

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH

PEDAGOGICKÁ FAKULTA

KATEDRA APLIKOVANÉ CHEMIE A UČITELSTVÍ CHEMIE

**Sledování obsahu biogenních aminů a polyaminů při
skladování a kuchyňských úpravách jedlých hub.**

Jana Pekárková

Vedoucí diplomové práce: doc. Ing. Eva Dadáková, Ph.D.

2013

Děkuji své vedoucí diplomové práce doc. Ing. Evě Dadákové, Ph.D. za odborné vedení, poskytnuté materiály, cenné rady a připomínky vedoucí k jejímu zdárnému dokončení.

Dále děkuji všem pracovníkům katedry chemie JU ZF, kteří se podíleli na přípravě vhodných podmínek pro moji práci.

Zároveň děkuji všem ostatním, kteří se jakkoliv podíleli na dokončení této práce.

Prohlašuji, že jsem svou diplomovou práci vypracovala samostatně na základě vlastních zjištění a za pomoci pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své diplomové práce, a to v nezkrácené podobě, fakultou elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledky obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích, 6.srpna 2013

Podpis:

SOUHRN

Cílem této diplomové práce bylo zjistit obsah osmi biogenních aminů a polyaminů, přesněji putrescinu (PUT), spermidinu (SPD), sperminu (SPM), histaminu (HIM), kadaverinu (CAD), 2-fenylethylaminu (PEA), tyraminu (TYM) a tryptaminu (TRM) v pěstovaném žampionu zahradním (*Agaricus hortensis*) během skladování, mražení a tepelných úprav.

Informací týkajících se těchto aminů v potravinách, je v dnešní době velké množství, ale bohužel údaje o obsahu aminů v jedlých houbách v literatuře stále chybí.

Koupené vzorky byly z firmy České houby a.s. sídlící v Soběslavi. Odebrané žampiony byly ihned zpracovány. Zmražené vzorky v PE sáčcích byly sledovány po dobu 0 až 3 měsíců. Vařené, blanšírované a syrové vzorky žampionů byly analyzovány na počáteční koncentraci v den 0 a následně 1., 2. a 4. den po uskladnění při 6 °C. Část vzorků z každého pokusu byla sledována po jednom dni uskladnění při 22 °C.

Naprostou nejvyšší koncentraci byla zjištěna ve všech pokusech u SPD. Změny v obsahu aminů v upravených i syrových žampionech se během 4 dnů skladování při 6 °C pohybovaly oběma směry. Nejdůležitější změny byly viditelné ihned po provedení blanšírování – výrazné zvýšení obsahu u TYM a ještě výraznější u SPM. Nárůst obsahu se projevil také po uvaření žampionů, a to u SPD a ve větší míře u SPM. Skladování při teplotě 22 °C nejvíce ovlivnilo obsah PEA – u vařených žampionů obsah značně poklesl, u blanšírovaných naopak stoupl. Také u syrových žampionů vedlo skladování při této teplotě ke značnému zvýšení obsahu SPM. Mražení výrazně neovlivnilo žádný z aminů. TRM a CAD nebyli analýzou vůbec zjištěni, HIM se na nižší úrovni objevil po uvaření žampionů a po skladování syrových žampionů při 22 °C.

Domnívám se, že zjištěné údaje mohou pomoci rozšířit údaje v literatuře a nabízejí možnost dalšího zaměření výzkumu v oblasti biogenních aminů v jedlých houbách.

Klíčová slova: žampion zahradní, biogenní aminy, polyaminy, skladování, tepelné úpravy, HPLC.

SUMMARY

The target of this thesis was found content of eight biogenic amines and polyamines, specifically putrescine (PUT), spermidine (SPD), spermine (SPM), histamine (HIM), cadaverine (CAD), 2-phenylethylamine (PEA), tyramine (TYM) and tryptamine (TRM) in growed *Agaricus hortensis* during storage, frozen and heat treatment.

There are many information dealing with these amines in the food in this time, but unfortunately data on the content of amines in edible mushrooms in literature are still missing.

The samples were providing from company České houby a.s. in Soběslav. Those mushrooms were immediately processed. Frozen samples in PE sack (plastic bags) were tracked during three months. Boiled, blanched and raw samples of mushrooms were analysed in the beginning of concentration at day 0 and then 1, 2 and 4 days at 6 °C in the storage. Some samples of each experiment monitored after one day of storage at 22°C.

Absolutely the highest concentrations found in all experiments with SPD. Changes in the content of amine modified and raw mushrooms during 4 days of storage at 6 °C flow in both directions. The most important changes are visible immediately after blanching - a significant increase in TYM and even more pronounced in SPM. The increase was also showed in the content of the cooked mushrooms, in the SPD and to a higher volume in SPM. Storage at 22 °C was mostly affected content PEA - the cooked mushrooms content significantly decreased, but blanched mushrooms increased. Also in raw mushrooms lead storage at this temperature for a significant increase in the SPM. Freezing substantially affect any of the amines. TRM and CAD analysis were not detected; HIM at lower limit was detected after cooking mushrooms and after storage of raw mushrooms at 22 °C.

I hope that the observed data can help extend the data in the literature and offers the opportunity to further focus of research in the field of biogenic amines in edible mushrooms.

Key words: *Agaricus hortensis*, biogenic amines, polyamines, storage, heat treatment, UPLC.

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AFTOL	projekt Assembling the Fungal Tree of Life
AGM	agmatin
AMK	aminokyseliny
Arg	arginin
BA	biogenní aminy
CAD	kadaverin
CZE	kapilární zonová elektroforéza
DAO	diaminoxidasa
GC	plynová chromatografie
HEP	vnitřní standard aminů
HIM	histamin
His	histidin
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
IEC	iontová chromatografie
LOQ	mez stanovitelnosti
Lys	lysin
Ort	ornithin
PA	polyaminy
PE	polyethylenový obal
PEA	2-fenylethylamin
PUT	putrescin
SPD	spermidin
SPM	spermin
TLC	chromatografie na tenké vrstvě
TRM	tryptamin
Trp	tryptofan
TYM	tyramin
Tyr	tyroxin
UPLC	ultra výkonná kapalinová chromatografie
UV	ultrafialové záření

Obsah

1 Úvod.....	9
2 Teoretická část.....	10
2.1 Taxonomie vyšších hub.....	10
2.2 Žampiony.....	10
2.2.1 Žampion polní.....	10
2.2.2 Pečárka císařská.....	11
2.2.3 Pečárka ovčí.....	12
2.2.4 Pečárka dvouvýtrusná.....	12
2.3 Houby a výživa.....	14
2.3.1 Složení hub.....	14
2.4 Pěstování hub.....	15
2.4.1 Historie a normy.....	15
2.4.2 Nejčastěji pěstované druhy hub.....	15
2.4.3 Způsob pěstování žampionů.....	16
2.5 Biogenní aminy a polyamidy.....	17
2.5.1 Vznik a reakce biogenních aminů.....	17
2.5.2 Dělení biogenních aminů.....	18
2.5.3 Výskyt biogenních aminů.....	20
2.5.3.1 BA v potravinách rostlinného a živočišného původu.....	20
2.5.3.2 Obsah BA v houbách.....	20
2.5.3.3 Sledování obsahu PA v potravinách.....	22
2.5.4 Toxikologické účinky.....	22
2.6 Analytické metody.....	23
2.6.1 Chromatografie na tenké vrstvě.....	23
2.6.2 Kapalinová chromatografie.....	23
2.6.3 Ultra výkonná kapalinová chromatografie.....	24
2.6.4 Iontová chromatografie.....	24
2.6.5 Kapilární zónová elektroforéza.....	24
3 Cíl práce.....	26
4 Experimentální část.....	27
4.1 Použité laboratorní pomůcky, chemikálie, přístroje a zařízení.....	27
4.2 Odběr vzorků.....	28
4.3 Skladovací podmínky a kuchyňské úpravy.....	28

4.3.1 Mražení.....	28
4.3.2 Skladování syrových žampionů.....	28
4.3.3 Vaření.....	28
4.3.4 Blanšírování (dušení).....	29
4.3.5 Skladování při pokojové teplotě.....	29
4.4 Analytické postupy.....	29
4.4.1 Analýza BA a PA metodou HPLC.....	30
4.5 Výsledky a diskuze.....	33
4.5.1 Obsah tryptaminu, kadaverinu a histaminu.....	35
4.5.2 Obsah 2-fenylethylaminu.....	36
4.5.3 Obsah putrescinu.....	41
4.5.4 Obsah tyraminu.....	48
4.5.5 Obsah spermidinu.....	54
4.5.6 Obsah sperminu.....	60
4.5.7 Změna obsahu aminů po uvaření a blanšírování žampionů.....	66
5 Závěr.....	68
6 Použitá literatura.....	70

1 Úvod

Biogenní aminy (BA) a polyaminy (PA) jsou látky účastníci se v lidském těle řady důležitých metabolických pochodů. Pro člověka jsou tedy nepostradatelné, ale ve zvýšené míře mohou být pro lidský organismus toxické. Vznikají často v potravinách bakteriální dekarboxylací daných aminokyselin (AMK), čehož se v budoucnu může využívat ke sledování čerstvosti potravin, nekvalitních surovin nebo špatných výrobních postupů (**LADERO *et al.***).

Aminy běžně nalezneme ovoci a zelenině, v sýrech, rybách, mase a masných výrobcích, ve fermentovaných výrobcích a alkoholu (např. pivo a víno). Obsah aminů je závislý například na původním složení, způsobu balení a teplotě skladování potravin. Výzkumů zaměřených na obsah BA a PA v potravinách je za poslední roky velké množství, ale stále chybí informace věnující se aminům v jedlým houbách. Z dostupných údajů vyplývá, že nejvyššího obsahu dosahuje spermidin (SPD) a putrescin (PUT). Naopak na nízkých úrovních případně pod mezí stanovitelnosti se většinou vyskytovaly aminy kadaverin (CAD), tyramin (TYM), tryptamin (TRM) a histamin (HIM) (**DADÁKOVÁ, PELIKÁNOVÁ & KALÁČ 2009; KALÁČ & KRÍŽEK 1997**).

Cílem této diplomové práce bylo sledování osmi aminů - putrescinu (PUT), spermidinu (SPD), sperminu (SPM), histaminu (HIM), kadaverinu (CAD), 2-fenylethylaminu (PEA), tyraminu (TYM) a tryptaminu (TRM) v pěstovaném žampionu zahradním (*Agaricus hortensis*) při použití postupů a úprav prováděných běžným sběratelem a uživatelem hub. Analýza byla provedla pomocí kapalinové chromatografie s využitím techniky UPLC.

2 Teoretická část

2.1 Taxonomie vyšších hub

V dnešní době se organismy rozdělují do tří domén a to na bakterie (*Bakteria*), archebakterie (*Archea*) a eukaryota (*Eukarya*). Eukaryota se podle nových výzkumů z oblasti molekulární fylogenetiky (**SIMPSON & ROGER 2004**) dále dělí na 6 superskupin – *Excavata*, *Amoebozoa* (měňavkovci), *Chromista*, *Archeplastida* (rostliny), *Opisthokonta*, do kterých řadíme říši živočichů (*Animalia*), hub (*Fungi*), trubének (*Choanoflagellata*), plísňovek (*Ichthyosporea*) a nukleárií (*Nucleariida*), a superskupinu *Incertae sedis* („nejasného zařazení“).

Říše hub je velice rozsáhlá a rozmanitá skupina organismů, které se liší stavbou těla, životními pochody i způsobem života. Stále nové a zdokonalující se techniky ve vědeckém světě vedou odborníky k neustálému upravování fylogenetického systému této říše. Nejnovější klasifikace vznikla v roce 2007 v rámci projektu *Assembling the Fungal Tree of Life* (AFTOL), na který v roce 2009 navázala další fylogenetická studie (www.aftol.org).

Z těchto důvodů se v různých publikacích můžeme setkat s odlišným přístupem autora k této problematice a tudíž i rozdílným názvoslovím této říše.

2.2 Žampiony

Žampiony neboli pečárky jsou stopkovýtrusé (*Agaricomycetes*) houby, které řadíme do čeledi pečárkovitých (*Agaricaceae*). Do této čeledi patří také všechny druhy bedel.

2.2.1 Žampion polní

Žampion polní (*Agaricus campestris* L.), který má řadu synonymních názvů (*Agaricus campester*, *Pratella campestris*, *P. campester*, *P. flocculosa*), je jedním z nejrozšířenějších druhů žampionů u nás. Je to jedlá houba příjemné vůně a chuti, rostoucí převážně na zatravněných a hnojených plochách (louky, pole, zahrady) a to od května do listopadu.

Klobouk (4 - 10 cm) je v mládí kulovitý s podvinutým okrajem, později je spíše zploštělý. Má bílou, místy nahnědlou barvu s vláknitou a později šupinatou pokožkou. Lupeny jsou husté, v mládí světle růžové, později masově červené až černohnědé. Třeň je zpočátku válcovitý a bílý, postupně u báze růžový nebo rezavý. Kolem třeně je jednoduchý bílý prstenec, který ve stáří opadává. Dužina je pevná, bílá, po poranění zružoví. (**HAGARA 1995**)

Obrázek 1: Žampion polní (*Agaricus campestris*)



2.2.2 Pečárka císařská

Pečárka císařská nazývaná též pečárka obrovská (*Agaricus augustus* Fr.) roste v jehličnatých a listnatých lesích během července až října. Je to jedlá, všestranně upotřebitelná houba s hořkomandlovou či anýzovou vůní.

Klobouk (10 - 20 cm) je v mládí polokulovitý, později nižší až plochý. Podklad je krémový až světle okrový a na něm jsou hnědooranžové až hnědočervené šupinky. Lupeny jsou úzké, husté, nejdříve úplně bílé, později světloružové a ve stáří hnědé. Třeň je válcovitý, vespod rozšířený, hluboko v půdě, uvnitř pevný s úzkou dutinou. Nad mohutným prstencem je hladký, pod ním vločkatě šupinatý. Dužina je bílá, na řezu se zbarvuje spíše žlutohnědě, nečervená. (HAGARA 1995)

2.2.3 Pečárka ovčí

Pečárka ovčí (*Agaricus arvensis* Schff.) nebo též žampion ovčí roste od června do října. Je hojná v listnatých i jehličnatých lesích, na loukách i zahradách. Je to jedlá houba s příjemnou anýzovou vůní a oříškovou chutí.

Klobouk (5 - 15 cm) je nejprve vejcovitý, vysoko vyklenutý, později zploštělý. Je bílý až krémový, v pozdější fázi na temeni žlutý až oříškově hnědý. Lupeny jsou husté, dlouho světlé, potom šedohnědé (nikdy nemají čistě růžový odstín). Třeň je válcovitý, vespod hrubý. V mládí je plný se šťavnatou dužinou, později dutý a tuhý. Při otlačení žlutne. Má bílý blanitý prstenec. Pevná bílá dužina na řezu nemění barvu. (HAGARA 1995)

Obrázek 2: Pečárka ovčí (*Agaricus arvensis*)



2.2.4 Pečárka dvouvýtrusná

Žampion či pečárka dvouvýtrusná (*Agaricus bisporus* J.E. Lange, Pilát) je považován za synonymum žampionu zahradního (*A. hortensis*), přesněji řečeno je to bílá forma pečárky dvouvýtrusné (*A. bisporus*).

Vzhled žampionů se liší podle místa jejich růstu. Volně rostoucí pečárka dvouvýtrusná má nahnědlý třeh a hnědý, mírně šupinatý klobouk (5 - 12 cm), který přiléhá až těsně ke třeni. Má bílý až nahnědlý prsteneček. Lupeny mohou být během mládí bílé, častěji mají narůžovělou masovou barvu, která později přechází do tmavě hnědé. Dužina je bílá a po porušení dužiny získává růžové zbarvení. (SMOTLACHA & MALÝ 1999)

Oproti tomu pěstované žampiony jsou bílé s větším počtem jemných šupin na klobouku. Především v USA se pěstují i hnědé odrůdy pojmenované „crimini“ a „portabello“. Další hnědá pěstovaná odrůda se nazývá žampion krémový.

Obrázek 3: Žampion zahradní (*Agaricus hortensis*)



2.3 Houby a výživa

Mikroskopické houby jsou v dnešním světě nepostradatelné. Kvasinky se používají ke kynutí těsta, kvašení ovoce i zeleniny. Neméně důležitá je také jejich funkce při vzniku některých výrobků z mléka (kefír, plísňové sýry). Houby se podílejí i na výrobě léků (penicilin). (**KOVÁŘ 1999**)

Houby označované jako „vyšší“ se používají především v kuchyni, a to především pro své jedinečné aromatické a chuťové vlastnosti. Houby obecně mají nízkou energetickou hodnotu, přesto je jejich výživová hodnota vysoká.

FERREIRA et al. (2010) se zabývali schopností hub ovlivnit postup rakovinného bujení v lidském těle. Zdá se, že některé houby mohou být nápomocny při boji s rakovinou pro svou schopnost zvýšit antioxidační kapacitu buněk či inhibovat rakovinné buňky.

2.3.1 Složení hub

V této kapitole uvádím složení hub podle autorů **HAGARY (1995)** a **KOVÁŘE (1999)**.

Čerstvé houby obsahují 70-95 % vody. Během sušení se z hub odpaří většina vody, čímž se jejich hmotnost až desetinásobně zmenší.

