ND**	ND**	ND**
Agmatin	ND**	ND**	ND**
Spermidin	ND**	ND**	ND**
Spermin	ND**	ND**	ND**

* výsledky vyjádřeny jako průměr±směrodatná odchylka, n = 6

** ND – nebylo detekováno

Histamin, agmatin, spermidin a spermin nebyly detekovány u žádného vzorku této skupiny. Biogenní aminy tyramin, fenyletylamin a putrescin byly stanoveny ve všech vzorcích této skupiny. Obsah tyraminu se během skladování zvyšoval ve všech vzorcích. Fenyletylamin ve vzorcích J a L vznikl během skladování a jeho obsah v obou vzorcích rostl. U vzorku K byl stanoven již po zakoupení a jeho obsah rovněž rostl do konce minimální doby trvanlivosti. Putrescin byl detekován u vzorku J a K během skladování a množství se zvyšovalo. U vzorku L byl putrescin nalezen ihned po zakoupení a koncentrace se významně zvýšila. Kadaverin byl stanoven jen u vzorku K během skladování a obsah vzrůstal.

Obsah tyraminu ve vzorku J se zvyšoval a na konci minimální doby trvanlivosti dosáhl hodnoty $1015,0 \pm 20,1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$. Putrescin a fenyletylamin byl detekován až ve 40. dnu skladování a na konci minimální doby trvanlivosti dosáhly hodnoty $74,2 \pm 0,7 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ pro fenyletylamin a $11,2 \pm 0,1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ pro putrescin. Ve vzorku K došlo ke zvýšení všech stanovených biogenních aminů a jejich množství na konci minimální doby trvanlivosti bylo u tyraminu $973,5 \pm 19,5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, fenyletylaminu $163,5 \pm 1,3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$. Putrescin a kadaverin byly ve vzorku K objeveny až v 15. dnu skladování a dosáhly úrovně putrescin $108,9 \pm 0,7 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ a kadaverin $67,0 \pm 0,4 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$. U biogenních aminů ve vzorku L došlo ke zvýšení koncentrace všech biogenních aminů a to tyraminu $991,5 \pm 19,6 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, putrescinu $459,8 \pm 13,0 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, fenyletylaminu $140,0 \pm 1,7 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, který byl detekován v 35. dnu skladování.

Tabulka 15 uvádí celkové množství biogenních aminů ve vzorcích skupiny 4.

Tabulka 15: Celkový obsah biogenních aminů v $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ v sýrech ementálského typu (skupina 4).

	Celkové množství biogenních aminů skupiny 4 ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)		
	I. odběr	II. odběr	III. odběr
Vzorek J	54,0	856,0	1100,3
Vzorek K	60,5	1119,1	1313,0
Vzorek L	37,4	1456,7	1591,4

U vzorků J, K a L se celkové množství biogenních aminů po dobu chladírenského skladování zvyšuje. Významné zvýšení celkové koncentrace biogenních aminů je patrné na konci minimální doby trvanlivosti u všech vzorků.

7.5 Obsah biogenních aminů ve vzorcích skupiny 5

Do páté skupiny byly zařazeny 3 vzorky sýrů zrající pod mazem. Tyto sýry patří do skupiny sladkých sýrů. Na srážení mléka se podílí koagulační enzymy syřidla a proteolytické enzymy mikrobiálních kultur. K výrobě tohoto sýra bylo použito pasterované mléko, smetana, jedlá sůl, mlékařská kultura a mazová kultura tvořená kvasinkami rodu *Candida*. Pro tyto sýry je typický oranžovohnědý maz na povrchu, který je tvořený *Brevibacterium linens*. Je to skupina aromatických sýrů. Doba zrání u této skupiny je 10-14 dní.

Obsah biogenních aminů u vzorků páté skupiny (M – O) je uveden v tabulkách 16 a 17.

Tabulka 16: Obsah histaminu, tyraminu, fenyletylaminu, putrescinu, kadaverinu, agmatinu, spermidinu a sperminu v zrajících sýrech (skupina 5, vzorky M – N)*

	Vzorek M (mg·kg ⁻¹)			Vzorek N (mg·kg ⁻¹)		
	I. odběr	II. odběr	III. odběr	I. odběr	II. odběr	III. odběr
Histamin	ND**	ND**	ND**	2,8±0,1	3,2±0,1	5,0±0,1
Tyramin	ND**	ND**	ND**	167,9±5,0	168,0±5,5	243,9±0,5
Fenyletylamin	ND**	ND**	ND**	28,9±0,1	36,1±1,5	59,7±1,3
Putrescin	ND**	ND**	ND**	201,7±7,2	227,9±7,7	272,3±10,0
Kadaverin	ND**	ND**	ND**	630,6±21,1	1106,3±50,5	1428,4±46,8
Agmatin	ND**	ND**	ND**	ND**	ND**	ND**
Spermidin	2,3±0,2	7,5±0,1	11,0±0,1	1,0±0,1	2,4±0,1	4,1±0,1
Spermin	6,0±0,1	8,4±0,1	9,9±0,1	ND**	ND**	ND**

* výsledky vyjádřeny jako průměr±směrodatná odchylka, n = 6

** ND – nebylo detekováno

Biogenní aminy tyramin, fenyletylamin, putrescin a kadaverin byly stanoveny ve vzorcích N a O. Histamin byl detekován pouze u vzorku N, spermidin ve vzorcích M a N a spermin ve vzorku M. Obsah stanovených biogenních aminů se ve všech vzorcích během chladírenského skladování zvyšoval. Biogenní amin agmatin nebyl nalezen v žádném vzorku této skupiny.

Tabulka 17: Obsah histaminu, tyraminu, fenyletylaminu, putrescinu, kadaverinu, agmatinu, spermidinu a sperminu v zrajících sýrech (skupina 5, vzorek O)*

	Vzorek O (mg·kg ⁻¹)		
	I. odběr	II. odběr	III. odběr
Histamin	ND**	ND**	ND**
Tyramin	34,5±2,5	66,4±1,5	77,7±2,8
Fenyletylamin	6,3±0,2	7,1±0,2	12,1±0,2
Putrescin	7,3±0,4	12,8±0,3	15,2±0,3
Kadaverin	170,6±5,5	220,1±4,4	245,7±6,0
Agmatin	ND**	ND**	ND**
Spermidin	ND**	ND**	ND**
Spermin	ND**	ND**	ND**

* výsledky vyjádřeny jako průměr±směrodatná odchylka, n = 6

** ND – nebylo detekováno

U vzorku M byl stanoven spermidin a spermin v nízkých koncentracích, u kterých nastalo během skladování nepatrnému zvýšení. Na konci doby trvanlivosti byla jejich koncentrace 11,0±0,1 mg·kg⁻¹ spermidinu a 9,9±0,1 mg·kg⁻¹ sperminu. Ve vzorku N byl obsah tyraminu detekován ihned po zakoupení, jeho množství se během skladování významně neměnilo, ale na konci minimální doby trvanlivosti se zvýšilo a dosáhlo hodnoty 243,9±0,5 mg·kg⁻¹. Koncentrace putrescinu, fenyletylaminu, histaminu, kadaverinu a spermidinu se během skladování zvyšovala a na konci minimální doby trvanlivosti dosáhla množství pro putrescin 272,3±10,0 mg·kg⁻¹, fenyletylamin 59,7±1,3 mg·kg⁻¹, histamin 5,0±0,1 mg·kg⁻¹, kadaverin 1428,4±46,8 a spermidin 4,1±0,5 mg·kg⁻¹. Ve vzorku O došlo ke zvýšení všech stanovených biogenních aminů a jejich množství na konci minimální doby trvanlivosti bylo u tyraminu 77,7±2,8 mg·kg⁻¹, fenyletylaminu 77,7±2,8 mg·kg⁻¹, putrescinu 15,2±0,3 mg·kg⁻¹ a kadaverinu 245,7±6,0 mg·kg⁻¹.

Tabulka 18 uvádí celkové množství biogenních aminů ve vzorcích skupiny 5.

U vzorků M, N a O se celkové množství biogenních aminů po dobu chladírenského skladování zvyšuje. Významné množství celkové koncentrace biogenních aminů je patrné u vzorku N po celou dobu chladírenského skladování.

Tabulka 18: Celkový obsah biogenních aminů v mg·kg⁻¹ ve zrajících sýrech (skupina 5).

	Celkové množství biogenních aminů skupiny 5 (mg·kg ⁻¹)		
	I. odběr	II. odběr	III. odběr
Vzorek M	8,3	15,8	20,9
Vzorek N	1033,0	1544,0	2013,4
Vzorek O	170,6	220,1	245,7

7.6 Obsah biogenních aminů ve vzorcích skupiny 6

Do šesté skupiny bylo zařazeno 9 trvanlivých fermentovaných masných výrobků. Je to skupiny tepelně nepracovaných výrobků a jejich trvanlivost je zajišťována procesem fermentace a následným sušením. Jsou vyráběny ze syrového masa (vepřové, hovězí maso), tukové tkáně (kůže, sádlo). Dále se přidává jedlá sůl, koření, mikrobiální kultury a dalších přísady podle druhu výrobku.

Obsah biogenních aminů u vzorků páté skupiny (P - Z) je uveden v tabulkách 19 – 23.

Tabulka 19: Obsah histaminu, tyraminu, fenyletylaminu, putrescinu, kadaverinu, agmatinu, spermidinu a sperminu v trvanlivých fermentovaných masných výrobcích (skupina 6, vzorky P – Q)*

	Vzorek P (mg·kg ⁻¹)			Vzorek Q (mg·kg ⁻¹)		
	I. odběr	II. odběr	III. odběr	I. odběr	II. odběr	III. odběr
Histamin	ND**	ND**	ND**	ND**	ND**	ND**
Tyramin	12,4±0,6	131,3±1,1	181,7±8,3	54,0±1,0	75,9±0,6	148,5±6,9
Fenyletylamin	6,4±0,2	10,0±0,1	14,1±0,6	ND**	5,1±0,1	24,1±1,1
Putrescin	ND**	ND**	ND**	ND**	ND**	ND**
Kadaverin	ND**	ND**	ND**	ND**	ND**	ND**
Agmatin	ND**	ND**	ND**	ND**	ND**	ND**
Spermidin	1,1±0,1	2,8±0,1	3,5±0,1	1,0±0,1	2,5±0,2	3,1±0,1
Spermin	2,7±0,1	11,2±0,5	14,6±0,7	10,5±0,5	13,3±0,3	14,7±0,7

* výsledky vyjádřeny jako průměr±směrodatná odchylka, n = 6

** ND – nebylo detekováno

Tabulka 20: Obsah histaminu, tyraminu, fenyletylaminu, putrescinu, kadaverinu, agmatinu, spermidinu a sperminu v trvanlivých fermentovaných masných výrobcích (skupina 6, vzorky R – S)*

	Vzorek R (mg·kg ⁻¹)			Vzorek S (mg·kg ⁻¹)		
	I. odběr	II. odběr	III. odběr	I. odběr	II. odběr	III. odběr
Histamin	ND**	ND**	ND**	ND**	ND**	ND**
Tyramin	ND**	ND**	ND**	42,3±0,6	69,9±1,0	228,1±7,9
Fenyletylamin	ND**	ND**	ND**	24,7±0,3	27,5±0,2	42,7±1,0
Putrescin	ND**	ND**	ND**	ND**	ND**	ND**
Kadaverin	ND**	ND**	ND**	ND**	ND**	ND**
Agmatin	ND**	ND**	ND**	ND**	ND**	ND**
Spermidin	1,5±0,1	7,3±0,2	10,2±0,2	1,1±0,0	1,8±0,2	4,8±0,2
Spermin	17,4±0,3	18,4±0,7	30,1±1,2	20,8±0,9	19,2±0,3	20,4±0,9

* výsledky vyjádřeny jako průměr±směrodatná odchylka, n = 6

** ND – nebylo detekováno

Tabulka 21: Obsah histaminu, tyraminu, fenyletylaminu, putrescinu, kadaverinu, agmatinu, spermidinu a sperminu v trvanlivých fermentovaných masných výrobcích (skupina 6, vzorky T – U)*

	Vzorek T (mg·kg ⁻¹)			Vzorek U (mg·kg ⁻¹)		
	I. odběr	II. odběr	III. odběr	I. odběr	II. odběr	III. odběr
Histamin	31,7±1,2	100,0±4,6	151,8±3,5	ND**	ND**	ND**
Tyramin	35,0±1,7	76,4±1,0	195,0±4,5	3,6±0,2	9,3±0,2	15,3±0,5
Fenyletylamin	ND**	ND**	ND**	ND**	ND**	ND**
Putrescin	15,1±0,8	17,7±1,0	31,7±1,4	3,1±0,2	5,1±0,2	18,1±0,6
Kadaverin	6,3±0,4	11,5±0,4	16,8±0,2	ND**	ND**	ND**
Agmatin	ND**	ND**	ND**	ND**	ND**	ND**
Spermidin	ND**	9,0±0,5	15,7±0,1	0,5±0,1	1,7±0,1	8,1±0,2
Spermin	15,5±0,8	14,5±0,3	17,0±0,9	1,5±0,1	12,9±0,7	26,6±0,8

* výsledky vyjádřeny jako průměr±směrodatná odchylka, n = 6

** ND – nebylo detekováno

Tabulka 22: Obsah histaminu, tyraminu, fenyletylaminu, putrescinu, kadaverinu, agmatinu, spermidinu a sperminu v trvanlivých fermentovaných masných výrobcích (skupina 6, vzorky V – X)*

	Vzorek V (mg·kg ⁻¹)			Vzorek X (mg·kg ⁻¹)		
	I. odběr	II. odběr	III. odběr	I. odběr	II. odběr	III. odběr
Histamin	12,9±0,5	22,2±0,2	29,6±1,4	ND**	ND**	ND**
Tyramin	81,0±2,5	81,8±1,1	86,6±1,3	17,5±0,4	33,4±0,8	46,4±0,5
Fenyletylamin	ND**	ND**	ND**	ND**	ND**	ND**
Putrescin	134,3±4,8	144,6±6,2	225,1±4,6	ND**	ND**	ND**
Kadaverin	ND**	ND**	ND**	ND**	ND**	ND**
Agmatin	ND**	ND**	ND**	ND**	ND**	ND**
Spermidin	0,4±0,0	0,7±0,0	4,0±0,1	0,6±0,0	6,5±0,2	11,8±0,1
Spermin	11,1±0,6	19,4±0,6	24,7±1,1	10,1±0,0	13,0±0,3	18,1±0,4

* výsledky vyjádřeny jako průměr±směrodatná odchylka, n = 6

** ND – nebylo detekováno

Tabulka 23: Obsah histaminu, tyraminu, fenyletylaminu, putrescinu, kadaverinu, agmatinu, spermidinu a sperminu v trvanlivých fermentovaných masných výrobcích (skupina 6, vzorek Z)*

	Vzorek Z (mg·kg ⁻¹)		
	I. odběr	II. odběr	III. odběr
Histamin	2,4±0,1	11,2±0,2	73,1±1,7
Tyramin	26,7±0,6	42,0±1,2	90,4±2,7
Fenyletylamin	ND**	ND**	ND**
Putrescin	57,1±0,7	93,2±2,5	210,4±3,3
Kadaverin	4,1±0,1	10,9±0,4	15,0±0,2
Agmatin	ND**	ND**	ND**
Spermidin	ND**	ND**	ND**
Spermin	ND**	ND**	ND**

* výsledky vyjádřeny jako průměr±směrodatná odchylka, n = 6

** ND – nebylo detekováno

Histamin byl stanoven jen vzorku T, V a Z. Koncentrace histaminu se zvyšovala během skladování ve všech třech vzorcích. Kadaverin vznikl ve vzorku T a Z a jeho množství mě-

lo do konce minimální doby stoupající trend. Fenyletylamin byl detekován ve vzorku P, Q a S. Ve vzorku P a S byl detekován ihned po zakoupení a koncentrace se do konce minimální doby trvanlivosti zvýšila, zatímco ve vzorku Q byl stanoven až během skladování a jeho množství rostlo. Putrescin byl detekován ve vzorcích T, U, V a Z a jeho množství se během skladování zvýšilo. Tyramin byl nalezen ve vzorcích P, Q, S, T, U, V a X a byl detekován po celou dobu skladování. Jeho obsah se po dobu skladování postupně zvyšoval mimo vzorek V, u kterého se obsah po celou dobu skladování významně neměnila. Spermidin a spermin byly detekovány souběžně ve vzorcích P, Q, R, S, T, U, V a X a jejich koncentrace se do konce minimální doby trvanlivosti nepatrně zvýšila. Agmatin nebyl stanoven v žádném vzorku této skupiny.