Zbývá sušina obsahuje 5-35 % bílkovin. Množství bílkovin je závislé na druhu i stáří plodnice. Některé druhy mají zvýšený obsah chitinu, který snižuje využití bílkovin v těle člověka, ale napomáhá pohybu střev a tím správnému trávení. V průměru obsahuje sušina hub větší množství bílkovin než ovoce a zelenina (kromě luštěnin). Ve srovnání s masem obsahují houby pouze jednu třetinu bílkovin. Některé houby obsahují více esenciálních aminokyselin (AMK) než maso, ale v houbách jsou naopak i AMK vyvolávající alergické reakce.

Množství tuků v houbách je zanedbatelné – 0,5-3 % v sušině.

Ze sacharidů je zastoupen především výše zmíněný chitin, glykogen a dále mannany a glukany. V mladých plodnicích se nachází tzv. „houbový cukr“ neboli trehalosa. Někteří lidé nemají ve střevech enzym trehaláza, který je potřebný k rozkladu tohoto cukru, a proto nemohou trávit pokrmy z hub.

Z vitamínů obsahují houby především provitamin A, vitaminy skupiny B a také vitaminy C, D, E, a K. Obsah ve vodě rozpustných vitamínů se varem snižuje.

Z minerálních látek jsou nejvíce zastoupeny prvky draslík, fosfor, vápník, železo, sodík a měď. Obsah minerálních látek je závislý na místě růstu, složení půdy, druhu i věku houby. Bohužel houby mají schopnost vychytávat ze svého prostředí nežádoucí prvky.

Z nebezpečných prvků můžeme uvést olovo, rtuť, arzén, kadmium, chrom, vanad, berylium,

kteřé jsou houbami akumulovány ze znečištěné půdy. Přímá kontaminace plodnic emisemi z ovzduší je díky krátké životnosti hub nepatrná (**SVOBODA, ZIMMERMANNOVÁ & KALAČ 1999**).

Důležité jsou i aromatické látky podporující tvorbu slin a žaludečních šťáv, což podporuje správné trávení.

Nestravitelná část hub vláknina je také velice významná. Nedostatek vlákniny ve stravě přispívá k vzniku rakoviny střev a dalším chorobám. Houby jsou vhodné při redukčních dietách. Díky velkému objemu a delšímu času trávení vyvolávají dlouhodobý pocit sytosti. Pro nízký obsah cukru jsou využitelné i v diabetické dietě.

2.4 Pěstování hub

V České republice je běžnou praxí a tradicí chodit si pro čerstvé houby do lesa. Ve světě ovšem lidé konzumují především houby, které si koupí v obchodech a které vyrostly v pěstírnách hub. I v České republice najdeme na pultech obchodů různé druhy pěstovaných hub.

2.4.1 Historie a normy

Pěstování žampionů začalo již v 17. století ve Francii, kde se nejprve pěstovaly na záhonech, na polích nebo v bednách. V dnešní době existují specializované pěstírny, ale žampiony se dají pěstovat i v domácnostech v pytlích se substrátem. Největšími světovými producenty jsou USA, Čína, Velká Británie a Nizozemsko.

Pro prodej jedlých hub a výrobků z nich existuje v ČR norma ČSN 46 3195, která se vztahuje na jedlé houby, čerstvé nebo zpracované s výjimkou pěstovaných žampionů rodu *Agaricus*. Pro ty známe normu ČSN 46 3197, která platí pro pěstované žampiony, určené k dodání v čerstvém stavu spotřebiteli. Stanovuje tři jakostní třídy, dělí žampiony podle průměru klobouku a stanovuje požadavky na označování a balení žampionů. Prodej či výkup žampionů z běžného sběru je v ČR zakázán.

2.4.2 Nejčastěji pěstované druhy hub

Žampion zahradní či bílý (*Agaricus hortensis*) je nejčastěji pěstovaný druh, více o něm bylo zmíněno v předcházejícím textu.

Houba Shiitake neboli houževnatec jedlý (*Lentinus edodes*) pochází z Japonska, kde se pěstovala již ve 2. století našeho letopočtu. Po žampionech je nejčastěji pěstovanou houbou

na světě. Je to dřevokazná houba s výrazným aroma. Pro své pozitivní účinky na lidské tělo se též nazývá houba dlouhověkosti a v Japonsku probíhají výzkumy zabývající se jejím vlivem na imunitní systém člověka, její antibakteriální a antivirové schopnosti a schopnost snížit shlukování červených krvinek (**BISEN et al. 2010**).

Hlíva ústříčná (*Pleurotus ostreatus*) je stále častěji vyhledávaná jedlá houba. Roste na odumřelých kmenech listnatých stromů, ale dá se pěstovat i v pěstírnách nebo doma. Diskutuje se o jejích léčivých účincích způsobených mimo jiné i přírodními látkami ze skupiny statinů (**ALARCÓN et al. 2003**).

Žampion krémový či hnědý (*Agaricus brunnescens*) má na rozdíl od žampionu bílého výraznou chuť i vůni jako houby sebrané v přírodě.

„Portabello“ (*Agaricus brunensis*) nebo také „houbový steak“ je odrůda žampionu krémového. Má velké, otevřené plodnice a používá se především k přípravě houbových steaků. Malé hnědé uzavřené žampiony pěstované v USA se nazývají „crimini“.

2.4.3 Způsob pěstování žampionů

Prvním krokem pěstebního postupu je příprava kompostu, kdy se mísí seno a koňský hnůj. Pro optimální růst žampionů je důležitý správný podíl vlhkosti a provzdušnění kompostu. Substrát se tedy musí přehazovat a zalévat po dobu jednoho týdne. Během této doby vzniká v kompostu čpavek, rostou a množí se mikroorganismy a při tom vydávají teplo. Obsah dusíku v kompostu by měl být 2 %, a proto se do něj přidává slepičí trus. Další přísadou je sádrovec, který neutralizuje kyselost kompostu.

Po dvou týdnech se dává kompost do kompostéru, který ho zvlhčuje, provzdušňuje a promíchává. Po této úpravě má čokoládově hnědou barvu a páchne po čpavku. Poté dochází k pasterizaci kompostu (osm hodin se zahřívá na 58 °C, dalších pět dní je ponechán v teplotě 45 °C), která ho zbaví hmyzu a hmyzích vajíček. Několik dalších dní se ochlazuje na teplotu 25 °C. Mikroorganismy přeměňují čpavek na dusíkatý protein, který je nutný pro výživu žampionů.

Hotový kompost osejí pěstitelé zrny pšenice, která mají naočkované podhoubí žampionů. Osetá vrstva kompostu je pak překryta směsí rašeliny a hlíny, z které žampiony získávají vlhkost.

Po dvou týdnech vyrostou malé plodnice žampionů. Rostou velice rychle, každých 24 hodin zdvojnásobí svou velikost. Požadovanou velikost získají po 3 dnech a poté se mohou sklízet. Pokud se při sběru neporuší podhoubí, za tři až pět dní vyrostou nové plodnice. To se opakuje po dobu tří týdnů.

Nasbírané žampiony se na půl hodiny vloží do ledničky, kde je teplota těsně nad bodem mrazu. Zastaví se tím proces růstu v žampionech. Potom putují na balicí linku, kde se zváží, naskládají do krabičky a zabalí. V obalu jsou vytvořeny díry, aby žampiony mohly dýchat. Je tím zaručena jejich delší životnost. Balíčky jsou označeny a mohou putovat ke spotřebiteli. (www.21stoleti.cz)

2.5 Biogenní aminy a polyaminy

Biogenní aminy (BA) a polyaminy (PA) jsou nízkomolekulární organické dusíkaté látky odvozené od příslušných aminokyselin. Slovo biogenní vyjadřuje jejich přítomnost v tělech rostlin, živočichů, hub i člověka a také jejich význam pro tyto organismy. Jsou pro lidské tělo nepostradatelné a zajišťují řadu důležitých funkcí našeho metabolismu. Na druhou stranu jejich zvýšený příjem může vést k nežádoucím až toxickým účinkům na naše tělo.

2.5.1 Vznik a reakce biogenních aminů

Jak bylo již zmíněno dříve, BA vznikají z aminokyselin převážně díky metabolismu nejrůznějších organismů a to dvěma možnými způsoby. Prvním z nich je dekarboxylace aminokyselin. Dekarboxylace je děj, při kterém dochází k odbourávání karboxylové skupiny v aminokyselině. V těchto reakcích je většinou přítomen enzym dekarboxyláza (odštěpuje oxid uhličitý) a vzniká primární amin. Druhý způsob vzniku BA je transaminace aldehydů a ketonů, běžná hlavně u rostlin. V tabulce č. 1 jsou uvedeny některé BA a jejich prekurzory.

Tabulka 1: Biogenní aminy a jejich prekurzory

Aminokyseliny	Biogenní aminy
histidin His	histamin
tyroxin Tyr	tyramin
tryptofan Trp	tryptamin
lysin Lys	cadaverin
ornithin Ort	putrescin

2.5.2 Dělení biogenních aminů

BA můžeme dělit podle několika hledisek. V tabulce č. 2 je dělení BA podle jejich chemické struktury. Putrescin (PUT) je diamin, ale řadíme ho mezi polyaminy, jelikož je prekurzorem spermidinu (SPD) a sperminu (SPM), jak je vidět na obr. 4, který ukazuje chemickou strukturu aminů (MOINARD, CYNOBER, BANDT 2005). BA můžeme dělit také podle počtu alkylových a arylových skupin vázaných na atom dusíku. Jsou to primární, sekundární a terciární BA.

Další dělení je podle jejich způsobu tvorby a jejich biologické role. Během roku 1990 tak byly biogenní aminy rozděleny do dvou podskupin. Biogenní aminy jako takové ve většině případů vznikají bakteriální dekarboxylací volných aminokyselin při nevhodném skladování a zpracování biologických surovin. Pokud se zvýší jejich příjem, mají škodlivé účinky na lidské zdraví. Do této skupiny řadíme monoaminy histamin (HIM), tyramin (TYR), 2-fenyletylamin (PEA) a tryptamin (TRM), z diaminů to je PUT a cadaverin (CAD) a triamin agmatin (AGM). Ve druhé skupině, do které řadíme polyaminy PUT, SPD a SPM, najdeme především látky vystupující jako přírodní složky živých organismů, které mohou mít za různých podmínek pozitivní nebo negativní účinky na lidský organismus.

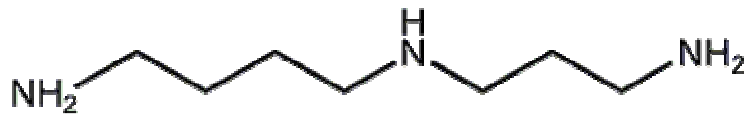
Tabulka 2: Biogenní aminy

Chemická struktura	Biogenní aminy
alifatické	putrescin
	kadaverin
aromatické	2-fenyletylamin
	tyramin
heterocyklické	histamin
	tryptamin
polyaminy	spermidin
	spermin
	putrescin
	agmatin

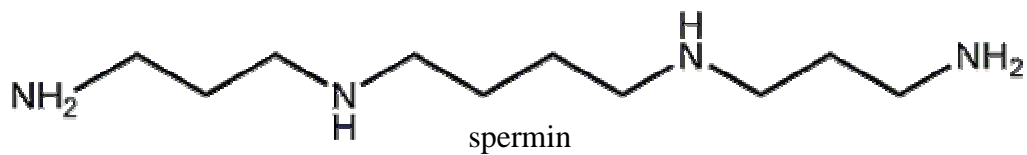
Obrázek 4: Chemická struktura aminů



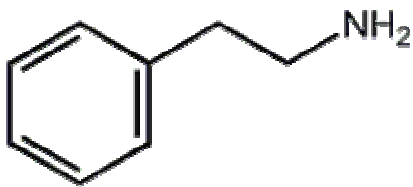
putrescin



spermidin



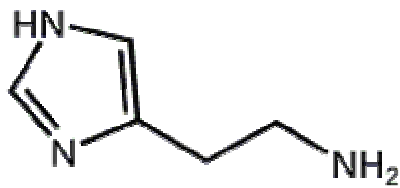
spermin



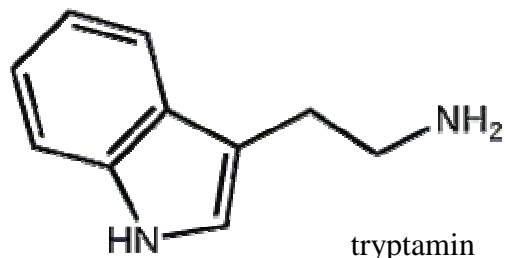
2-fenylethylamin



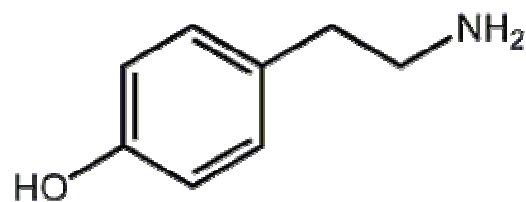
kadaverin



histamin



tryptamin



tyramin

2.5.3 Výskyt biogenních aminů

BA jsou pro lidské tělo nepostradatelné. Pokud jich je dostatečné, ale poměrně malé množství, podílejí se na řadě důležitých metabolických pochodů. Jsou důležité pro naši mozkovou činnost, regulování tělesné teploty, úpravy pH žaludku, imunitu a pro růst a diferenciaci buněk. Při překročení jejich běžného příjmu se z nich však velice rychle stanou nebezpečné až toxické látky. Mohou způsobovat bolesti hlavy, nevolnost, změnu krevního tlaku. Proto je velmi důležité sledovat jejich obsah především v potravinách. Za nejčastěji sledované BA v potravinách můžeme označit HIM, PUT, CAD, TYR, TRM, PEA, SPM a SPD. BA jsou přítomny v mnoha druzích potravin. Jejich množství se však liší jak mezi různými druhy potravin, tak i v rozložení v jednotlivých potravinách (SILLA-SANTOS 1996).

2.5.3.1 BA v potravinách rostlinného a živočišného původu

BA najdeme v čerstvých potravinách, především v ovoci a zelenině, jakožto endogenní přirozené látky. Nejčastěji se v potravinách rostlinného původu objevuje TYR, doprovázený dalšími BA. Vysokou hladinu PUT můžeme sledovat v citrusových plodech - mandarinky, pomeranče, grapefruity (KALAČ & KRAUSOVÁ 2005). U luštěnin a dalších potravin jako je například brokolice, květák či hruška, nacházíme vysoký obsah SPD a zároveň i SPM. Můžeme také říci, že obsah SPD je v potravinách rostlinného původu ve většině případů vyšší než SPM (KALAČ & KRAUSOVÁ 2005). Naopak v mase a masných výrobcích (především z teplokrevných zvířat) je poměr SPD a SPM zcela opačný, než u potravin rostlinného původu.

Vysoké obsahy BA (putrescin, spermidin, spermin) byly zjištěny v sýrech a to především v těch zrajících (NOVELLA-RODRÍGUEZ *et al.* 2003). Naopak v kravském, lidském mléce a jogurtech je obsah BA velice nízký.

2.5.3.2 Obsah BA v houbách

Výzkum v oblasti obsahu BA a PA v potravinách rostlinného i živočišného probíhá již několik desítek let a přibývají stále další informace. Avšak obsah BA a PA v jedlých houbách (ať pěstovaných či volně rostoucích) nebyl zkoumán tak často, a proto je informací v této problematice minimum.

Údaje o houbách pocházející především z Japonska ukazují vysoký obsah SPD v houbách. Jedná se o především o žampion zahradní (*Agaricus bisporus*), penízovku sametonohou (*Flammulina velutipes*), trsnatec lupenitý (*Grifola frondosa*), korálovec ježatý

(*Hericium erinaceum*), houževnatec jedlý (*Lentinus edodes*), hlívu máčkovou (*Pleurotus eryngii*), hlívu ústřičnou (*Pleurotus ostreatus*) a čirůvku větší (*Tricholoma matsutake*). Proto jsou tyto houby zařazeny do potravin s vysokou až velmi vysokou úrovní SPD. Naopak obsah SPM byl ve většině případů pod mezí detekce a PUT vykazoval velké kolísání v různých druzích testovaných hub. (**YAMAMOTO et al. 1982; OKAMOTO et al. 1997; NISHIMURA et al. 2007; NISHIBORI et al. 2007; YEN 1992**).

Volně rostoucími houbami jako například hřib hnědý (*Xerocomus badius*), hřib žlutomasý (*X. chrysenteron*) a hřib (klouzek) strakoš (*Suillus variegatus*) se zabývali **KALAČ & KRÍŽEK (1997)**. Zjišťovali obsah PUT, CAD, HIM a TYM, z čehož zdaleka největší obsah naměřili u PUT.