Obsah tyraminu, fenyletylaminu, sperminu a spermidinu ve vzorku P se zvyšoval a na konci minimální doby trvanlivosti dosáhl hodnoty $181,7 \pm 8,3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ pro tyramin, $14,1 \pm 0,6 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ pro fenyletylamin, $14,6 \pm 0,7 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ pro spermin a $3,5 \pm 0,1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ pro spermidin. Ve vzorku Q došlo ke zvýšení všech stanovených biogenních aminů a jejich množství na konci minimální doby trvanlivosti bylo u tyraminu $148,5 \pm 6,9 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, fenyletylaminu $24,1 \pm 1,1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, který vznikl až po 14. dnech skladování, spermidinu $3,1 \pm 0,1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ a sperminu $14,7 \pm 0,7 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$. Ve vzorku R byl stanoven spermin a sperimidin, jejich obsah se zvyšoval a na konci minimální doby trvanlivosti dosáhl $10,2 \pm 0,2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ pro spermidin a $30,1 \pm 1,2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ pro spermin. Ve vzorku S došlo ke zvýšení všech stanovených biogenních aminů a jejich množství na konci minimální doby trvanlivosti bylo u tyraminu $228,1 \pm 7,9 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, fenyletylaminu $42,7 \pm 1,0 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, spermidinu $4,8 \pm 0,2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ a sperminu $20,4 \pm 0,9 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$. U biogenních aminů ve vzorku T došlo ke zvýšení koncentrace všech biogenních aminů a to histaminu na hodnotu $151,8 \pm 3,5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, tyraminu $195,0 \pm 4,5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, putrescinu $31,7 \pm 1,4 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, kadaverinu $16,8 \pm 0,2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, sperminu $17,0 \pm 0,9 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ a jeho koncentrace se během skladování významně nelišila a spermidinu $15,7 \pm 0,1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$. Spermidin byl ve vzorku T stanoven po 30 dnech skladování. Biogenní aminy ve vzorku U dosáhly na konci minimální doby trvanlivosti úrovně pro tyramin $15,3 \pm 0,5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, pro putrescin $18,1 \pm 0,6 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, $8,1 \pm 0,2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ pro spermidin a $26,6 \pm 0,8 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ pro spermin. Obsah tyraminu ve vzorku V se po celou dobu skladování významně neměnil a dosahoval hodnoty $86,6 \pm 1,3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$. Ve vzorku V byl dále stanoven histamin, putrescin, spermidin a spermin a dosáhly koncentrace na konci minimální doby

trvanlivosti histaminu $29,6 \pm 1,4 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, putrescinu $225,1 \pm 4,6 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, sperminu $24,7 \pm 1,1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ a spermidinu $4,0 \pm 0,1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$. Ve vzorku X došlo ke zvýšení všech stanovených biogenních aminů a jejich množství na konci minimální doby trvanlivosti bylo u tyraminu $46,4 \pm 0,5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, spermidinu $11,8 \pm 0,1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ a speminu $18,1 \pm 0,4 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$. U biogenních aminů ve vzorku Z došlo ke zvýšení koncentrace všech biogenních aminů a to histaminu $73,1 \pm 1,7 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, tyraminu $90,4 \pm 2,7 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, putrescinu $210,4 \pm 3,3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ a kadaverinu $15,0 \pm 0,2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$.

Tabulka 24 uvádí celkové množství biogenních aminů ve vzorcích skupiny 6.

Tabulka 24: Celkový obsah biogenních aminů v $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ v trvanlivých fermentovaných masných výrobcích (skupina 6).

	Celkové množství biogenních aminů skupiny 6 ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)		
	I. odběr	II. odběr	III. odběr
Vzorek P	22,7	155,3	214,0
Vzorek Q	65,5	96,8	190,5
Vzorek R	18,9	25,7	40,3
Vzorek S	88,8	118,4	296,0
Vzorek T	103,7	229,1	428,0
Vzorek U	8,7	29,0	68,0
Vzorek V	239,7	268,7	370,0
Vzorek X	28,1	52,9	76,4
Vzorek Z	90,4	157,2	388,9

U všech vzorků této skupiny se celkový obsah stanovených biogenních aminů po dobu chladírenského skladování zvyšoval.

7.7 Souhrnná diskuze

V této práci byla pomocí iontově-výměnné chromatografie sledována změna koncentrace biogenních aminů u vzorků živočišného původu při chladírenském skladování.

Z předložených 24 vzorků nebyly biogenní aminy stanoveny pouze u jednoho vzorku H sýra s plísní uvnitř hmoty. Tento vzorek byl zařazen do skupiny 2 a skladován 7 dnů. V ostatních vzorcích byly biogenní aminy během skladování detekovány a jejich celkový

obsah se během skladování zvyšoval. Z výsledků bylo zpozorováno, že délka skladování významně ovlivňuje obsah biogenních aminů v daném vzorku, tuto skutečnost uvádí řada autorů ve svých pracích [62,87].

Biogenní aminy mohou mít ve vyšších koncentracích toxický účinek na lidský organizmus. Nejvíce prostudovány jsou negativní reakce na lidský organizmus pro histamin a tyramin. Je uváděno, že množství 40-100 mg·kg⁻¹ vyvolává mírné otravy a za toxické limity je považována hodnota větší než 100 mg·kg⁻¹ [55,65]. Vyšší koncentrace histaminu byla stanovena u dvou vzorků fermentovaných masných výrobků Z a T. Ve vzorku Z dosáhl stanovený obsah histaminu na konci minimální doby trvanlivosti množství nad 70 mg·kg⁻¹, toto množství již podle Ancín-Azpilicueta *et al.* [55] a Önal [65] může vyvolat mírné otravy. Ve vzorku T dosáhl histamin úroveň vyšší než 150 mg·kg⁻¹ a tato hodnota je považována za toxickou. Konzumace těchto potravin ve větším množství může znamenat potenciální zdravotní riziko. Vyšší obsah tyraminu byl zaznamenán u dvou vzorků sýra s plísní uvnitř hmoty (F, G), u tří vzorků sýra ementálského typu (J, K, L), jednoho vzorku sýra zrající pod mazem (N) a u čtyř vzorků fermentovaných masných výrobků (Q, P, T, S). U vzorků F-T bylo množství tyraminu nad 100 mg·kg⁻¹, u vzorků S a N nad 200 mg·kg⁻¹, u vzorků K a L nad 900 mg·kg⁻¹ a u vzorků J a G dosáhly hodnoty nad 1000 mg·kg⁻¹. Vzhledem k tomu, že někteří autoři pokládají za toxické již hodnoty tyraminu nad 100 mg·kg⁻¹ [4,62,76], mohly by tyto vzorky představovat zdravotní riziko pro spotřebitele. U vzorků G, J, K, L a N byl významně vyšší celkový obsah biogenních aminů, který u vzorku G (sýr s plísní uvnitř hmoty) dosáhl 1069 mg·kg⁻¹, vzorku J (sýr ementálského typu) 1100 mg·kg⁻¹, vzorku K (sýr ementálského typu) 1313 mg·kg⁻¹, vzorku L (sýr ementálského typu) 1594 mg·kg⁻¹ a vzorku N (sýr zrající pod mazem) 2013 mg·kg⁻¹. Vzhledem k tomu, že někteří autoři pokládají za toxické hodnoty celkového množství biogenních aminů v potravinách 900 mg·kg⁻¹ mohly by představovat zdravotní riziko pro spotřebitele [55].

U některých fermentovaných potravin (sýry s plísní na povrchu, s plísní uvnitř těsta, zrající sýry pod mazem) doporučuje výrobce ke konzumaci podávat alkoholické nápoje (např. červená vína nebo pivo). Takováto doporučení však mohou být kontraproduktivní, neboť alkohol (etanol) patří mezi sloučeniny, které také omezují aktivitu enzymatického systému odbourávajícího přijaté biogenní aminy. Navíc řada alkoholických nápojů obsahuje také významná množství těchto sloučenin [4,54].

Dále se mohou tyto skupiny potravin využívat jako přísady pro studenou i teplou kuchyni. Jsou využívány pro smažení, pečení, nakládání do různých láků a grilování. Paulsen *et al.* [88] uvádí, že žádný tento proces nezajišťuje snížení obsahu biogenních aminů a polyaminů. Nakládáním do koření a kořenících směsí může dojít ke snížení obsahu biogenních aminů, protože některá koření a kořenící směsi mají inhibiční účinky vůči mikroorganismům a tudíž mohou omezit syntézu biogenních aminů [59-60].

V této práci byly biogenní aminy stanoveny v šesti skupinách vzorků. Nejnižší koncentrace biogenních aminů byla zjištěna u skupiny sýrů s plísní na povrchu. U této skupiny dosáhly hodnoty nižší než $10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ u dvou vzorků, jeden vzorek dosáhl hodnot nad $100 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$. Mayer *et al.* [72] prezentuje hodnoty vyšší u celkového obsahu biogenních aminů. Nejvyšší koncentrace biogenních aminů byly stanoveny u sýrů ementálského typu. U těchto vzorků hodnoty celkového množství biogenních aminů dosahovaly hodnot nad $1000 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$. Standarová *et al.* [89] ve své práci uvádí srovnatelné hodnoty, zatímco Mayer *et al.* [72] stanovil obdobné hodnoty pouze u dvou vzorků ze skupiny 14 analyzovaných vzorků sýrů ementálského typu, ostatní vzorky dosahovaly hodnoty desetkrát nižší. Skupina zrajících sýrů pod mazem je různorodá. V této práci byla vyšší hodnota zaznamenána pouze u jednoho vzorku, u kterého hodnota přesáhla hodnotu $2000 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$. Mayer *et al.* [72] uvádí hodnoty nižší. I u vzorků skupiny sýrů s plísní uvnitř hmoty byl obsah biogenních aminů v odlišném intervalu. Stejná data prezentuje Komprda *et al.* [90], Standarová *et al.* [89] a Mayer *et al.* [72]. Celkový obsah biogenních aminů ve třech vzorcích skupiny 6 (skupiny fermentovaných masných výrobků) dosáhl v této práci vyšších hodnot, než uvádí Komprda *et al.* [91] a Suzzi *et al.* [92] a tři vzorky dosáhly významně nižších hodnot, než tito autoři uvádějí.

Původ stanovených biogenních aminů může být ze starterových a nonstarterových mikroorganismů. Přítomný histamin a kadaverin může sloužit jako indikátor hygieny při výrobě [49,51]. Putrescin je přirozenou složkou čerstvého mléka nebo masa a může přecházet do finálních výrobků [36]. Dále může vznikat dekarboxylací aminokyselin L-argininu a L - ornitinu [15-17,26-29]. Při výrobě sýrů bylo použito mléko pasterované, v takto upraveném mléce se však mohou vyskytovat termofilní mikroorganismy například rodu *Enterobacteriaceae*. Tato skupina mikroorganismů může být producentem biogenních aminů, a proto může být původ stanoveného putrescinu z nonstarterových mikroorganismů [93-

97]. I ve fermentovaných masných výrobcích může být původ putrescinu způsobený rody mikroorganismů *Enterobacteriaceae*, *Micrococcaceae* a další jako nonstarterové kultury nebo starterovými mikroorganismy (bakterie mléčného kvašení) [92]. Spermin a spermidin jsou přirozenou složkou buněk a činností mikroorganismů nevznikají [24,29]. Původ stanoveného tyraminu může být ze zvýšeného obsahu kontaminujících mikroorganismů enterokoků s pozitivní tyrosin-dekarboxylázovou aktivitou [76,97]. Tyramin může být produkován laktobacily ze starterových kultur [97], protože starterové kultury podléhají kontrole, je předpoklad, že stanovený tyramin je produkován kontaminujícími mikroorganismy.

Řada spotřebitelů může patřit k rizikové skupině z hlediska příjmu biogenních aminů, neboť užívají léky inhibující aktivitu aminooxidáz. Pro tuto skupinu konzumentů může být podle Santos-Silla [3], Komprda *et al.* [59] toxická již dávka $6 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$. Tento limit byl překročen prakticky ve všech vzorcích (mimo vzorek H), což je možné považovat za závažné zjištění.

ZÁVĚR

Diplomová práce byla zaměřena na stanovení biogenních aminů ve fermentovaných potravinách živočišného původu získaných v běžné obchodní síti.

Úkolem této práce bylo sledovat změny obsahu biogenních aminů pomocí iontově-výměnné kapalinové chromatografie. Cílem tohoto experimentu bylo zjistit jaký vliv má délka skladování při teplotě $6\pm 2^\circ\text{C}$ na změně obsahu biogenních aminů ve fermentovaných potravinách živočišného původu.

Byly zjištěny následující výsledky:

- Přítomnost biogenních aminů byla zjištěna v téměř všech studovaných aminy fermentovaných potravinách živočišného původu,
- Mohou vznikat působením přítomných mikroorganismů, které mohou být součástí starterových a non-starterových kultur nebo kontaminující mikroflóry,
- Koncentrace biogenních aminů se během skladování zvyšuje,
- Obsah biogenních aminů na konci doby minimální trvanlivosti, resp. použitelnosti může dosahovat hodnot, které již mohou způsobit zdravotní komplikace,
- Studované potraviny mohou za určitých okolností představovat riziko pro konzumenty, u kterých je inhibována aktivita aminooxidáz.

Závěrem lze říci, že délka skladování významně ovlivňuje koncentraci biogenních aminů ve fermentovaných potravinách živočišného původu. Pro výrobu těchto potravin by měly být použity starterové kultury jejichž mikroorganismy nevykazují pozitivní dekarboxylázovou aktivitu.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] SILLA-SANTOS, M.H. *Fermentation and food safety*. Aspen,: Springer - Verlag, 2001. Chapter 6, Toxic nitrogen compounds produced during processing: Biogenic amines, ethylcarbamides, nitrosamines, p. 119–140. ISBN 0-8342-1843-7.
- [2] VELÍŠEK, J. *Chemie potravin*. 3rd ed. Tábor: OSSIS, 2009. p. 623. ISBN 978-80-86659-16-9.
- [3] SANTOS SILLA, M.H. Biogenic amines: their importance in foods. *International Journal of Food Microbiology*, 1996, 29, p. 213–231.
- [4] ANL, R.E.; BAYRAM, M. Biogenic amines in wines. *Food Reviews International*. 2009, vol. 25, no. 1, p. 86-102.
- [5] LADERO, V., FERNÁNDEZ, M., ALVAREZ, M.A. Effect of post-ripening processing on the histamine and histamine – producing bacteria contents of different cheeses. *International Dairy Journal*, 2009, vol. 19, no. 12, p. 759–762.
- [6] STANDARA, S., VESELÁ, M., DRDÁK, M. Determination of biogenic amines in cheese by ion exchange chromatography. *Die Nahrung*, 2000, vol. 44, no. 1, p. 28–31.
- [7] KAROVIČOVÁ, J., KOHAJDOVÁ, Z. Biogenic amines in food. *Chemical Papers*, 2005, vol. 59, no. 1, p. 70–79.
- [8] KALAČ, P. *Advances in Food Science and Technology*. Nova Science Publishers, Inc., 2010. chapter 6, The roles of dietary polyamines in human health and their occurrence in foods, p. 91–112.
- [9] KOHAJDOVÁ, Z. – KAROVIČOVÁ, J. – GREIF, G. 2008. Biogénne amíny v potravinách. In *Potravinárstvo* [online]. 2. február 2008, roč. 2, č. 1 [cit. 2008-02-08]. s. 30 - 49. Dostupné: <http://www.potravinarstvo.com/dokumenty/potravinarstvo_no1_2008.pdf>. ISSN 1337-0960.
- [10] LANDETE, J., DE LAS RIVAS, B., MARCOBAL, A., MUÑOZ, R. Updated molecular knowledge about histamine biosynthesis by bacteria. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2008, vol. 48, no. 8, p. 697–714.