V další studii na toto téma bylo překvapivě zjištěno, že 17 druhů volně rostoucích hub neobsahuje CAD v zjiřitelném množství a to i přesto, že v čerstvých houbách se vyskytuje lysin jakožto prekurzor CAD (**BELUHAN & RANOGAJEC 2010; JAWORSKA, BERNAS & MICKOWSKA 2010**). Také HIM nebyl prokázán v dostatečném množství. Množství TYM ve většině případů nepřekročilo mez stanovitelnosti nebo se pohybovalo kolem 5 mg.kg⁻¹ čerstvé hmoty. Stejně tak TRM nebyl většinou objeven, pouze v hřibu hnědém se obsah pohyboval mezi 5-7 mg.kg⁻¹ čerstvé hmoty. Zvýšená koncentrace PEA byla také pozorována a nejvyšší koncentrace byla nalezena v hřibu žlutomasém a v hřibu plstnatém (*Xerocomus subtomentosus*), 35-40 mg.kg⁻¹ čerstvé hmoty. Úplně nejvyšší hodnoty byly naměřeny pro PUT, více než 150 mg.kg⁻¹ v čerstvé hmoty v hřibu žlutomasém a hřibu kováři (*Boletus erythropus*). (**DADÁKOVÁ, PELIKÁNOVÁ & KALAČ 2009**)

Vysledován byl také vliv počasí a rychlosti růstu hub na obsah BA. U hub rostoucích při vysoké vlhkosti je intenzivnější mikrobiální aktivita, díky které vzniká více aminů. Také u mladých, rychle se vyvíjejících tkání rostlin i živočichů je dokázán vyšší obsah BA (**KALAČ & KRAUSOVÁ 2005**), stejně tak je tomu i u hub. Těmito skutečnostmi lze vysvětlit rozdílné výsledky zjištěné v houbách rostoucích za suchého počasí v roce 2006 (vyšší obsah sušiny, ale nižší obsah aminů) a vlhkého počasí let následujících (**DADÁKOVÁ, PELIKÁNOVÁ & KALAČ 2009**).

Vliv stáří plodnic na obsah BA a PA nebyl jednoznačně prokázán. Ve sporotvorných částech plodnice byl zjištěn významně vyšší obsah SPD (metabolicky aktivní tkáň) (**DADÁKOVÁ, PELIKÁNOVÁ & KALAČ 2009**). Volně rostoucí jedlé houby se řadí mezi potraviny s nejvyšší zaznamenanou koncentrací SPD.

2.5.3.3 Sledování obsahu PA v potravinách

Nejvíce BA se ale objevuje u potravin připravených fermentačním procesem jako jsou sýry (**FIECHTER, SIVEC & MAYER 2012**), kyselé zelí (**KALAČ *et al.* 1999**), sójové produkty, pivo (**KALAČ, HLAVATÁ & KRÍŽEK 1996**) a víno a nebo při vystavení potravin mikrobiální kontaminaci při jejich skladování (především masné výrobky).

Pokud jsou v potravinách přítomné bakterie se schopností dekarboxylace aminokyselin, dochází k tvorbě a růstu obsahu BA. Schopnost dekarboxylace byla popsána u mnoha druhů bakterií. U fermentovaných potravin jsou hlavními tvůrci BA bakterie mléčného kvašení. BA však nejčastěji vytvářejí gramnegativní bakterie, z nichž většina je považována za patogenní. Proto by se zřejmě v budoucnu dalo využít obsahu BA v potravinách jako indikátoru čerstvosti masa, nekvalitních surovin a špatné výrobní praxe (**LADERO *et al.***).

2.5.4 Toxikologické účinky

Při požití většího množství BA se mohou u lidí a především u citlivých jedinců, nebo těch, kteří mají sníženou schopnost odbourávat BA, objevit nepříznivé odezvy. Například PUT způsobuje tachykardii, zvýšení krevního tlaku. Je podezřelý i z karcinogenních účinků. TYM vyvolává bolesti hlavy, migrény, zvracení, respirační poruchy či hypertenzi (**LADERO *et al.***). Většina potravin obsahujících větší množství BA může být v klidu konzumována, pokud jsou spotřebovány čerstvé a v malém množství (**McCABE-SELLERS, STAGGS, BOGLE 2006**).

PA jsou nutné pro růst a množení buněk, a jejich vysoké obsahy byly pozorovány v rychle se dělících buňkách, jako jsou nádorové buňky. Nádorové buňky jsou schopny vychytávat mimobuněčné PA, a proto se ukázalo jako perspektivní léčebná strategie vyloučení vnějších zdrojů PA především z potravin. Experimentálně to však u pacientů s rakovinou prokázáno nebylo (**KALAČ & KRAUSOVÁ 2005; KALAČ P. 2009**).

Pro některé potraviny jsou stanoveny limity obsahu BA. Přesto však je náročné určit toxikologickou úroveň aminů, protože závisí mimo jiné na přítomnosti dalších aminů, jejich synergickém působení a vnímavosti člověka (**SILLA SANTOS 1996**). Jejich působení na organismus člověka závisí také na jeho schopnosti detoxikace BA z organismu, která probíhá za přítomnosti specifických enzymů, například diaminoxidasy (DAO) (**SHALABY 1996**).

2.6 Analytické metody

BA v potravinách se stanovují ze dvou důvodů: zaprvé kvůli jejich možné toxicitě a zadruhé je to kvůli jejich využití jako ukazatelů jakosti potravin. Proto nejčastější žádosti o analýzu BA jsou: kontrola kvality surovin, meziproductů, výrobků, sledování fermentačních procesů a řízení výzkumů a vývoje (**ÖNAL 2007**).

Pro analýzu BA v potravinách je používáno několik metod: chromatografie na tenké vrstvě (TLC), iontová chromatografie (IEC), plynová chromatografie (GC), kapilární zónová elektroforéza (CZE) a nejčastěji využívaná vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) (**ÖNAL 2007; DADÁKOVÁ, KRÍŽEK & PELIKÁNOVÁ 2009**).

2.6.1 Chromatografie na tenké vrstvě

TLC (thin layer chromatography) je rychlá analytická metoda, při které jde o rozdělení látek mezi pohyblivou mobilní fází rozpouštědla a pevnou stacionární fází tenké vrstvy. V dnešní době se používá především jako orientační metoda.

Jednorozměrná, dvojitá TLC technika se systémem rozpouštědel chloroform – diethylether – triethylamin (6:4:1), následovaných chloroform – triethylamin (6:1) byla použita ke stanovení osmi BA. Kvantitativní stanovení se poté provádí densitometrií (**LAPA – GUIMARAES & PICKOVA 2004**). Při použití fluorescenční densitometrie jsou detekční limity 5 – 10 ng (**LAPA – GUIMARAES & PICKOVA 2004**).

2.6.2 Kapalinová chromatografie

HPLC (high-performance liquid chromatography) se používá ke stanovení přítomnosti látky a její koncentrace. Je šetrnější ke stanovení organických látek než GC, kde se pracuje za zvýšené teploty. HPLC je využívána především v průmyslu, zdravotnictví a farmacii.

HPLC má oproti běžné sloupcové chromatografii navíc vysokotlaké čerpadlo. Mobilní fáze tak může protékat menší kolonou (nejčastěji s délkou 10-20 cm a vnitřním průměrem 0,2 - 2 cm), v které je stacionární fáze vázána na částice o velikosti mikrometrů (nejčastěji 5 - 10 μm). Tím se dosahuje vyšší účinnosti a rychlosti než u TLC.

Ze vzorku jsou aminy extrahovány nejčastěji pomocí kyseliny chloristé, přičemž využíváme skutečnosti, že aminy jsou silné organické báze (**MORET & CONTE 1996**).

Při použití kapalinové chromatografie nelze ve většině případů stanovit aminy přímo, a proto musíme nejprve aminy ve vzorku derivatizovat. Derivatizace probíhá nejčastěji pomocí činidla dansylchlorid. (**DADÁKOVÁ, KRÍŽEK & PELIKÁNOVÁ 2009**).

2.6.3 Ultra výkonná kapalinová chromatografie

UPLC (ultra performance liquid chromatography) je nová separační metoda využívající v kolonách speciální sorbenty, které vynikají mimořádnou mechanickou pevností a separační účinností. Analýzy mohou tedy probíhat za vysokých tlaků (až 1000 bar, 100 MPa). Sorbenty jsou vyráběny technologií „bridged hybrid particle“.

V porovnání s tradiční HPLC je UPLC mnohokrát rychlejší, spotřebuje se při ní méně rozpouštědla, vykazuje vyšší separační účinnost a nižší mez detekce (**LIU et al. 2007**).

2.6.4 Iontová chromatografie

U iontové chromatografie (IEC) nebo také ionexové chromatografie je využíván jako stacionární fáze ionex, na kterém dochází k zachycování a výměně určitých iontů. Stacionární fáze neboli iontoměniče dělíme podle toho, jakou obsahují funkční skupinu. Kyselou funkční skupinu (např. karboxylová kyselina, sulfo- kyselina) mají katexy a nesou tedy záporný náboj. Oproti tomu anexy obsahují bazickou funkční skupinu (např. aminoskupina) a jejich náboj je kladný.

IEC je použitelná zejména pro vysoce komplexní matrice. Extrakty, vytvořené vyluhováním vzorku v kyselině chloristé, se bez jakékoliv další úpravy vstříknou na sloupec katexu. K vymývání dochází pomocí kyseliny methansulfonové. Výhodou IEC jsou nižší detekční limity ($7 - 12 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) než u dalších chromatografických metod (**FAVARO et al. 2007**). Navíc lze zapojit analyzátor aminokyselin.

2.6.5 Kapilární zónová elektroforéza

CZE (capillary zone electrophoresis) je elektromigrační metoda založená na různé pohyblivosti stanovovaných látek v elektrickém poli. Složky vzorku jsou unášeny elektroosmotickým tokem pracovního roztoku až k detektoru.

Aromatické a heterocyklické BA přirozeně absorbují světlo z UV oblasti, díky čemuž mohou být stanoveny CZE bez jejich předchozí derivatizace. Jednoduché a rychlé (4-9 minut) je stanovení HIM v tavených křemíkových kapilárách s jednoduchým pufrům. Např. v rybách byl HIM stanoven ve fosfátovém tlumivém roztoku při pH 2,5 (**ROSSANO et al. 2006**).

BOLYGO et al. (2006) použili ke stanovení HIM v rajčatech a rajčatovém protlaku citrátový pufr o pH 2,5.

Pro elektroforetickou analýzu ostatních aminů se musí provést derivatizace. Na vzorky z potravin se používá 6-aminochynolyl-N-hydroxysuccinimidyl karbamát. Sedm nejčastěji se objevujících BA v potravinách (PUT, CAD, SPD, SPM, HIM, TYM, TRM) bylo analyzováno

za 25 minut (**KOVACS et al. 1999**). Pomocí jednoduché derivatizace za použití benzoylchloridu byla analyzována stejná skupina aminů za 15 – 35 minut (**KŘÍŽEK & PELIKÁNOVÁ 1998**). Pro stanovení BA v rostlinných tkáních je nutno zvolit velmi citlivou analýzu. Derivatizace se provádí 4-fluor-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazolem a výsledek je zjišťován fluorescenční detekcí (**ZHANG et al. 2005**).

3 Cíl práce

1. Vypracování literární rešerše na téma výskytu BA a PA v potravinách.
Zaměření na různý vliv skladování a tepelných úprav hub a na obsah BA a PA.
2. Navržení a provedení experimentů, ve kterých se zkoumá vliv různých podmínek skladování a různých běžných tepelných úprav na obsah BA a PA v žampionech.
3. Stanovení vlastního obsahu BA a PA dle navržených experimentů ve vzorcích žampionů metodou HPLC.
4. Vyhodnocení získaných výsledků.

4 Experimentální část

4.1 Použité laboratorní pomůcky, chemikálie, přístroje a zařízení

Pro analýzu biogenních aminů a polyaminů byly kromě běžných laboratorních pomůcek, laboratorního skla a chemikálií používány následující chemikálie, přístroje a zařízení. Všechny používané chemikálie byly analytické čistoty (p.a.)

Chemikálie

1,7-diaminoheptan, Sigma Aldrich, Německo,
Acetonitril pro HPLC (gradient grade), Merck, Německo,
Dansylchlorid, Sigma Aldrich, Německo,
Heptan, Fluka, Buchs, Švýcarsko,
Histamin dihydrochlorid, Sigma Alrich, Německo,
Hydrogenuhličitan sodný, Lachema, Neratovice, ČR,
Kadaverin dihydrochlorid, Sigma Aldrich, Německo,
Kyselina chloristá, Acros Organic, New Jersey, USA,
Prolin, Fluka, Buchs, Švýcarsko,
Putrescin dihydrochlorid, Sigma Aldrich, Německo,
Spermidin trihydrochlorid, Sigma Aldrich, Německo,
Spermin tetrahydrochlorid, Sigma Aldrich, Německo,
Tryptamin hydrochlorid, Sigma Aldrich Německo,
Uhličitan draselný, Lachema, Neratovice, ČR,
Uhličitan sodný, Lachema, Neratovice, ČR.

Přístroje a zařízení

Analytické váhy, B 204, Metter Toledo, Švýcarsko,
Kapalinový chromatogram (RRLC) Agilent Technologies, USA
Odstředivka Sigma 2 – 5, Německo
Ponorný mixér, Bosch, Německo.
Třepačka TL2 (Kavalier Sázava, Česká republika)
Přístroj pro lyofilizaci Alpha 1-4 (Christ, Německo)

4.2 Odběr vzorků

Pro analýzu byly použity vzorky pěstovaného žampionu zahradního zakoupené ve firmě České houby a.s. sídlící v Soběslavi. Substrát, který není chemicky ošetřován, firma získává od maďarské firmy Biofungi a rašelinu jim dodává holandská firma Teptera. Přesnější postup pěstování žampionů ve firmě České houby a.s. podléhá obchodnímu tajemství a ochraně tohoto postupu.

Materiál byl sesbírán v 8:00 daného dne, z pěstírny byl odvezen dvě hodiny po sběru. V laboratoři byly žampiony zbaveny nečistot a byla z nich odstraněna asi 1 mm silná slupka. Plodnice byly rozděleny na čtvrtiny a každá část byla použita pro jeden experiment. Tím se dosáhlo zprůměrování materiálu. Plodnice byly dále nakrájeny na plátky 0,2 - 0,5 cm silné. Poté byly vytvořeny průměrné vzorky o hmotnosti přibližně 100 g. Dva vzorky byly bezprostředně po úpravě zmrazeny a lyofilizovány, aby mohl být zjištěn základní obsah BA v žampionech.

4.3 Skladovací podmínky a kuchyňské úpravy

Použité skladovací podmínky a úpravy žampionů simulovaly zacházení s houbami v běžné domácnosti. Byly tedy vybrány postupy, se kterými se běžný konzument hub setkává a na které by si měl dát pozor (skladování při pokojové teplotě)

Všechny pokusy byly provedeny ve dvou opakováních. Po vykonání experimentu byly všechny vzorky lyofilizovány (24 hodin, $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$, 0,025 mbar) a poté homogenizovány. Homogenní vzorek byl do analýzy skladován při $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ v uzavřené plastové vzorkovnici.

4.3.1 Mražení

Tři průměrné vzorky syrových žampionů byly naváženy do PE sáčků a skladovány při teplotě $-18\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ (mražení) 1, 2 a 3 měsíce.

4.3.2 Skladování syrových žampionů

Byl sledován vliv na obsah BA v syrových žampionech při skladovací teplotě $6\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 1,2, a 4 dnů. Vzorky byly skladovány v Petriho miskách.

4.3.3 Vaření

K průměrnému vzorku v PE sáčku bylo přidáno 100 g vody. Sáčky byly uzavřeny gumičkou, zahřívány 5 minut a následně 30 minut vařeny. Sáčky byly ochlazeny a skladovány 1, 2 a 4 dny v termostatu při $6\text{ }^{\circ}\text{C}$. Po uplynutí dané doby byl oddělen tekutý a tuhý podíl a

vzorky byly zmrazeny a lyofilizovány. U dvou vzorků bylo provedeno zmražení bezprostředně po vaření v den pokusu (den 0).

4.3.4 Blanšírování (dušení)

Po krátkou dobu (15 minut) byl vzorek o hmotnosti 500 g zahříván s 20 % přidané vody. Dušení žampionů probíhalo až do odpaření vody. Vzorky byly zváženy před blanšírováním a po něm, a poté rozděleny na Petriho misky (průměrné 100 g vzorky). Skladování proběhlo 1,2 a 4 dny v termostatu při 6 °C. Poté byly vzorky na Petriho misce zmrazeny a lyofilizovány. Dva vzorky byly zmrazeny a lyofilizovány ihned po provedení blanšírování (den 0).

4.3.5 Skladování při pokojové teplotě

Syrové, vařené i dušené vzorky byly skladovány jeden den ve skladu při pokojové teplotě 22 °C. Tento postup simuloval běžnou situaci opomenutí uložení hub do lednice.

4.4 Analytické postupy

U práškových vzorků získaných lyofilizací musela nejprve proběhnout extrakce aminů z matrice. Kvůli specifickému složení hub (chitin a další látky) by při použití běžného postupu pro stanovení BA a PA v mase (**KRAUSOVÁ et al. 2008**) vznikala slizká konzistence extraktu omezující filtraci a tím znehodnocující konečné výsledky analýzy. Proto byl použit postup extrakce modifikovaný pro lyofilizované houby (**DADÁKOVÁ, PELIKÁNOVÁ & KALAČ 2009**).

Takto extrahované aminy i tekuté vzorky z vývaru byly derivatizovány dansylchloridem podle níže uvedeného postupu. Kalibrační křivka byla připravena podle stejného postupu. Místo extraktu z hub byl použit 1 ml standardního roztoku aminů (HIM, TYM, PEA, TRM, PUT, CAD, SPD a SPM).

Pak následovala vlastní analýza metodou HPLC podle publikovaného postupu (**DADÁKOVÁ, KŘÍŽEK & PELIKÁNOVÁ 2009**).

4.4.1 Analýza BA a PA metodou HPLC

Extrakce – tuhé vzorky

Extrakce byla provedena podle publikovaného postupu (**DADÁKOVÁ, KŘÍŽEK & PELIKÁNOVÁ 2009**). Extrakty byly do doby analýzy skladovány v chladničce při teplotě 4 ± 1 °C. Běžná doba skladování byla kratší než jeden měsíc, ojediněle až dva měsíce.