- [11] TOYO'OKA, T. Separation assay of histamine and its metabolites in biological specimens. *Biomedical chromatography*, 2008, vol. 22, no. 9, p. 919–930.
- [12] MAINTZ, L., NOVAK, N. Histamine and histamine intolerance. *American Journal of Clinical Nutrition*, 2007, vol. 85, no. 5, p. 1185–1196.
- [13] SHALABY, R.A. Significance of biogenic amines to food safety and human health. *Food Research International*, 1996, vol. 29, no. 7, p. 675–690.
- [14] TONINELLO, A., BATTAGLIA, V., SALVI, M., CALHEIROS, R., MARQUES, M. P. M. Structural characterization of agmatine at physiological conditions. *Structural Chemistry*, 2006, vol. 17, no. 2, p. 163–175.
- [15] MOINARD, CH., CYNOBER, L., BANDT, J. Polyamines: metabolism and implications in human diseases. *Clinical Nutrition*, 2005, vol. 24, p. 184–197.
- [16] PATOČKA, J., KUEHN, G. Natural polyamines and their biological consequence in mammals. *Acta Medica*, 2000, vol. 43, no. 4, p. 119–124.
- [17] MURRAY, K. ROBERT, GRANNER, K. DARYL, MAYES, A. PETER, RODWELL, W. VICTOR. *Harperova BIOCHEMIE*. 23. vydání (4. české vydání) 2002. ISBN 80-7319-013-3.
- [18] VODRÁŽKA, Z. *Biochemie*. 2nd ed. Praha: Academia, 1996. ISBN 978-80-200-0600-4.
- [19] BACH, R., CANEPA, C. Theoretical model for pyruvoyl-dependent enzymatic decarboxylation of α -amino acids. *Journal of the American Chemical Society*, 1997, vol. 119, no. 49, p. 11725–11733.
- [20] ROEDER, T., SEIFERT, M., KÄHLER, CH., GEWECKE, M. Tyramine and Octopamine: Antagonistic Modulators of Behavior and Metabolism. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 2003, vol. 57, no. 1, p. 1–13.
- [21] BACHRACH, U., :The early history of polyamine research. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2010, vol. 48, p 490-495.
- [22] BACHRACH, U., Naturally Polyamines: Interaction with Macromolecules. *Current Protein and Peptide Science*, 2005, vol. 6, p 559-566.

- [23] WALLACE, H.M. The polyamines: past, present and future. *Essays in biochemistry*, 2009, vol. 46, p. 1-9.
- [24] KALÁČ, P.; Recent advances in the research on biological roles of dietary polyamines in man. *Journal of Applied Biomedicine*, 2009, vol. 7, p. 65–74.
- [25] KALÁČ, P., KŘÍŽEK, M. Biogenní aminy a polyaminy v potravinách a jejich vliv na lidské zdraví. *Potravinářská revue*, 2005, vol. 2, p. 40-42.
- [26] AGOSTINELLI, E., MARQUES, M., CALHEIROS, R., GIL, F., BATTAGLIA, V., GRANCARA, S., TONINELLO, A. Polyamines: fundamental characters in chemistry and biology. *Amino Acids*, 2010, vol. 38, p. 393–403.
- [27] IGARASHI, K., KASHIWAGI, K. Modulation of cellular function by polyamines. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2010, vol. 42, p. 39-51.
- [28] FUELL, CH., ELLIOTT, K.A., HANFREY, C.C., FRANCESCHETTI M., MICHAEL, A. J. Polyamine biosynthetic diversity in plants and algae. *Plant physiology and biochemistry : PPB / Société française de physiologie végétale*, 2010, vol. 48, no. 7, p. 513–520.
- [29] LARQUÉ, E.; SABATER-MOLINA, M.; ZAMORA, S. Biological significance of dietary polyamines. *Nutrition*, 2007, vol. 23, no. 1 p. 87–95.
- [30] KALÁČ, P. Biologically active polyamines in beef, pork and meat product: A review. *Meat Science*, 2006, vol. 73, p. 1–11.
- [31] KALÁČ, P., KRAUSOVÁ, P. A review of dietary polyamines: Formation, implications for growth and health and occurrence in food. *Food Chemistry*, 2005, vol. 90, p. 219–230.
- [32] MEDINA, M. Á., URDIALES, J. L., RODRÍGUEZ-CASO, C. R., RAMÍREZ, F.J., SÁNCHEZ-JIMÉNEZ, F. Biogenic amines and polyamines: Similar biochemistry for different physiological missions and biomedical applications. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 2003, vol. 38, no. 1, p. 23-59
- [33] HAMDANI, S., RIAHI- TAJMIR, H. A., CARPENTIER, R. Methylamine interaction with proteins of photosystem II: A comparison with biogenic polyamines. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 2009, vol. 96, no. 3, p. 201-206.

- [34] BEUCHEMIN, R., HARNOIS, J., ROUILLON, R.,TAJMIR-RIahi, H.A., CARPENTIER, R. Interaction of polyamines with proteis of photosystem II: Cation binding and photosynthetic oxygen evolution. *Journal of Molecular Structure*, 2007, vol. 833, no. 1-3, p. 169-174.
- [35] WALLACE, H.M., FRASER, A.V., HUGHES, A. A perspective of polyamine metabolism. *Biochemical Journal*, 2003, vol. 376, no. 1, p. 1–14.
- [36] SANTOS, C.W., SOUZA M.R., CERQUEIRA M.M.O.P., GLÓRIA, M.B.A. Bioactive amines formation in milk by *Lactococcus* in the presence or not of rennet and NaCl at 20 and 32°C. *Food chemistry*, 2003, vol. 84, no. 4, p. 595-606.
- [37] SMĚLÁ, D., PECHOVÁ, P., KOMPRDA, T., KLEJDUS, B., KUBÁŇ, V., Chromatografické stanovení biogenních aminů v trvanlivých salámech během fermentace a skladování. *Chem.Listy*, 2004, vol. 98, p. 432–437.
- [38] LANDETE, J. M., ARENA, M. E., PARDO, I., MANCA DE NADRA, M.C., FERRER, S. Comparative survey of putrescine production from agmatine deamination in different bacteria. *Food Microbiology*, 2008, vol. 25, no. 7, p. 882–887.
- [39] KUSANO, T., BERBERICH, T., TATEDA, C, TAKAHASHI, Y. Polyamines: Essential factors for growth and survival. *Planta*, 2008, vol. 228, no. 3, p. 367–381.
- [40] BATTAGLIA, V., GRANCARA, S., SATRIANO, J., SACCOCCIO, S., AGOSTINELLI, E., TONINELLO, A. Agmatine prevents the Ca²⁺ dependent induction of permeability transition in rat brain mitochondria. *Amino Acids*, 2010, vol. 38, no. 2, p. 431–437.
- [41] SEILER, N.; Catabolism of polyamines. *Amino Acids*, 2004, vol. 26, no. 3, p. 217–233.
- [42] VOET, J.G., VOET, D. *Biochemie*. 1st ed. Praha: Victoria Publishing, 1995. ISBN 8085605449.
- [43] KOOLMAN, J., ROEHM, K-H. *Color atlas biochemistry*. Stuttgart, Thieme 1996.
- [44] LOMOZNIK, L., GASOWSKA, A., BREGIER-JARZEBOWSKA, R., JASTRZAB, R. Coordination chemistry of polyamines and their interactions in ternary systems including metal ions, nucleosides and nucleotides. *Coordination Chemistry Reviews*, 2005, vol. 249, no. 21-2, p. 2335–2350.

- [45] McMURRY, J. *Organic chemistry*. přeložili JONAS, J. et. al., 1.st ed. Brno: VUTIUM, 2007. ISBN 978-80-214-3291-8.
- [46] SVOBODA, J., et al. *Organická chemie I*. 1st ed. Praha: Vydavatelství VŠCHT, 2005. 310 p. ISBN 8070805617.
- [47] CORREA, J. V., HERRERA, B., TORO-LABBÉ, A. Characterization of the reactive conformations of protonated histamine through the reaction force analysis and the dual descriptor of chemical reactivity. *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM*, 2007, vol. 817, no. 1-3, p. 111-118.
- [48] DRABIK-MARKIEWICZ, G., DEJAEGHER, B., DE MEY, E., KOWALSKA, T., PAELINCK, H., VANDER HEYDEN, Y. Influence of putrescine, cadaverine, spermidine or spermine on the formation of N-nitrosamine in heated cured pork meat. *Food Chemistry*, 2011, vol. 126, no. 4, p. 1539–1545.
- [49] STADNIK, J., DOLATOWSKI, Z.J. Biogenic amines in meat and fermented meat products. *Acta Scientiarum Polonorum. Acta Scientiarum Polonorum, Technologia Alimentaria*, 2010, vol. 9, no. 3, p. 251–263.
- [50] MATTOO, A.K., MINOCHA, S.C., HANDA, A.K. Polyamines and cellular metabolism in plants: transgenic approaches reveal different responses to diamine putrescine versus higher polyamines spermidine and spermine. *Amino acid*, 2010, vol. 38, no. 2, p. 405-413.
- [51] HALÁSZ, A., BARÁTH, Á., SIMON-SARKADI, L., HOLZAPFEL, W. Biogenic amines and their production by microorganisms in food. *Trends in Food Science and Technology*, 1994, vol. 5, no. 2, p. 42–49.
- [52] MORET, S., SMĚLÁ, D., POPULIN, T., CONTE, L.S. A survey on biogenic amines of fresh and preserved vegetables. *Food chemistry*, 2005, vol. 89, no. 3, p. 355-361
- [53] DA SILVEIRA, T., TAVARES, E., GLÓRIA, M. Profile and levels of bioactive amines in instant coffee. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2007, vol. 20, no. 6, p. 451–457.
- [54] KALÁČ, P., KRÍŽEK, M. A review of biogenic amines and polyamines in beer. *Journal of the Institute of Brewing*, 2003, vol. 109, no. 2, p. 123–128.

- [55] ANCÍN-AZPILICUETA, C., GONZÁLEZ-MARCO, A., JIMÉNEZ-MORENO, N. Current knowledge about the presence of amines in wine. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2008, vol. 48, no. 3, p. 257–275.
- [56] MORENO-ARRIBAS, M.V, POLO, M., C. *Wine chemistry and biochemistry*. Springer Science, Madrid, 2009, chapter 6A, Amino acid and Biogenic Amines. p. 163-189.
- [57] EU. Nařízení komise (ES) 2073/2005. In *Úřední věstník Evropské unie*. 2005, L 338, s. 1-26.
- [58] LATORRE-MORATALLA, M., VECIANA-NOGUÉS, T., BOVER-CID, S., GARRIGA, M., AYMERICH, T., et al. Biogenic amines in traditional fermented sausages produced in selected European countries. *Food Chemistry*, 2008, vol. 107, no. 2, p. 912–921.
- [59] KOMPRDA, T., SMĚLÁ, D., PECHOVÁ, P., KALHOTKA, L., ŠTENCL, J., KLEJDUS, B. Effect of starter culture, spice mix and temperature on biogenic amine content of dry fermented sausages. *Meat science*, 2004, vol. 67, no. 4, p. 607-616.
- [60] KOMPRDA, T., SLÁDKOVÁ, P., DOHNAL, V. Biogenic amine content in dry fermented sausages as influenced by a producer, spice mix, starter culture, sausage diameter and time of ripening. *Meat science*, 2009, vol. 83, no. 3, p. 534-542.
- [61] NAILA A., FLINT, S., FLETCHER, G., BREMER, P., MEERDINK, G. Control of biogenic amines in food-existing and emerging approaches. *Journal of Food Science*, 2010, vol. 75, no. 7, p. 139–150.
- [62] BUŇKOVÁ, L., BUŇKA, F., MANTLOVÁ, G., ČABLOVÁ, A., SEDLÁČEK, I., ŠVEC, P., PACHLOVÁ, V., KRÁČMAR, S. The effect ripening and storage conditions on the distribution of tyramine, putrescine and cadaverine in Edam-cheese. *Food microbiology*, 2010, vol. 27, no. 7, p. 880-888.
- [63] BURDYCHOVÁ, R., KOMPRDA, T. Biogenic amine-forming microbial communities in cheese. *FEMS Microbiology Letters*, 2007, vol. 276, no. 2, p. 149-155.
- [64] KOMPRDA, T., BURDYCHOVÁ, R., DOHNAL, O., CWIKOVÁ, O., SLÁDKOVÁ, P. DVOŘÁČKOVÁ, H., Tyramine production in Dutch-type semi-hard cheese from two different producers. *Food Microbiology*, 2008, vol. 25, no. 2, p. 219–227.

- [65] ÖNAL, A. A review: Current analytical methods for the determination of biogenic amines in foods. *Food Chemistry*, 2007, no. 103, p. 1475–1486.
- [66] RUIZ-CAPILLAS, C., JIMÉNEZ-COLMENERO, F. Biogenic amines in meat and meat products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2004, vol. 44, no. 7-8, p. 489–499.
- [67] MAZZUCCO, E., GOSETTI, F., BOBBA, M., ROBTTI, E., GENNARO, M.C. High-Performance Liquid Chromatography-Ultraviolet Detection Method for the Simultaneous Determination of Typical Biogenic Amines and Precursor Amino Acids. Applications in Food Chemistry. *Journal of agricultural and food chemistry*, 2010, vol. 58, p. 127-134
- [68] LA TORRE, G., SAITTA, M., GIORGIA POTORTÌ, A., DI BELLA, G., DUGO, G. High performance liquid chromatography coupled with atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry for sensitive determination of bioactive amines in donkey milk. *Journal of Chromatography A*, 2010, vol. 1217, no. 32, p. 5215–5224.
- [69] STEINER, M-S., MEIER, R.J., DUERKOP, A., WOLFBEIS, O.S. Chromogenic sensing of biogenic amines using a chameleon probe and the red – green – blue readout of digital camera images. *Analytical chemistry*, 2010, vol. 82, no. 20 p. 8402-8405.
- [70] MILLÁN, S., SAMPEDRO CARMEN, M., UNCETA, N. Simple and rapid determination of biogenic amine in wine by liquid chromatography-electrospray ionization ion trap mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 2007, no. 584, p. 145–152.
- [71] BOUCHEREAU, A., GUÉNOT, P., LARHER, F. Analysis of amines in plant materials. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 2000, vol. DRÁB, V. Tyramine production of technological important strains of *Lactobacillus*, *Lactococcus* 747, no. 1-2, p. 49–67.
- [72] MAYER, H., FIECHTER, G., FISCHER, E. A new ultra-pressure liquid chromatography method for determination of biogenic amines in cheese. *Journal of Chromatography A*, 2010, no. 1217, p. 3251–3257.
- [73] BUŇKOVÁ, L., BUŇKA, F., HLOBILOVÁ, M., VAŇÁTKOVÁ, Z., NOVÁKOVÁ, D., Tyramine production of technological important strains of *Lactobacillus*, *Lacto-*

- coccus* and *Streptococcus*. *European Food Research and Technology*, 2009, vol. 229, no. 3, p. 533–538.
- [74] KAO, Y., LIU, K., HUANG, M., CHIU, T., CHANG, H. Analysis of amino acids and biogenic amines in breast cancer cells by capillary electrophoresis using polymer solutions containing sodium dodecyl sulfate. *Journal of Chromatography A*, 2010, vol. 1217, no. 4, p. 582–587.
- [75] DADÁKOVÁ, E., KŘÍŽEK, M., PELIKÁNOVÁ, T. Determination of biogenic amines in foods using ultra-performance liquid chromatography (UPLC). *Food Chemistry*, 2009, vol. 116, no. 1, p. 365–370.
- [76] KOMPRDA, T., SLÁDKOVÁ, P., PETIROVÁ, E., DOHNAL, V., BURDYCHOVÁ, R. Tyrosine and histidine – decarboxylase positive lactic acid bacteria and enterococci in dry fermented sausages. *Meat Science*, 2010, vol. 86, no. 3, p. 870–877.
- [77] KLOUDA, P. *Moderní analytické metody*. 2nd ed. Ostrava: nakladatelství Pavel Klou-
da, 2003. 132 p. ISBN 80-86369-07-2.
- [78] SALAŠ, J. a kol. *Analytická chemia*. 1st ed. Martin. Vydavatel'stvo Osveta, 1988.
- [79] KOMPRDA, T., DOHNAL, V. *Handbook of Dairy Foods Analysis*. 2010. chapter 41, Amines, p. 861–878. ISBN 978-1-4200-4631-1.
- [80] ROMERO, R., GÁZQUEZ, D., BAGUR, M. G., SÁNCHEZ-VIN˘AS, M., Optimizati-
on of chromatographic parameters for the determination of biogenic amines in wines
by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatogra-
phy A*, 2000, vol. 871, p. 75–83.
- [81] Automatický analyzátor aminokyselin AAA 400. Příručka pro uživatele. 2007, Ingos
s.r.o. Praha.
- [82] FAVARO, G., PASTORE, P., SACCANI, G., CAVALLI, S. Determination of biogenic
amines in fresh and processed meat by ion chromatography and integrated pulsed ampe-
rometric detection on Au electrode. *Food Chemistry*, 2007, vol. 105, p. 1652–1658.
- [83] SHAKILA, R. J., VASUNDHARA, T., KUMUDAVALLY, K. A comparison of the
TLC-densitometry and HPLC method for the determination of biogenic amines in fish
and fishery products. *Food Chemistry*, 2001, vol. 75, p. 255–259.