Postup extrakce:

1. Navážení asi **1 g lyofilizovaného práškového vzorku** do centrifugační kyvety o objemu 50 ml.
2. Přidání **3,5 ml roztoku vnitřního standardu** (400 mg.l⁻¹ heptan-1,7-diaminu v 0,6 M roztoku kyseliny chloristé).
3. Přidání **0,6 M kyseliny chloristé o objemu 31,5 ml**.
4. **Homogenizace 30 minut** na horizontální třepačce (LT2, Kavalier Sázava) při laboratorní teplotě a následné **odstředění** (Sigma 2-5, průměr rotoru 272 mm) při 1800 g otáčkách za minutu po dobu 10 minut.
5. **Přefiltrování** supernatantu pomocí papírového filtru.

Derivatizace

1. Odpipetoval se **1 ml extraktu** vzorku.
2. Následovala neutralizace **1,5 ml uhličitánového roztoku**, který se připravuje vždy čerstvý.

Tabulka 3: Příprava uhličitánového neutralizačního roztoku

Počet vzorků	1	2	4	5	6	8	10
(g) K ₂ CO ₃	0,666	1,332	1,998	2,664	3,33	4,664	5,328
(ml) roztoku AB	2	4	6	8	10	14	16

Roztok AB nemusí být vždy čerstvý, příprava roztoku AB:

roztok A: Na₂CO₃ **2,65 g ad 50 ml,**

roztok B: NaHCO₃ **4,2g ad 100ml**

(pufr B musíme pomocí pufru A upravit na pH 9,2; roztok A se tedy nemusí spotřebovat celý).

3. Přidalo se **2 ml derivatizačního činidla** (roztok 5 mg dansylchloridu na 1 ml acetonu); tento roztok se připravuje také vždy čerstvý.
4. Vzorek se nechal **třepat 20 hodin ve tmě** při laboratorní teplotě.
5. Poté se přidalo **200 µl roztoku L-prolinu** (0,1 g/1 ml vody) a po zreagování nadbytečného činidla se třepalo ještě 1 hodinu ve tmě.
6. Extrakce polyaminů a BA do **3 ml heptanu**, 2,5 minuty převracet.
7. **Odebral se 1 ml supernatantu** a vzorek se nechal odpařit pod dusíkem za laboratorní teploty.
8. Odparek se rozpustil v **1,5 ml acetonitrilu** a přefiltroval se přes skleněný filtr (typ Z-7, velikost pórů 1,7 µm) do měrné vialky.

Derivatizace – tekuté vzorky

1. **Filtrace** vývaru za sníženého tlaku přes mlynářské síto.
2. Pipetoval se **1 ml vývaru**.
3. Přidalo se **100 µl vnitřního standardu** (400 mg.l⁻¹ heptan-1,7-diaminu v 0,6 M roztoku kyseliny chloristé)
4. Přidalo se **1,5 ml uhličitanového roztoku** (čerstvě připraveného) a **2 ml derivatizačního činidla** (roztok 5 mg dansylchloridu na 1 ml acetonu).
5. **20 hodin se třepalo ve tmě** při laboratorní teplotě.
6. Přidalo se **0,2 ml roztoku L-prolinu** a po protřepání (1 hodina ve tmě) se extrahovalo do **3 ml heptanu** a poté 2,5 minuty převracelo.
7. Odebral se **1 ml supernatantu, odpařil se pod dusíkem** a rozpustil v **1,5 ml acetonitrilu**.

Analytická koncovka

Analýza derivatizovaného vzorku, který obsahuje dansylderiváty přítomných aminů, byla provedena metodou kapalinové chromatografie s využitím techniky UPLC. Provedení odpovídalo publikované metodě (**DADÁKOVÁ, KRÍŽEK & PELIKÁNOVÁ 2009**).

K analýze byl používán kapalinový chromatograf vybavený binární pumou, zařízením na odplynění mobilních fází, autosamplerem, termostatem kolon a diode-array detektorem. Separace analytů probíhala v chromatografické koloně (Agilent Zorbax Eclipse XDB-C18, 50 mm x 4,6 mm ID, s velikostí částic sorbentu 1,8 µm). Koloně bylo předřazeno filtrační zařízení pro ochranu kolony (tzv. in-line filter). Vlastní chromatografická separace byla

uskutečněna s použitím mobilních fází A (100% acetonitril) a B (50% acetonitril) a gradientové eluce podle následujícího programu:

0-2 min	A 40%, B 60%
2-3 min	A 40-80%, B 60-20%
3-4 min	A 80-90%, B 20-10%
4-6 min	A 90-95%, B 10-5%
6-7 min	A 95-40%, B 5-60%
7-12 min	A 40%, B 60%

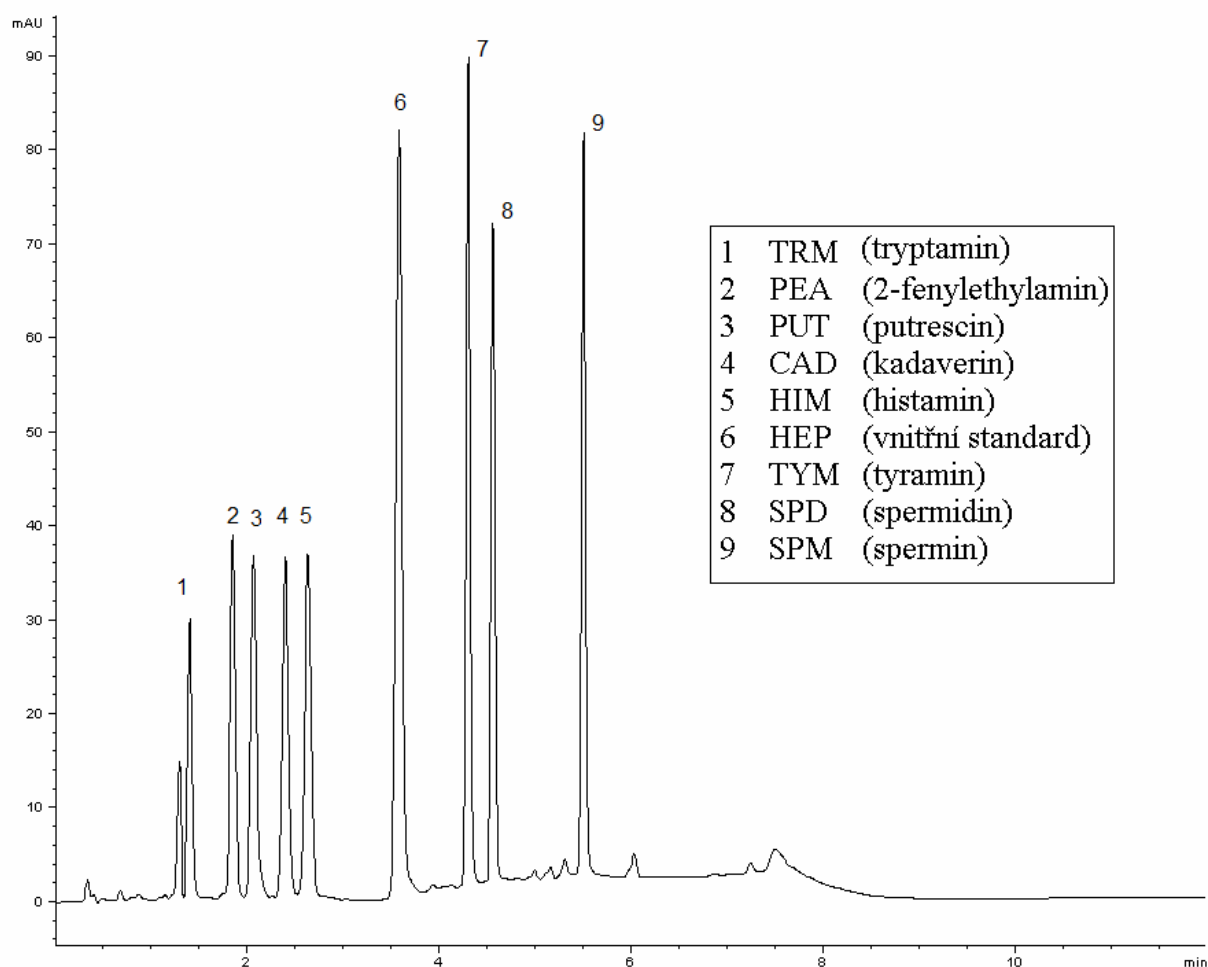
Rychlost průtoku mobilní fáze byla během celé analýzy konstantní a činila 1 ml/min. Kolona byla termostátována na 25 °C, objem nástřiku činil 5 µl a jednotlivé analyty byly detekovány při vlnové délce 225 nm.

Statistické vyhodnocení

Pro vyhodnocení výsledků analýz byl použit program ChemStation 3,0, ChemExport 2 a Microsoft Excel.

4.5 Výsledky a diskuze

Před vlastní diskuzí uvádím obrázek č. 5 ukazující záznam standardů aminů a v tabulce č. 4 meze stanovitelnosti (LOQ) jednotlivých aminů.



Obrázek 5: Záznam standardů aminů

Tabulka 4: Meze stanovitelnosti aminů v sušině (mg/kg)

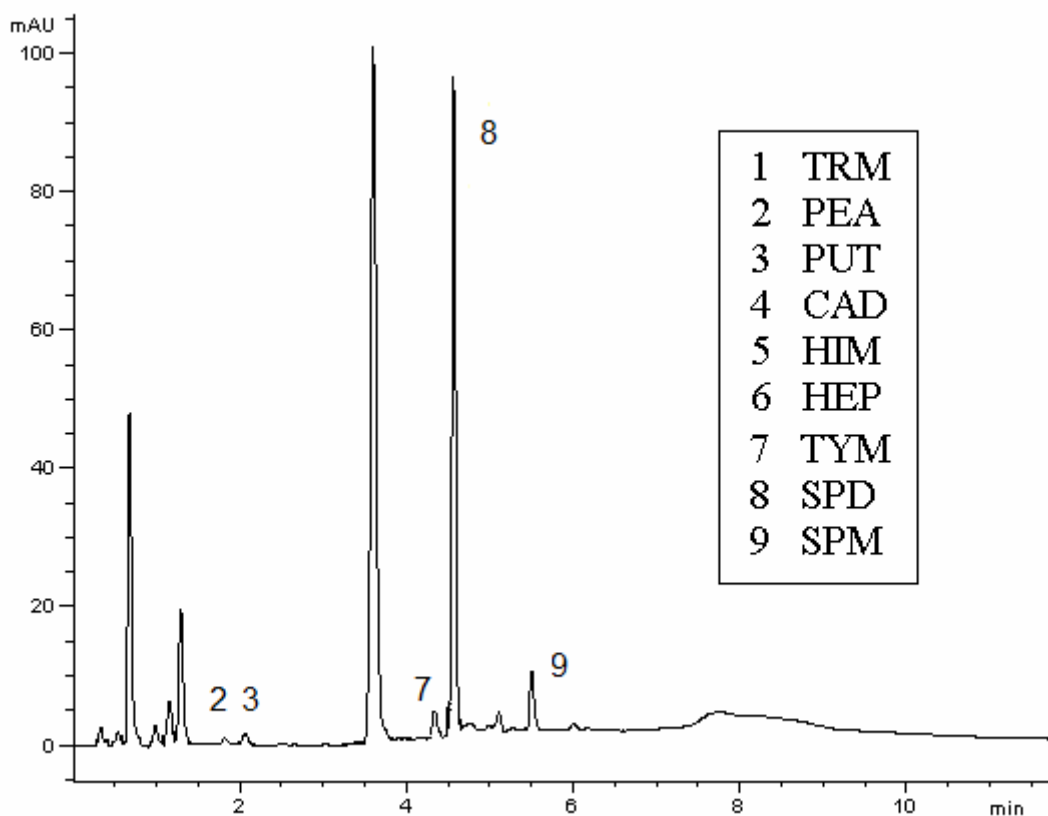
LOQ	TRM	PEA	PUT	CAD	HIM	TYR	SPD	SPM
mg/kg	2,9	2,5	2,1	1,9	1,9	3,3	1,2	3,7

Ze sledovaných aminů byly v syrových žampionech přítomny pouze PEA 7,9 mg/kg v sušině, PUT 22,1 mg/kg v suš., TYM 55,2 mg/kg v suš., SPD 925,8 mg/kg v suš. a SPM 45,1 mg/kg v suš. Tabulka č. 5 ukazuje počáteční obsah BA a PA zjištěný v syrových žampionech. Na obrázku č. 6 vidíme záznam analýzy jednoho ze vzorků.

Tabulka 5: Počáteční obsah BA a PA (mg/kg v sušině)

	Vzorek 1	Vzorek 2	Vzorek 3	Vzorek 4	Průměr
Tryptamin	LOQ	LOQ	LOQ	LOQ	-
2-fenylethylamin	9,0	7,8	8,8	6,0	7,90
Putrescin	20,9	21,2	23,4	23,0	22,1
Kadaverin	LOQ	LOQ	LOQ	LOQ	-
Histamin	LOQ	LOQ	LOQ	LOQ	-
Tyramin	54,5	59,7	52,3	54,2	55,2
Spermidin	865,9	883,1	963,5	991,1	925,9
Spermin	30,3	31,4	57,4	61,4	45,1

Obrázek 6: Záznam analýzy aminů



Zkratky viz legenda obrázku č. 5.

4.5.1 Obsah tryptaminu, kadaverinu a histaminu

Během všech měření byl obsah TRM a CAD pod hranicí stanovitelnosti, a to se přitom lysin jakožto prekurzor CAD v houbách vyskytuje ve vysokém množství (**BELUHAN & RANOGAJEC 2010; JAWORSKA, BERNAS & MICKOWSKA 2010**). CAD v čerstvých ani v dušených žampionech neobjevili ve své studii ani **KALÁČ & KRÍŽEK (1996)**, CAD našli až po ponechání čerstvých nekrájených plodnic žampionů 48 hodin při teplotě 20 °C.

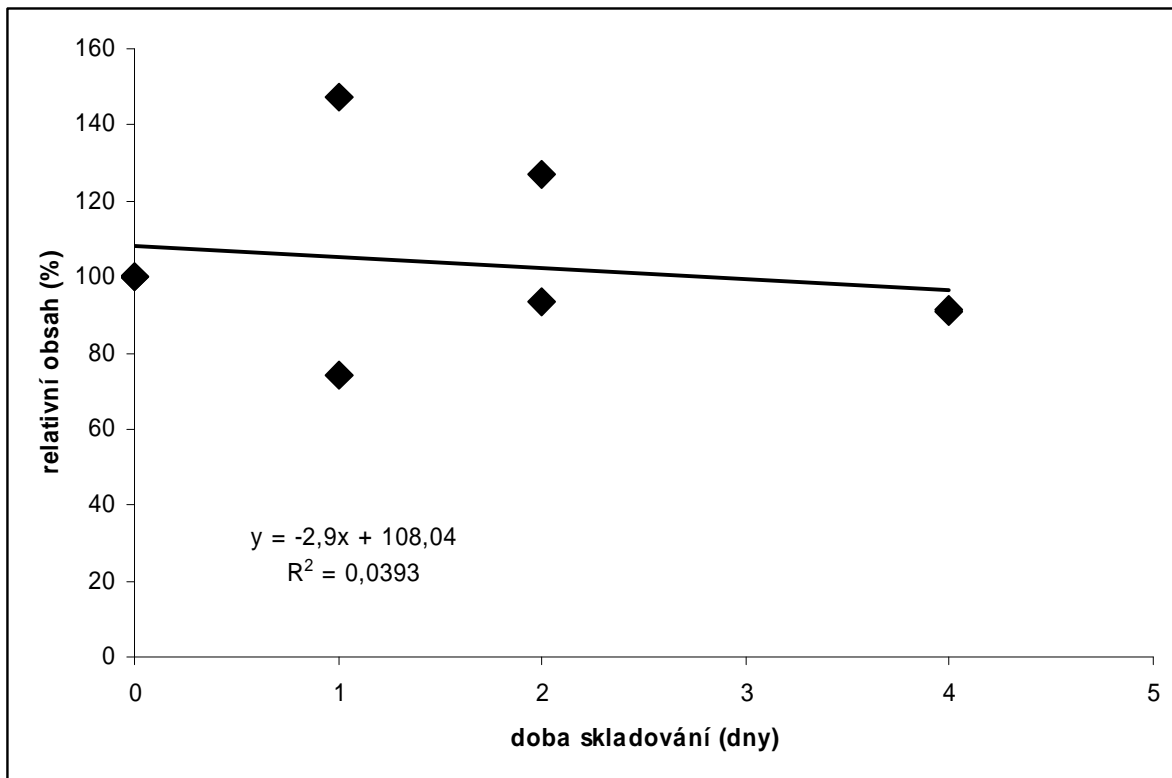
HIM byl stanoven pouze po uvaření žampionů a jejich skladování při teplotě 6 °C, jak ukazuje tabulka č. 6 a graf č. 1. HIM se objevil i v tekutém podílu z vařených žampionů a to v obsahu 0,1 mg/l. HIM byl také nalezen při pokusu skladování žampionů při pokojové teplotě a to v koncentraci pohybující se kolem 5 mg/kg v sušině.

HIM by bylo záhodno dále sledovat, neboť podle studie publikované autory **BODMER, IMARK & KNEUBÜHL (1999)** zvýšený obsah HIM ukazuje na mikrobiální kontaminaci potravin a může u některých lidí s nedostatečnou aktivitou diaminoxidázy způsobovat intoleranci na určité potraviny (např. fermentované potraviny).