- [84] HERRERO, M., GARCÍA-CAÑAS, V., SIMO, C., CIFUENTES, A. Recent advances in the application of capillary electromigration methods for food analysis and Foodomics. *Electrophoresis*, 2010, vol. 31, no. 1, p. 205–228.
- [85] McCABE-SELLERS, BEVERLY, J., STAGGS, CATHLEEN, G., BOGLE, MARGARET, L. 2006: Tyramine in foods and monoamine oxidase inhibitor drugs: A crossroad where medicine, nutrition, pharmacy, and food industry converge. *Journal of Food Composition and Analysis* vol. 19, p. 58-65
- [86] Vyhláška č.298/1997 Ministerstva zdravotnictví.
- [87] ANDIC, S., Gençcelep, H., Tunçtürk, Y., Köse, S. The effect of storage temperatures and packaging methods on properties of mozzarella cheese. *Journal of Dairy Science*, 2010, vol. 93, no. 3, p. 849-859.
- [88] PAULSEN, P., BAUER, F. Spermine and spermidine concentration in pork loin as affected. *European Food Research and Technology*, 2007, vol. 225, p. 921-924.
- [89] STANDAROVÁ, E., BORKOVCOVÁ, I., VORLOVÁ, L. Obsah biogenních aminů v sýrech z české obchodní sítě. *Veterinářství*, 2008, roč. 58, č. 11, s. 735-738.
- [90] KOMPRDA, T., DOHNAL, V., ZÁVODNÍKOVÁ, R. Contents of Some Biologically Active Amines in a Czech Blue-vein Cheese. *Czech Journal of Food Sciences*, 2008, vol. 26, no. 6, p. 428-440.
- [91] KOMPRDA, T., NEZNALOVÁ, J., STANDARA, S.,BOVER-CID, S. Effect of starter culture and storage temperature on the content of biogenic amines in dry fermented sausage poličan. *Meat Science*, 2001, vol. 59, p. 267-276.
- [92] SUZZI, G., GARDINI, F. Biogenic amines in dry fermented sausages: a review. *International Journal of Food Microbiology*, 2003, vol. 88, no. 1, p. 41–54.
- [93] NOVELLA-RODRÍGUEZ, S., VECIANA-NOGUE'S, M.T., ROIG-SAGUE'S, A.X., TRUJILLO-MESA, A.J., VIDAL-CAROU, M.C. Evaluation of biogenic amines and microbial counts throughout the ripening of goat cheeses from pasteurized and raw milk. *Journal of Dairy Research*, 2004, vol. 71, p. 245-252.

- [94] LADERO, V., SA'NCHEZ-LLANA, E., FERNA'NDEZ, M., ALVAREZ, M. Survival of biogenic amine-producing dairy LAB strains at pasteurisation conditions. *International Journal of Food Science and Technology*, 2011, vol. 46, p. 516-521.
- [95] NOVELLA-RODRI'GUEZ, S., VECIANA-NOGUE'S, M.T., ROIG-SAGUE'S, A.X., TRUJILLO-MESA,A.J., VIDAL-CAROU, M.C. Influence of starter and nonstarter on the formation of biogenic amine in goat cheese during ripening. *J. Dairy Sci.*,2002, vol. 85, p. 2471-2478.
- [96] VALSAMAKI, K., MICHAELIDOU, A., POLYCHRONIADOU, A. Biogenic amine production in Feta cheese. *Food chemistry*, 2001, vol. 71, p. 259-266.
- [97] LADERO, V., CALLES, M., FERNÁNDEZ, M., ALVAREZ, M. Toxicological Effects of Dietary Biogenic Amines. *Current Nutrition and Food Science*, 2010, vol. 6, no. 2, p. 145-156.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

HNMT	histamin-N-metyltransferáza
MAO	monoaminoxidáza
ALDH	aldehydehydrogenáza
DAO	diaminoxidáza
ADC	arginindekarboxyláza
ODC	ornitindekarboxyláza
NCPAH	N-karbamoylputrescinaminodehydroláza
SAM	S-adenosylmetionin
SAMdc	SAM-dekarboxyláza
AIH	agmatiniminohydroláza
ATP	adenosintrifosfát
SSAT	spermin/spermidin-N-acetyltransferáza
PO	polyaminoxidázy
FAD	flavindinukleotid
GABA	kyselina γ -aminomáselná
DNA	deoxyribonukleová kyselina
RNA	ribonukleová kyselina
tRNA	transferová ribonukleová kyselina
HPLC	vysoce účinná kapalinová chromatografie
PCR	polymerázová řetězová reakce
LC	kapalinová chromatografie
GC	plynová chromatografie
TLC	tenkovrstvá chromatografie
CE	kapilární elektroforéza

UHPLC	utra vysoce účinná kapalinová chromatografie
IEC	iontově-výměnná kapalinová chromatografie
ELISA	imunoenzymatická metoda
RP-HPLC	chromatografie s reverzními fázemi
HPTLC	vysoce účinná tenkovrstvá chromatografie
FID	plamenový ionizační detektor
MC	hmotnostní spektrometr
ECD	detektor elektronového záchytu
AFID	plamenový ionizační detektor s alkalickým kovem
SDS	dodecylsulfát sodný
LEDIF	kapilární chromatografie s fluorescenčním detektorem
HPCE	vysokotlaká kapilární elektroforéza

SEZNAM OBRÁZKŮ

<i>Obrázek 1: Dekarboxylace L-aminokyselin přes pyruvoylový zbytek. Upraveno podle Bach et al [19].</i>	14
<i>Obrázek 2: Dekarboxylace L-aminokyselin přes pyridoxalfostát. Upraveno podle Kohajdová et al. [9].</i>	15
<i>Obrázek 3: Syntéza a katabolizmus histaminu. Upraveno podle Toyo'oko [11].</i>	17
<i>Obrázek 4: Metabolizmus tyraminu. Upraveno podle Roeder et al. [20].</i>	18
<i>Obrázek 5: Biosyntéza polyaminů. Upraveno podle Kusano et al. [39].</i>	21
<i>Obrázek 6: Katabolizmus polyaminů. Upraveno podle Kusano et al. [39].</i>	23
<i>Obrázek 7 Struktura molekuly DNA. Upraveno podle Koolman et. al. [43].</i>	24