Tabulka 6: Obsah HIM při vaření

Doba skladování (dny)	0	1	2	4
Vaření - vzorek A				
Průměrný obsah v sušině (mg/kg)	5,2	3,9	4,9	4,8
Relativní obsah (%)	100	74,0	93,6	91,0
Vaření - vzorek B				
Průměrný obsah v sušině (mg/kg)	5,2	7,7	6,6	4,8
Relativní obsah (%)	100	147,1	126,8	91,2

Graf 1: Obsah HIM při vaření



I přes některá kolísání v průběhu skladování vařených žampionů se průměrný obsah HIM pohybuje kolem 5 mg/kg v sušině. Maximální hodnoty 7,7 mg/kg bylo dosaženo první den skladování.

Minimální zjištěné obsahy HIM, CAD a TRM se shodují s výsledky studie autorů **DADÁKOVÁ, PELIKÁNOVÁ & KALÁČ (2009)**.

4.5.2 Obsah 2-fenylethylaminu

PEA byl stanovován v žampionech ihned po odebrání vzorků a při mražení žampionů po dobu jednoho, dvou a třech měsíců. Dále byl PEA stanoven po skladování vzorků při teplotě 6 °C, po blanšírování a vaření. Tato měření byla provedena po 1, 2 a 4 dnech. Při každém pokusu byly dva vzorky též ponechány jeden den při pokojové teplotě 22 °C a po této době také změřeny.

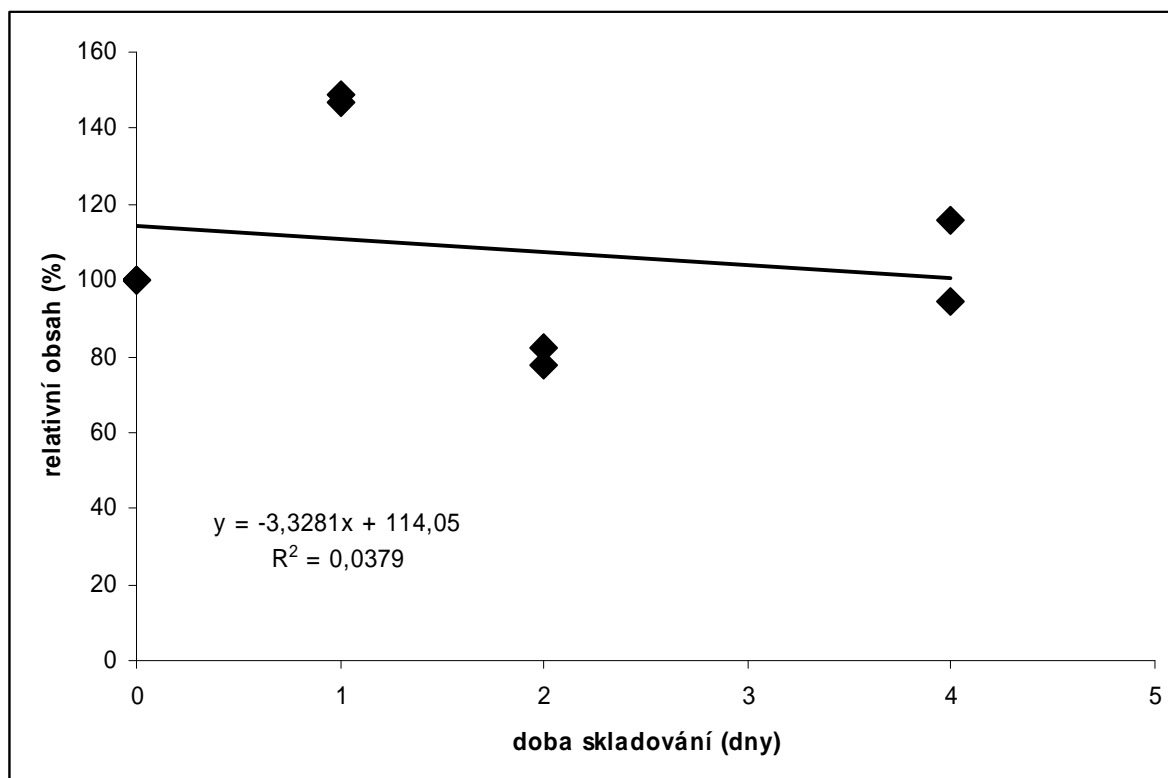
Obsah PEA při blanšírování, skladování a vaření ukazuje tabulka č. 7. Hodnoty PEA pro blanšírování jsou znázorněny v grafu č. 2, pro skladování v grafu č. 3 a pro vaření v grafu č. 4.

Tabulka č. 8 ukazuje hodnoty vzorků skladovaných při teplotě 22 °C. Obsah PEA během mražení klesl pod mez stanovitelnosti, a proto se při analýze neobjevil.

Tabulka 7: Obsah PEA při kuchyňských úpravách

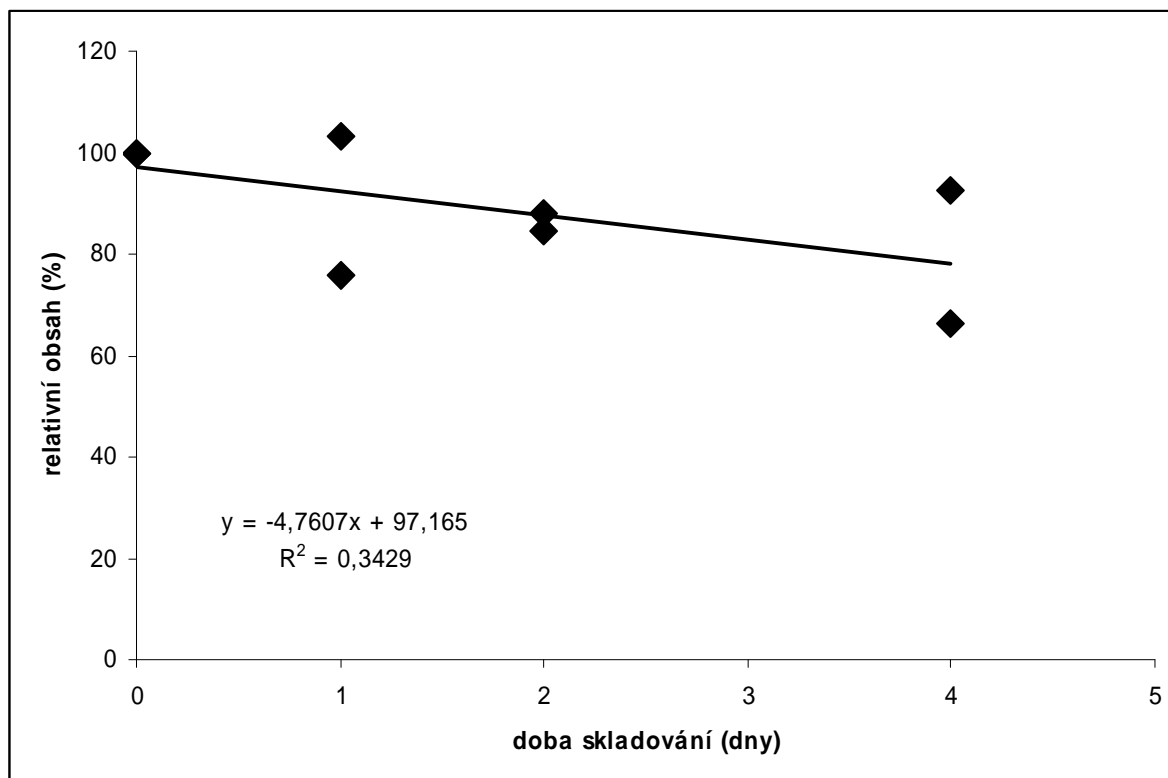
Doba skladování (dny)	0	1	2	4
Blanšírování - vzorek A				
Průměrný obsah v sušině (mg/kg)	6,7	9,8	5,5	6,3
Relativní obsah (%)	100	146,9	82,3	94,7
Blanšírování - vzorek B				
Průměrný obsah v sušině (mg/kg)	6,9	10,2	5,3	7,9
Relativní obsah (%)	100	146,9	77,6	115,7
Skladování (6 °C) – vzorek A				
Průměrný obsah v sušině (mg/kg)	8,4	8,7	7,1	5,6
Relativní obsah (%)	100	103,1	84,6	66,5
Skladování (6 °C) – vzorek B				
Průměrný obsah v sušině (mg/kg)	7,4	5,6	6,5	6,9
Relativní obsah (%)	100	75,8	88,2	92,5
Vaření – vzorek A				
Průměrný obsah v sušině (mg/kg)	8,8	5,9	8,6	7,9
Relativní obsah (%)	100	67,6	98,2	89,9
Vaření – vzorek B				
Průměrný obsah v sušině (mg/kg)	6,1	9,3	7,6	7,5
Relativní obsah (%)	100	152,4	124	123,0

Graf 2: Obsah PEA při blanširování



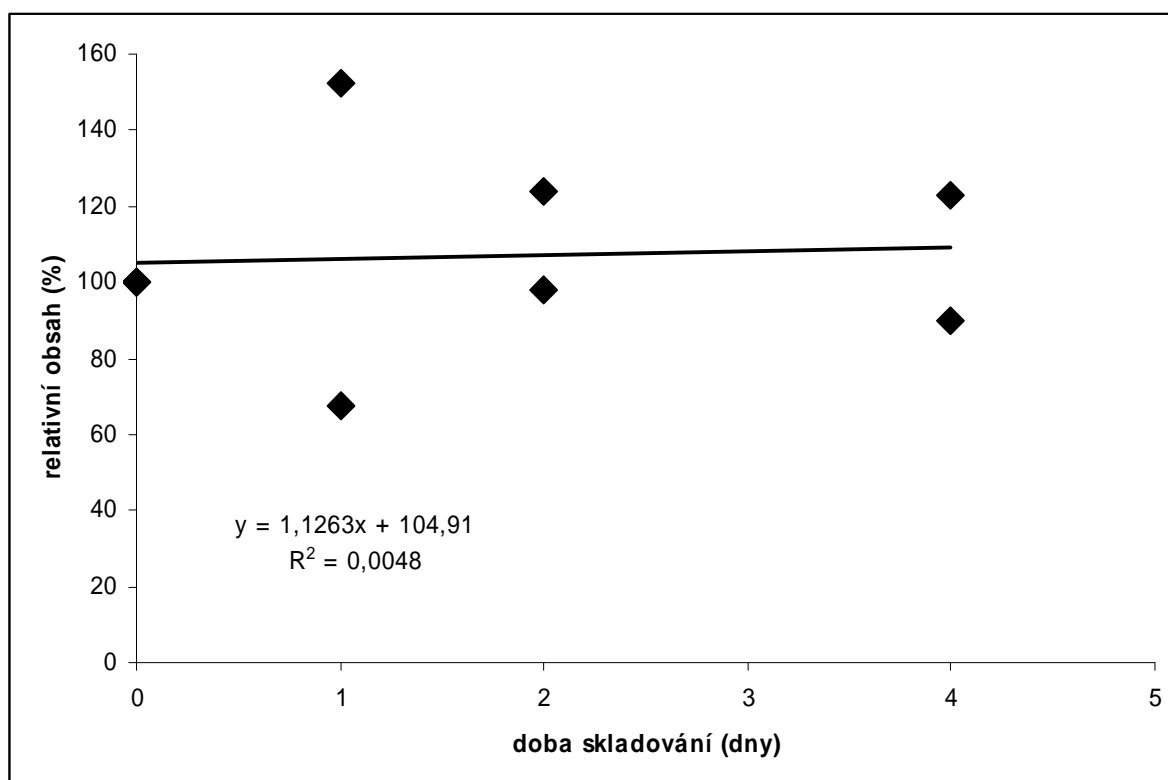
Z tabulky č. 7 a grafu č. 2 vyplývá, že k největšímu nárůstu PEA došlo první den po provedení pokusu, a to až na 149 % relativního obsahu po blanširování. Další dny docházelo k poklesu relativního obsahu PEA, přesto průměrný relativní obsah během čtyř dnů skladování stoupl v průměru na 111 %.

Graf 3: Obsah PEA při skladování



Z tabulky č. 7 a grafu č. 3 je patrné, že během čtyř dnů skladování při 6 °C došlo ke snížení relativního obsahu PEA na 85 %.

Graf 4: Obsah PEA při vaření



Tabulka č. 7 a graf č. 4 ukazují kolísání obsahu PEA během skladování vařených žampionů, v průměru však nedošlo k poklesu ani ke zvýšení relativního obsahu PEA..

V tekutém podílu z vařených žampionů se PEA neobjevil.

Tabulka 8: Obsah PEA během skladování při 22 °C

	Vzorek A		Vzorek B	
Den skladování při 22 °C	0	1	0	1
Blanšírování				
Průměrný obsah v sušině (mg/kg)	6,7	10,0	6,9	6,3
Relativní obsah (%)	100	150,3	100	91,2
Skladování při 22 °C				
Průměrný obsah v sušině (mg/kg)	8,4	7,8	7,4	7,9
Relativní obsah (%)	100	92,8	100	106,9
Vaření				
Průměrný obsah v sušině (mg/kg)	8,8	6	6,1	6,4
Relativní obsah (%)	100	67,8	100	105,1

V tabulce č. 8 jsou viditelná dvě větší kolísání relativního obsahu PEA, a to při blanšírování navýšení na 150 % a naopak při vaření snížení na 68 % relativního obsahu PEA. Ostatní čtyři měření se však neodchýlila od relativního obsahu o více než 10 %.

4.5.3 Obsah putrescinu

U PUT se stanovoval základní obsah a jeho změna během skladování při 6 °C, po vaření a po blanšírování žampionů. Stanovení proběhlo vždy po jednom, dvou a čtyřech dnech. Z každého pokusu byly dva vzorky ponechány jeden den při pokojové teplotě 22 °C a poté stanoven obsah PUT.

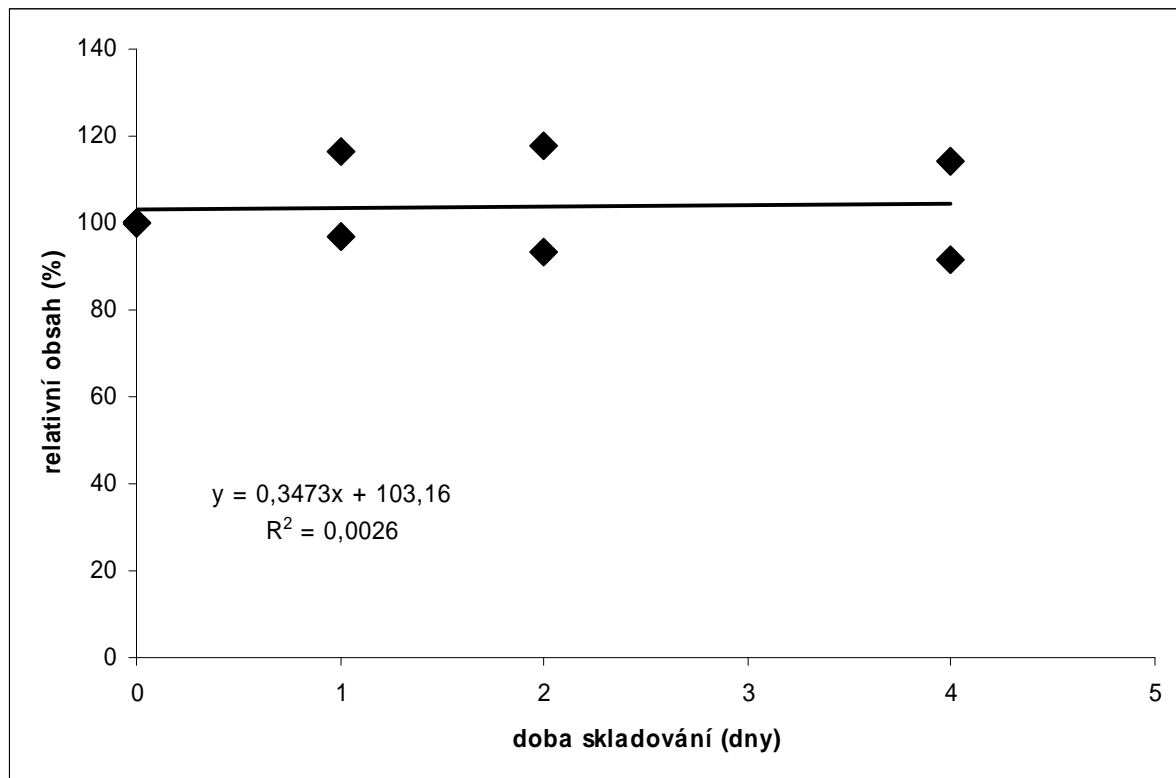
V tabulce č. 9 najdeme hodnoty zjištěné při pokusu blanšírování, skladování a vaření. Graficky je pokus blanšírování znázorněn v grafu č. 5, skladování v grafu č. 6 a vaření v grafu č. 7.

Výsledky měření vzorků ponechaných v pokojové teplotě najdeme v tabulce č. 10. Obsahy PUT v mražených vzorcích ukazuje tabulka č. 11 a znázorněny jsou v grafu č. 8.

Tabulka 9: Obsah PUT při kuchyňských úpravách

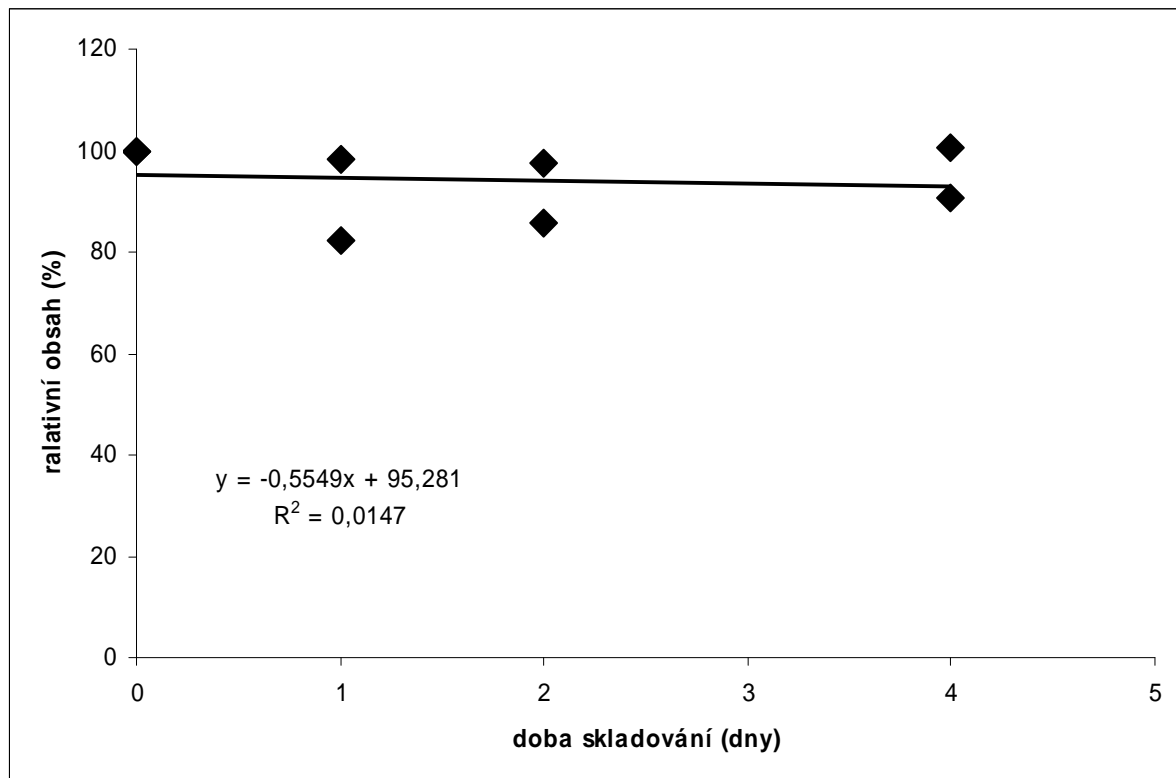
Doba skladování (dny)	0	1	2	4
Blanšírování - vzorek A				
Průměrný obsah v sušině (mg/kg)	18,3	17,7	17,1	16,8
Relativní obsah (%)	100	96,7	93,6	91,5
Blanšírování - vzorek B				
Průměrný obsah v sušině (mg/kg)	17,3	20,1	20,3	19,8
Relativní obsah (%)	100	116,4	117,7	114,4
Skladování (6 °C) – vzorek A				
Průměrný obsah v sušině (mg/kg)	21,1	20,7	20,5	21,2
Relativní obsah (%)	100	98,3	97,4	100,5
Skladování (6 °C) – vzorek B				
Průměrný obsah v sušině (mg/kg)	23,2	19,1	19,9	21,0
Relativní obsah (%)	100	82,2	85,6	90,5
Vaření – vzorek A				
Průměrný obsah v sušině (mg/kg)	20,3	18,2	18,5	20,2
Relativní obsah (%)	100	89,8	91,4	99,4
Vaření – vzorek B				
Průměrný obsah v sušině (mg/kg)	18,6	20,2	21	16,6
Relativní obsah (%)	100	108,4	112,6	89,2

Graf 5: Obsah PUT při blanširování



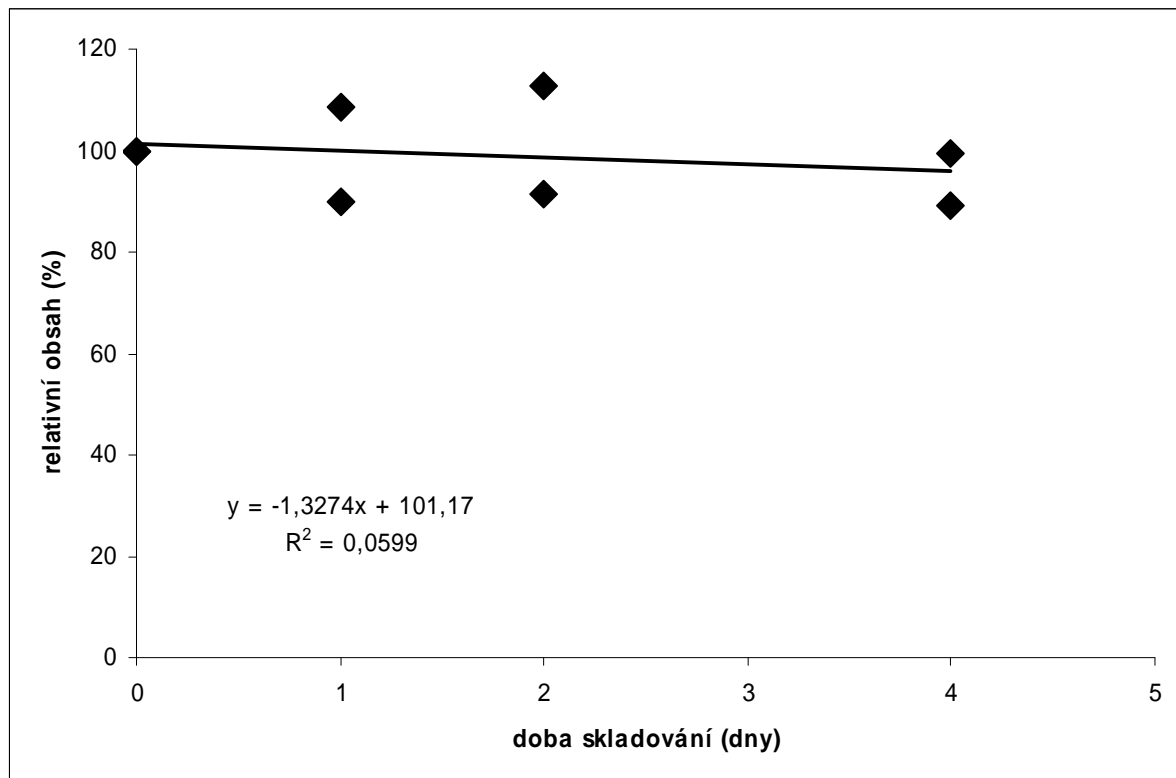
Z tabulky č. 9 a grafu č. 5 je patrné, že v průběhu skladování blanširovaných žampionů nedošlo k žádným výrazným odchylkám. Průměrně došlo během skladování ke zvýšení o necelých 5 % relativního obsahu PUT.

Graf 6: Obsah PUT při skladování



Z tabulky č. 9 a grafu č. 6 je patrné, že narozdíl od blanširování došlo při skladování ke snížení relativního obsahu PUT ve vzorcích o 8 %.

Graf 7: Obsah PUT při vaření



Tabulka č. 9 a graf č. 7 dokládají, že během vaření nedošlo k výrazné změně obsahu PUT ve vzorcích. Průměrný relativní obsah během čtyř dnů byl 98 %.

PUT se objevil i v tekutém podílu vařených žampionů a to v obsahu 0,7 mg/l vývaru.

Tabulka 10: Obsah PUT během skladování při 22 °C

	Vzorek A		Vzorek B	
Den skladování při 22 °C	0	1	0	1
Blanšírování				
Průměrný obsah v sušině (mg/kg)	18,3	18,3	17,4	16,9
Relativní obsah (%)	100	99,9	100	97,0
Skladování při 22 °C				
Průměrný obsah v sušině (mg/kg)	21,1	21,5	23,2	21,2
Relativní obsah (%)	100	102	100	91,4
Vaření				
Průměrný obsah v sušině (mg/kg)	20,3	15,1	18,6	18,5
Relativní obsah (%)	100	74,4	100	99,1

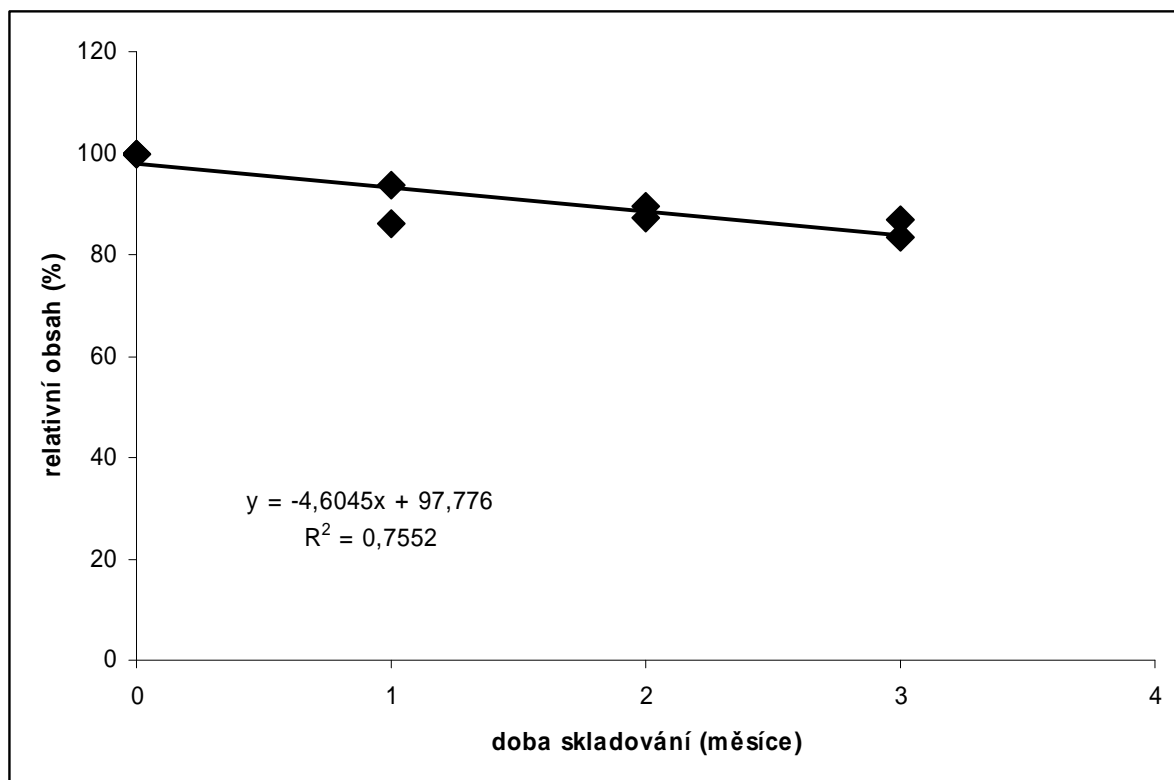
Tabulka č. 10 ukazuje, že pokojová teplota neměla na obsah PUT významný vliv. Výrazná změna byla zjištěna pouze u jednoho z vařených vzorků.

KALÁČ & KRÍŽEK (1996) pozorovali největší nárůst obsahu PUT u celých neporušených plodnic ponechaných 48 hodin při teplotě 20 °C a zvýšení obsahu PUT bylo možné sledovat i u syrových nakrájených žampionů a u dušených žampionů.

Tabulka 11: Obsah PUT během mražení

Doba skladování (měsíce)	0	1	2	3
Mražení - vzorek A				
Průměrný obsah v sušině (mg/kg)	21,1	19,7	18,9	17,6
Relativní obsah (%)	100	93,6	89,5	83,5
Mražení - vzorek B				
Průměrný obsah v sušině (mg/kg)	23,2	20,0	20,3	20,2
Relativní obsah (%)	100	86,3	87,3	86,8

Graf 8: Obsah PUT při mražení



Tabulka č. 11 a graf č. 8 ukazují pokles obsahu PUT během doby mražení. Vyjádřeno relativním obsahem průměrný pokles za 3 měsíce je 12 %.

4.5.4 Obsah tyraminu

Stejně jako u dalších aminů se TYM stanovoval při pokusech skladování při 6 °C, blanširování a vaření, a to ihned po provedení úpravy a poté první, druhý a čtvrtý den skladování. Z každého pokusu byli také ponechány vzorky jeden den při teplotě 22 °C. Také byl stanoven základní obsah TYM v žampionech. Měření obsahu TYM proběhlo také po jednom, dvou a třech měsících mražení.

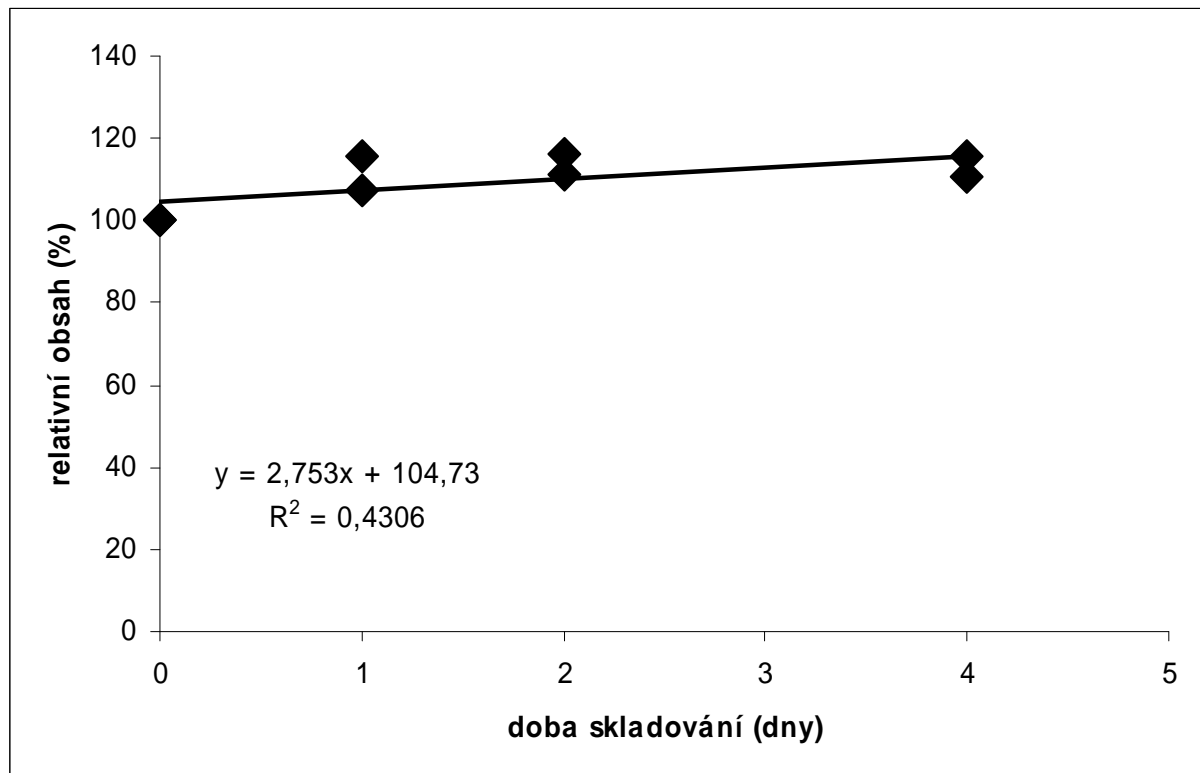
Tabulka č. 12 shrnuje data měření z pokusu blanširování, skladování a vaření. Graficky jsou tyto hodnoty znázorněny v grafech č. 9., č. 10 a č. 11. Data ze vzorků ponechaných při pokojové teplotě nalezneme v tabulce č. 13. Údaje mražených vzorků obsahuje tabulka č. 14 a grafické znázornění je v grafu č. 12.

Ve studii, kterou publikovali **KALAČ & KRÍŽEK (1996)** nebyl TYM detekován vůbec. Rozdíl může být způsoben rozdílnou koncentrací prekurzoru TYM, aminokyselinou tyroxinem.