SEZNAM TABULEK

<i>Tabulka 1: Systematický název a chemická struktura významných biogenních aminů.</i>	12
<i>Tabulka 2: Aminokyseliny jako prekurzory biogenních aminů.....</i>	16
<i>Tabulka 3: Systematický název a chemická struktura polyaminů.....</i>	19
<i>Tabulka 4: Skupiny vzorků.....</i>	36
<i>Tabulka 5: Složení (g) elučních a extrakčních sodno – citrátových pufrů pro stanovení biogenních aminů na objem 1l.....</i>	38
<i>Tabulka 6: Obsah histaminu, tyraminu, fenyletylaminu, putrescinu, kadaverinu, agmatinu, spermidinu a sperminu v sýrech s plísní na povrchu (skupina 1, vzorky A – B)*.....</i>	39
<i>Tabulka 7: Obsah histaminu, tyraminu, fenyletylaminu, putrescinu, kadaverinu, agmatinu, spermidinu a sperminu v sýrech s plísní na povrchu (skupina 1, vzorek C)*.....</i>	40
<i>Tabulka 8: Celkový obsah biogenních aminů v $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ v sýrech s plísní na povrchu (skupina 1).</i>	41
<i>Tabulka 9: Obsah histaminu, tyraminu, fenyletylaminu, putrescinu, kadaverinu, agmatinu, spermidinu a sperminu v sýrech s plísní uvnitř hmoty (skupina 2, vzorky D – E)*.....</i>	42
<i>Tabulka 10: Obsah histaminu, tyraminu, fenyletylaminu, putrescinu, kadaverinu, agmatinu, spermidinu a sperminu v sýrech s plísní uvnitř hmoty (skupina 2, vzorky F – G)*</i>	42
<i>Tabulka 11: Celkový obsah biogenních aminů v $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ v sýrech s plísní uvnitř hmoty (skupina 2).</i>	43
<i>Tabulka 12: Obsah histaminu, tyraminu, fenyletylaminu, putrescinu, kadaverinu, agmatinu, spermidinu a sperminu v douplíšňovém sýru (skupina 3, vzorek I)*.....</i>	44
<i>Tabulka 13: Obsah histaminu, tyraminu, fenyletylaminu, putrescinu, kadaverinu, agmatinu, spermidinu a sperminu v sýrech ementálského typu (skupina 4, vzorky J – K)*.....</i>	45
<i>Tabulka 14: Obsah histaminu, tyraminu, fenyletylaminu, putrescinu, kadaverinu, agmatinu, spermidinu a sperminu v sýrech ementálského typu (skupina 4, vzorek L)*</i>	45
<i>Tabulka 15: Celkový obsah biogenních aminů v $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ v sýrech ementálského typu (skupina 4).</i>	46
<i>Tabulka 16: Obsah histaminu, tyraminu, fenyletylaminu, putrescinu, kadaverinu, agmatinu, spermidinu a sperminu v zrajících sýrech (skupina 5, vzorky M – N)*.....</i>	47
<i>Tabulka 17: Obsah histaminu, tyraminu, fenyletylaminu, putrescinu, kadaverinu, agmatinu, spermidinu a sperminu v zrajících sýrech (skupina 5, vzorek O)*</i>	48

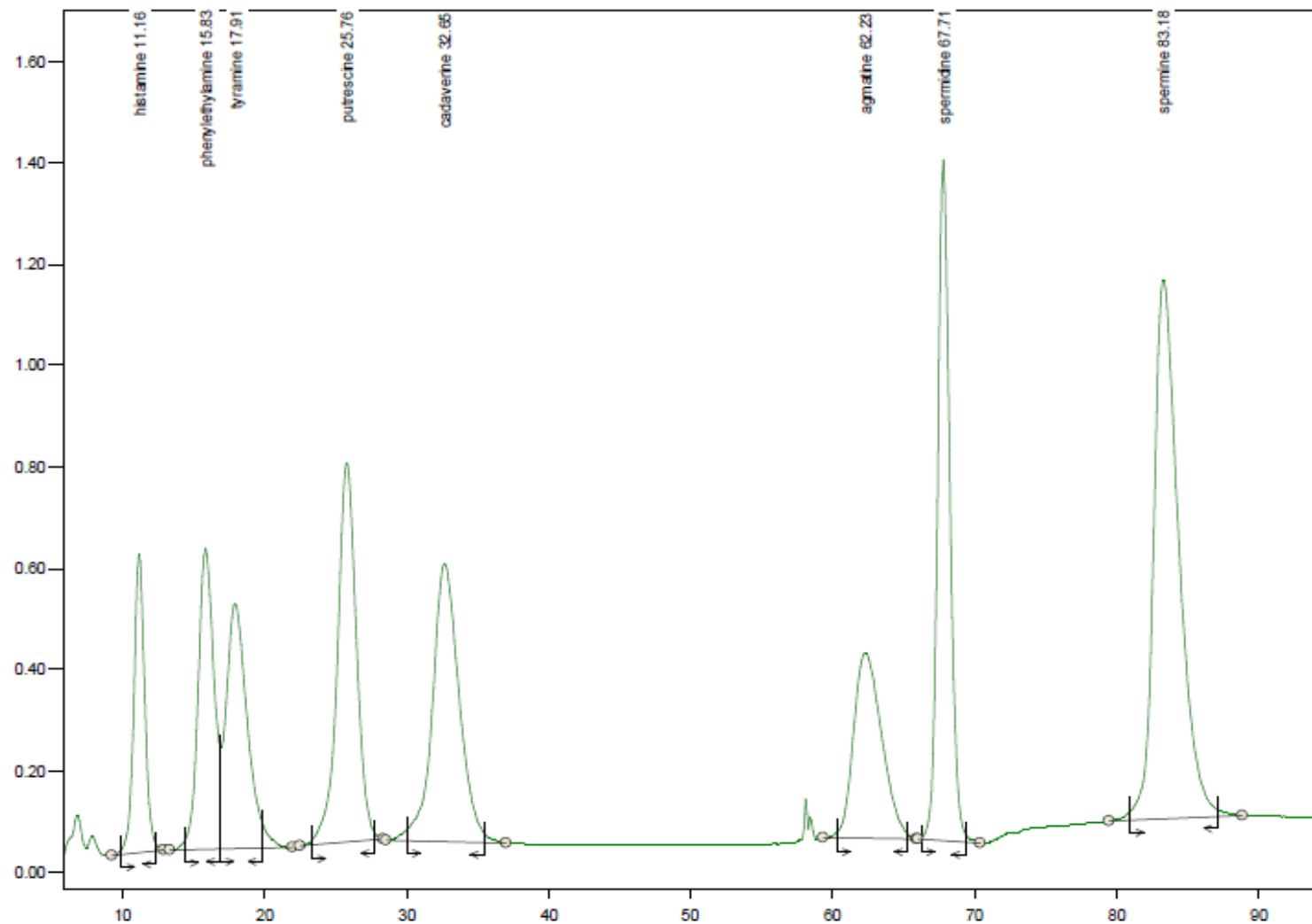
<i>Tabulka 18: Celkový obsah biogenních aminů v mg·kg⁻¹ ve zrajících sýrech (skupina 5)...</i>	49
<i>Tabulka 19: Obsah histaminu, tyraminu, fenyletylaminu, putrescinu, kadaverinu, agmatinu, spermidinu a sperminu v trvanlivých fermentovaných masných výrobcích (skupina 6, vzorky P – Q)*.....</i>	49
<i>Tabulka 20: Obsah histaminu, tyraminu, fenyletylaminu, putrescinu, kadaverinu, agmatinu, spermidinu a sperminu ve trvanlivých fermentovaných masných výrobcích (skupina 6, vzorky R – S)*.....</i>	50
<i>Tabulka 21: Obsah histaminu, tyraminu, fenyletylaminu, putrescinu, kadaverinu, agmatinu, spermidinu a sperminu v trvanlivých fermentovaných masných výrobcích (skupina 6, vzorky T – U)*.....</i>	50
<i>Tabulka 22: Obsah histaminu, tyraminu, fenyletylaminu, putrescinu, kadaverinu, agmatinu, spermidinu a sperminu v trvanlivých fermentovaných masných výrobcích (skupina 6, vzorky V – X)*.....</i>	51
<i>Tabulka 23: Obsah histaminu, tyraminu, fenyletylaminu, putrescinu, kadaverinu, agmatinu, spermidinu a sperminu v trvanlivých fermentovaných masných výrobcích (skupina 6, vzorek Z)*.....</i>	51
<i>Tabulka 24: Celkový obsah biogenních aminů v mg·kg⁻¹ v trvanlivých fermentovaných masných výrobcích (skupina 6).....</i>	53

SEZNAM PŘÍLOH

Příloha I: Chromatogram standardu biogenních aminů.

Příloha II: Chromatogram vzorku Q na konci minimální doby trvanlivosti.

PŘÍLOHA P I: CHROMATOGRAM STANDARDU BIOGENNÍCH AMINŮ



PŘÍLOHA P II: CHROMATOGRAM VZORKU Q NA KONCI MINIMÁLNÍ DOBY TRVANLIVOSTI