Tabulka 12: Obsah TYM při kuchyňských úpravách

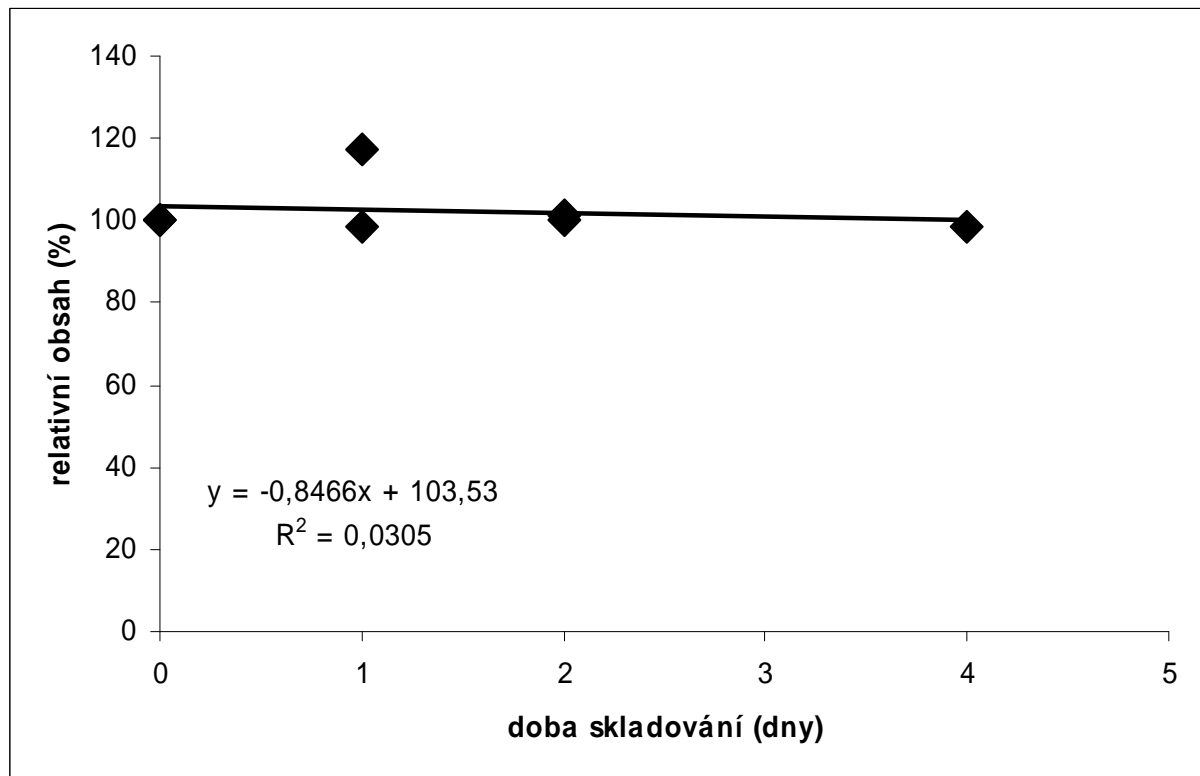
Doba skladování (dny)	0	1	2	4
Blanšírování - vzorek A				
Průměrný obsah v sušině (mg/kg)	82,8	95,8	96,1	95,6
Relativní obsah (%)	100	115,7	116,1	115,5
Blanšírování - vzorek B				
Průměrný obsah v sušině (mg/kg)	91,1	97,7	101,6	100,7
Relativní obsah (%)	100	107,2	111,4	110,5
Skladování (6 °C) – vzorek A				
Průměrný obsah v sušině (mg/kg)	57,1	56,4	57,1	56,3
Relativní obsah (%)	100	98,7	99,9	98,5
Skladování (6 °C) – vzorek B				
Průměrný obsah v sušině (mg/kg)	53,2	62,6	54,0	52,4
Relativní obsah (%)	100	117,5	101,5	98,5
Vaření – vzorek A				
Průměrný obsah v sušině (mg/kg)	30,0	33,3	31,4	31,8
Relativní obsah (%)	100	111,1	104,7	106,1
Vaření – vzorek B				
Průměrný obsah v sušině (mg/kg)	28,3	32,2	28,8	29,6
Relativní obsah (%)	100	113,5	101,7	104,6

Graf 9: Obsah TYM při blanšírování



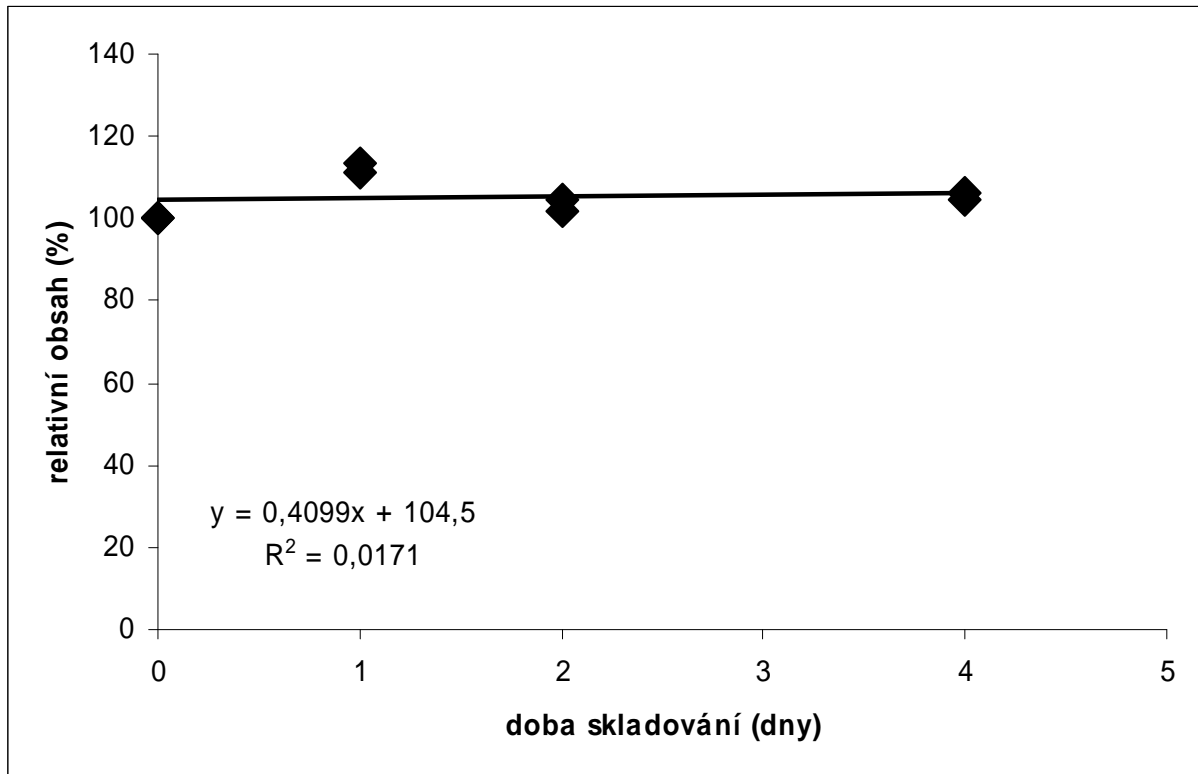
Z tabulky č. 12 a grafu č. 19 zřetelně vyplývá, že během čtyř dnů skladování docházelo k postupnému nárůstu relativního obsahu TYM, v průměru o 13 %.

Graf 10: Obsah TYM při skladování



Při pohledu na tabulku č. 12 a graf č. 10 můžeme říci, že obsah TYM se během skladování při 6 °C neměnil.

Graf 11: Obsah TYM při vaření



Z tabulky č. 12 a grafu č. 11 je zřejmé, že k nejvyššímu nárůstu TYM došlo během prvního dne skladování vařených žampionů. Následující dny došlo sice k poklesu, ale relativní obsah se stále pohyboval nad 100 %. Průměrně se relativní obsah během čtyř dnů skladování pohyboval na 107 %.

Ve vývaru z vařených žampionů bylo 0,9 mg/l TYM.

Tabulka 13: Obsah TYM během skladování při 22 °C

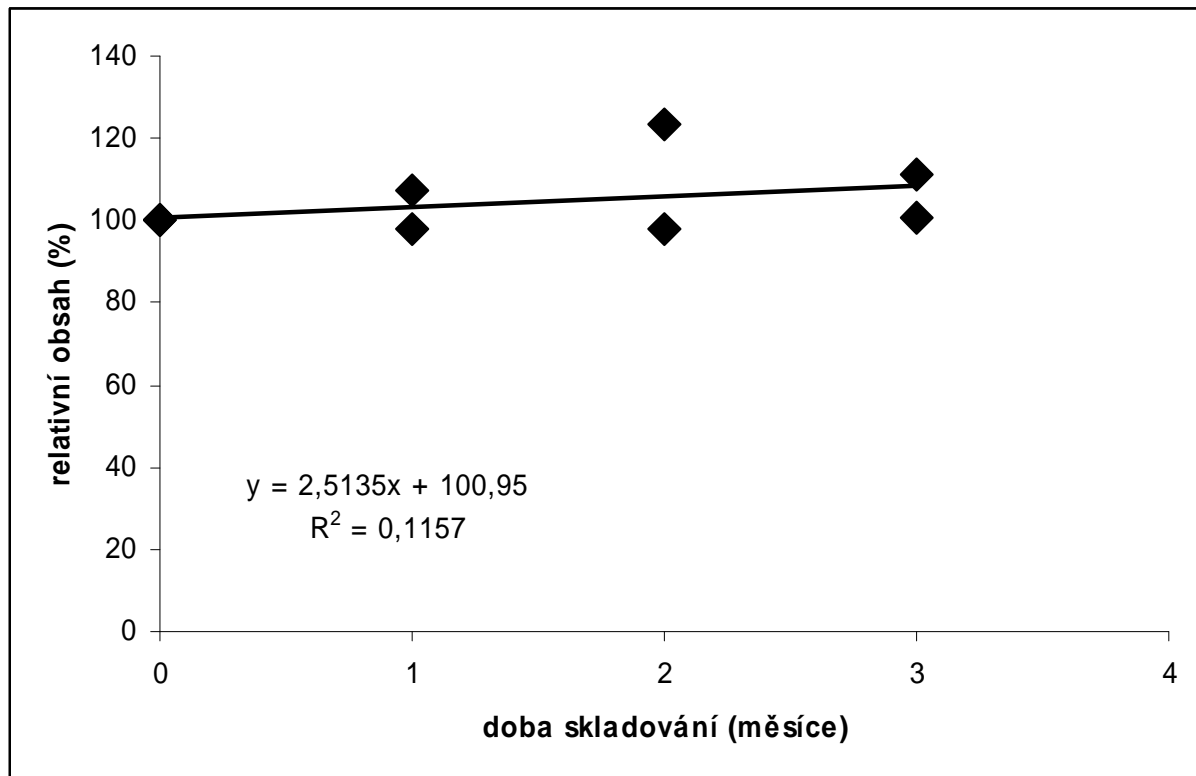
	Vzorek A		Vzorek B	
Den skladování při 22 °C	0	1	0	1
Blanšírování				
Průměrný obsah v sušině (mg/kg)	82,8	91,7	91,9	90,6
Relativní obsah (%)	100	110,8	100	98,7
Skladování při 22 °C				
Průměrný obsah v sušině (mg/kg)	57,1	46,4	53,2	45,6
Relativní obsah (%)	100	81,2	100	85,7
Vaření				
Průměrný obsah v sušině (mg/kg)	30,0	31,4	28,3	31,2
Relativní obsah (%)	100	104,6	100	110,2

Tabulka č. 13 ukazuje nepatrný nárůst obsahu TYM ve vzorcích z blanšírování a vaření. Naopak během skladování došlo k výraznějšímu poklesu relativního obsahu TYM a to o 17 %.

Tabulka 14: Obsah TYM při mražení

Doba skladování (měsíce)	0	1	2	3
Mražení - vzorek A				
Průměrný obsah v sušině (mg/kg)	57,1	55,8	55,8	57,4
Relativní obsah (%)	100	97,8	97,8	100,5
Mražení - vzorek B				
Průměrný obsah v sušině (mg/kg)	53,2	57,2	65,5	59,1
Relativní obsah (%)	100	107,5	123,2	111,0

Graf 12: Obsah TYM při mražení



Tabulka č. 14 a graf č. 12 zobrazují nepatrný nárůst obsahu TYM během mražení žampionů. Relativní nárůst během třech měsíců je 6 %.

4.5.5 Obsah spermidinu

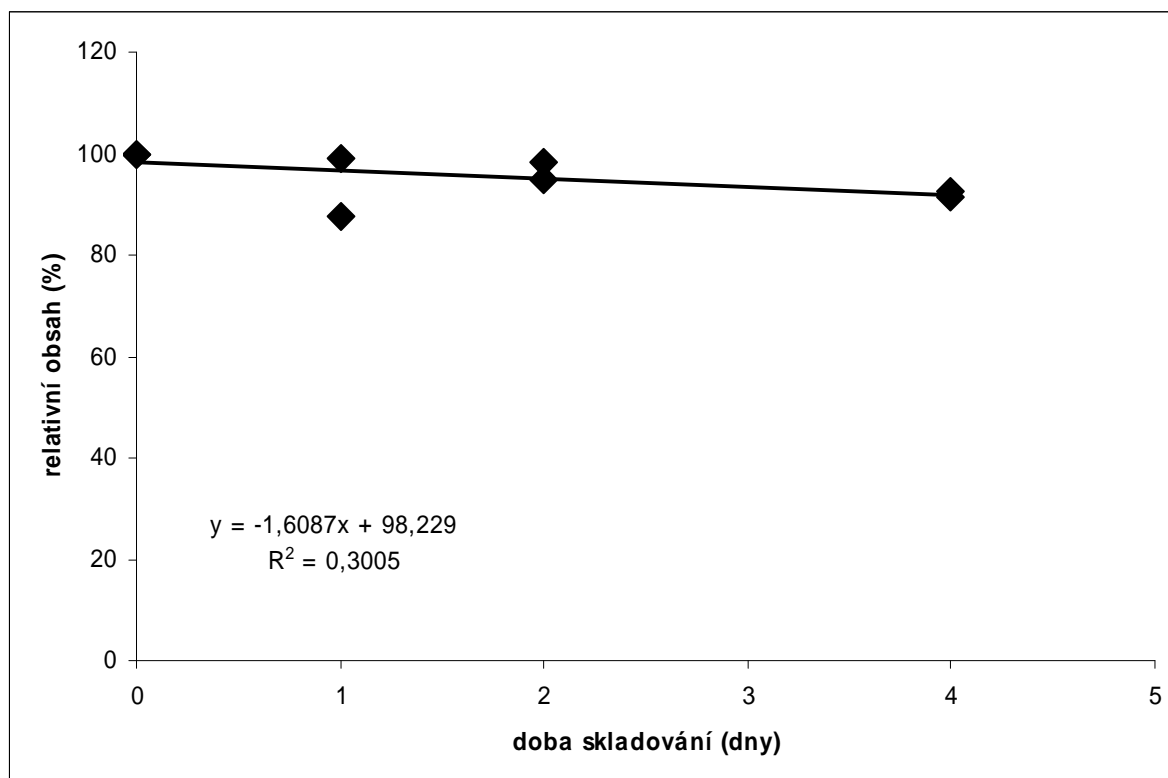
Ke stanovení SPD došlo ihned po zpracování žampionů (základní obsah) a poté po provedení kuchyňských úprav – vaření, blanšírování, skladování při 6 °C. Měření bylo provedeno ihned po úpravách, a poté po jednom, dvou a čtyřech dnech skladování. SPD se stanovoval také po ponechání vzorků ve skladu při teplotě 22 °C. Obsah SPD byl měřen také ve vzorcích umístěných v mrazáku po dobu jednoho, dvou a třech měsíců.

Získaná data z pokusů skladování při 6 °C, blanšírování a vaření ukazuje tabulka č. 15 a graficky jsou tyto hodnoty znázorněny v grafech č. 13, č. 14 a č. 15. Obsahy SPD zjištěné po skladování vzorků ve skladu při teplotě 22 °C nalezneme v tabulce č. 16. Tabulka č. 17 a graf č. 16 znázorňuje změny obsahu SPD během mražení.

Tabulka 15: Obsah SPD při kuchyňských úpravách

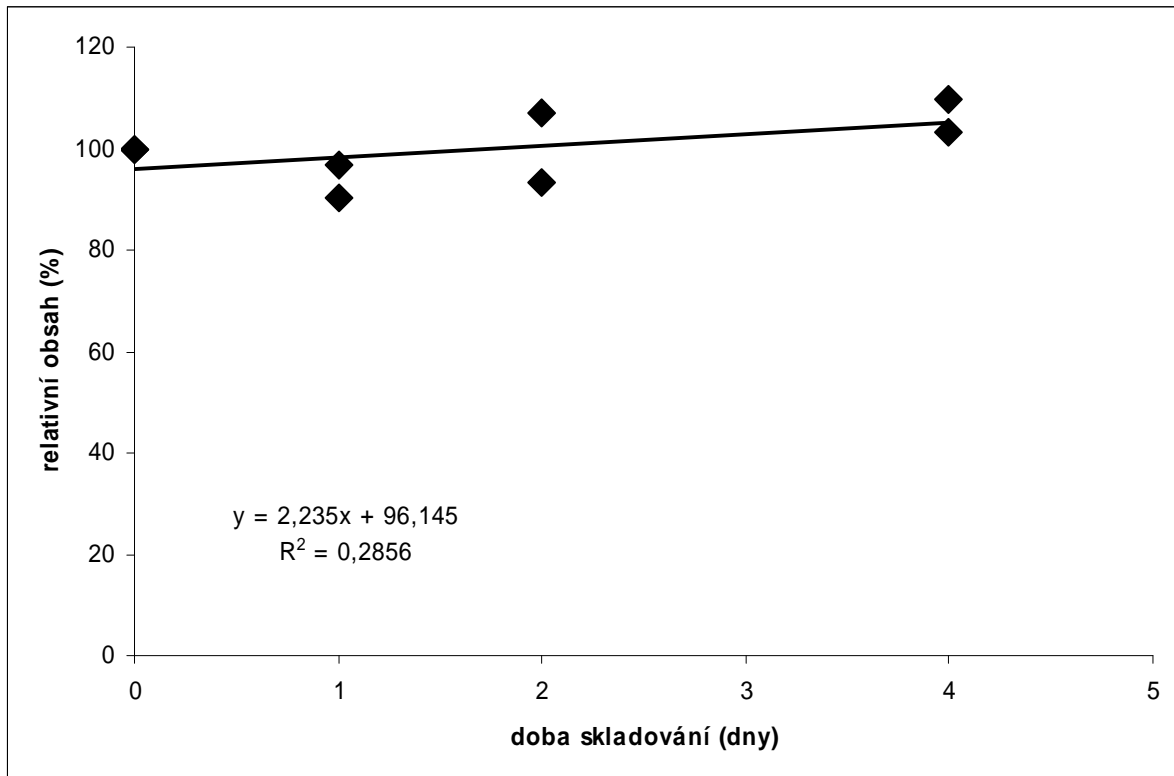
Doba skladování (dny)	0	1	2	4
Blanšírování - vzorek A				
Průměrný obsah v sušině (mg/kg)	983,1	860,7	966	908,8
Relativní obsah (%)	100	87,6	98,3	92,5
Blanšírování - vzorek B				
Průměrný obsah v sušině (mg/kg)	960,8	951,1	910,1	877,4
Relativní obsah (%)	100	99	94,7	91,3
Skladování (6 °C) – vzorek A				
Průměrný obsah v sušině (mg/kg)	874,5	845	936,8	960,2
Relativní obsah (%)	100	96,6	107,1	109,8
Skladování (6 °C) – vzorek B				
Průměrný obsah v sušině (mg/kg)	977,3	883,8	911,1	1008,9
Relativní obsah (%)	100	90,4	93,2	103,2
Vaření – vzorek A				
Průměrný obsah v sušině (mg/kg)	1246,8	998,8	1027	997,1
Relativní obsah (%)	100	80,1	82,4	80
Vaření – vzorek B				
Průměrný obsah v sušině (mg/kg)	1195,4	1006,2	1002,2	1036,9
Relativní obsah (%)	100	84,2	83,8	86,7

Graf 13: Obsah SPD při blanširování



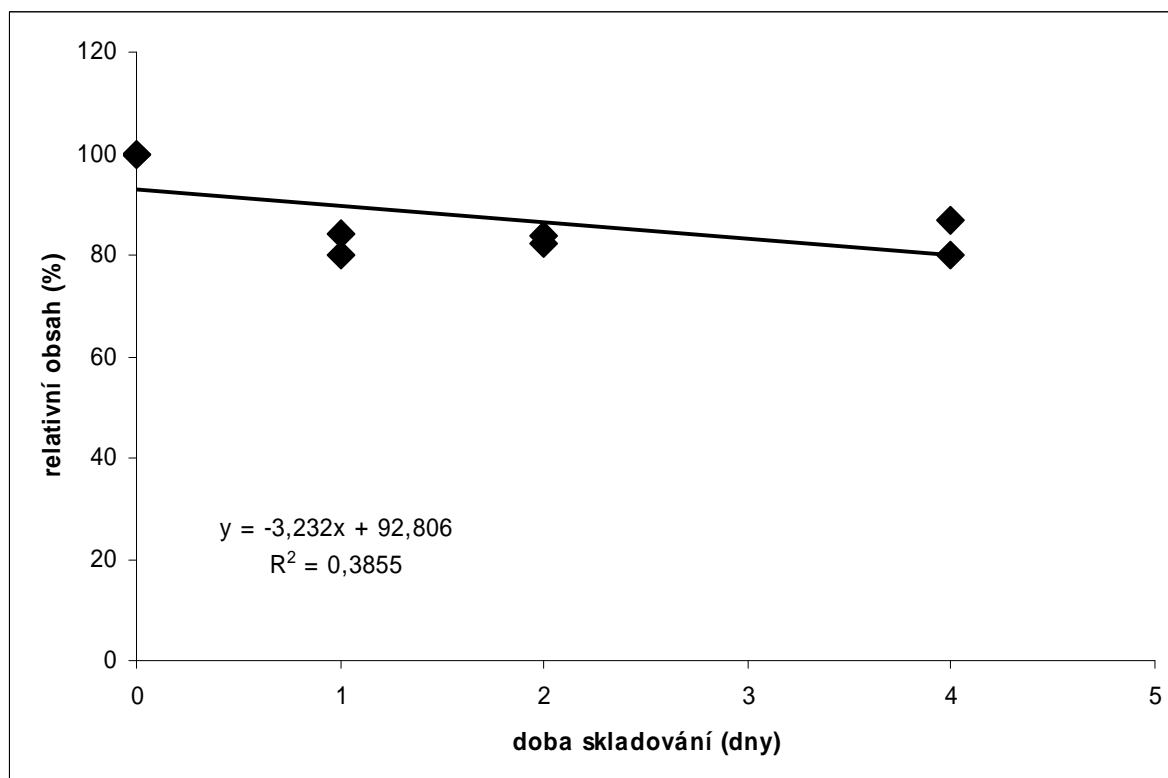
Jak vyplývá z tabulky č. 15 a grafu č. 13, v průběhu skladování docházelo k velice mírnému, ale neustálému poklesu relativní obsahu SPD. V průměru tento pokles činil 6 %.

Graf 14: Obsah SPD při skladování



Jak ukazuje tabulka č. 15 a graf č. 14, došlo během prvního dne skladování k poklesu relativního obsahu SPD o 4-10 %. Další dny ovšem došlo k nárůstu SPD, a proto můžeme říci, že obsah SPD se během skladování nijak výrazně nezměnil.

Graf 15: Obsah SPD při vaření



V tabulce č. 15 a grafu č. 15 je vidět zřetelný pokles obsahu SPD během skladování uvařených žampionů. Nejvyšší pokles byl zaznamenán první den skladování. Relativní obsah poklesl během čtyř dnů skladování na 83 %.

Tekutý podíl z vařených žampionů obsahoval 26,7 mg/l SPD.

Tabulka 16: Obsah SPD během skladování při 22 °C

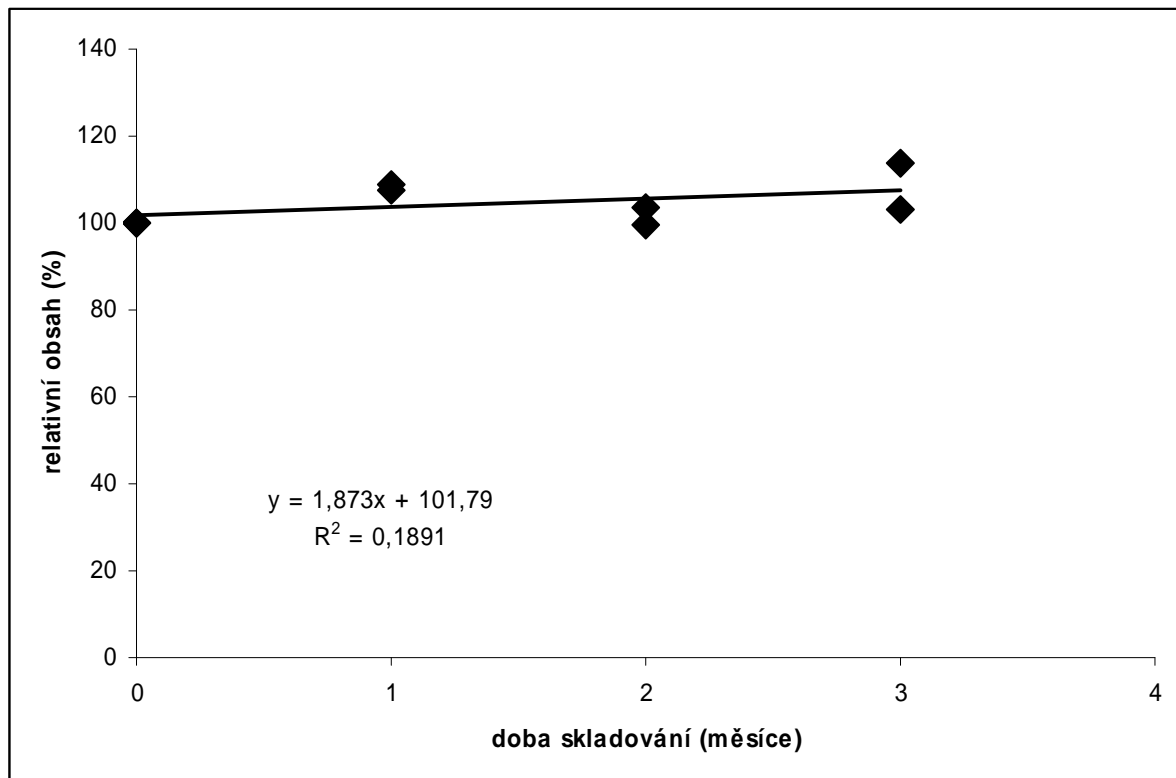
	Vzorek A		Vzorek B	
Den skladování při 22 °C	0	1	0	1
Blanšírování				
Průměrný obsah v sušině (mg/kg)	983,1	918	960,8	974,3
Relativní obsah (%)	100	93,4	100	101,4
Skladování při 22 °C				
Průměrný obsah v sušině (mg/kg)	874,5	1049,6	977,3	1075,1
Relativní obsah (%)	100	120,0	100	110,0
Vaření				
Průměrný obsah v sušině (mg/kg)	1246,8	1151,5	1195,4	1048,5
Relativní obsah (%)	100	92,4	100	87,7

Tabulka č. 16 ukazuje vzestup relativního obsahu SPD o 15 % při skladování syrových žampionů. Naopak při ponechání vařených žampionů v teplotě 22 °C došlo k poklesu SPD, přesto však oproti základnímu obsahu zůstává množství SPD zvýšené.

Tabulka 17: Obsah SPD při mražení

Doba skladování (měsíce)	0	1	2	3
Mražení - vzorek A				
Průměrný obsah v sušině (mg/kg)	874,5	953	906,4	996,6
Relativní obsah (%)	100	109	103,7	114
Mražení - vzorek B				
Průměrný obsah v sušině (mg/kg)	977,3	1051,1	974,5	1005,8
Relativní obsah (%)	100	107,6	99,7	102,9

Graf 16: Obsah SPD při mražení



Tabulka č. 17 a graf č. 16 ukazují nepatrné zvyšování obsahu SPD během třech měsíců mražení. Relativní nárůst činí 6 %.

4.5.6 Obsah sperminu

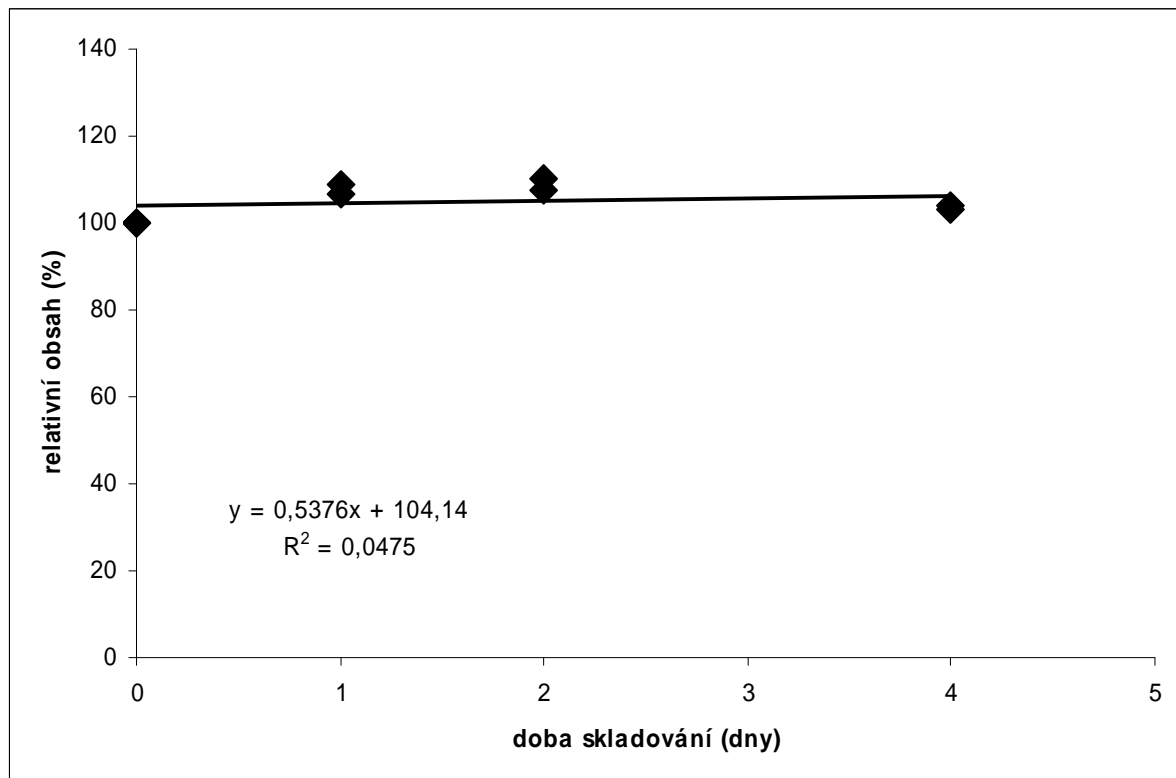
Základní obsah SPM byl měřen ihned po úpravě vzorků. Následně byl sledován obsah u syrových, vařených a blanširovaných žampionů, a to v dny 0, 1, 2 a 4. Z každého pokusu byly ponechány vzorky také jeden den při teplotě 22 °C. Další analýza se týkala mražených žampionů. Měření proběhlo po 1, 2 a 3 měsících.

V tabulce č. 18 najdeme data týkající se skladování při 6 °C, vaření a blanširování. Graficky jsou tyto hodnoty zobrazeny v grafech č. 17, č. 18 a č. 19. Tabulka č. 19 ukazuje údaje po skladování při pokojové teplotě 22 °C. Výsledky z mražených žampionů nalezneme v tabulce č. 20 a grafu č. 20.

Tabulka 18: Obsah SPM při kuchyňských úpravách

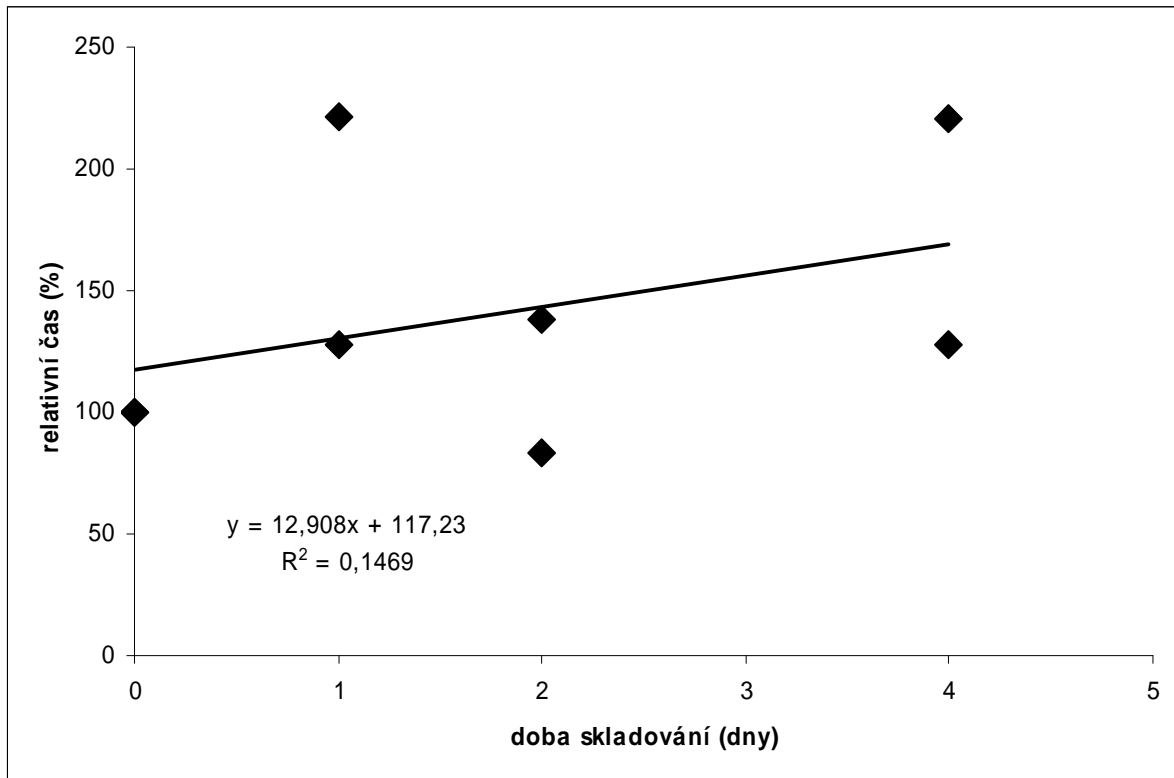
Doba skladování (dny)	0	1	2	4
Blanšírování - vzorek A				
Průměrný obsah v sušině (mg/kg)	100,5	107,1	111	104,6
Relativní obsah (%)	100	106,6	110,4	104,1
Blanšírování - vzorek B				
Průměrný obsah v sušině (mg/kg)	100,9	109,8	108,4	104,1
Relativní obsah (%)	100	108,9	107,5	103,2
Skladování (6 °C) – vzorek A				
Průměrný obsah v sušině (mg/kg)	30,9	68,3	42,7	68
Relativní obsah (%)	100	221,5	138,4	220,4
Skladování (6 °C) – vzorek B				
Průměrný obsah v sušině (mg/kg)	59,4	75,9	49,4	75,7
Relativní obsah (%)	100	127,7	83,2	127,4
Vaření – vzorek A				
Průměrný obsah v sušině (mg/kg)	101,9	87,5	86,6	88,5
Relativní obsah (%)	100	85,9	85,0	86,9
Vaření – vzorek B				
Průměrný obsah v sušině (mg/kg)	94,7	84,3	82,3	84,9
Relativní obsah (%)	100	89,1	86,9	89,7

Graf 17: Obsah SPM při blanšírování



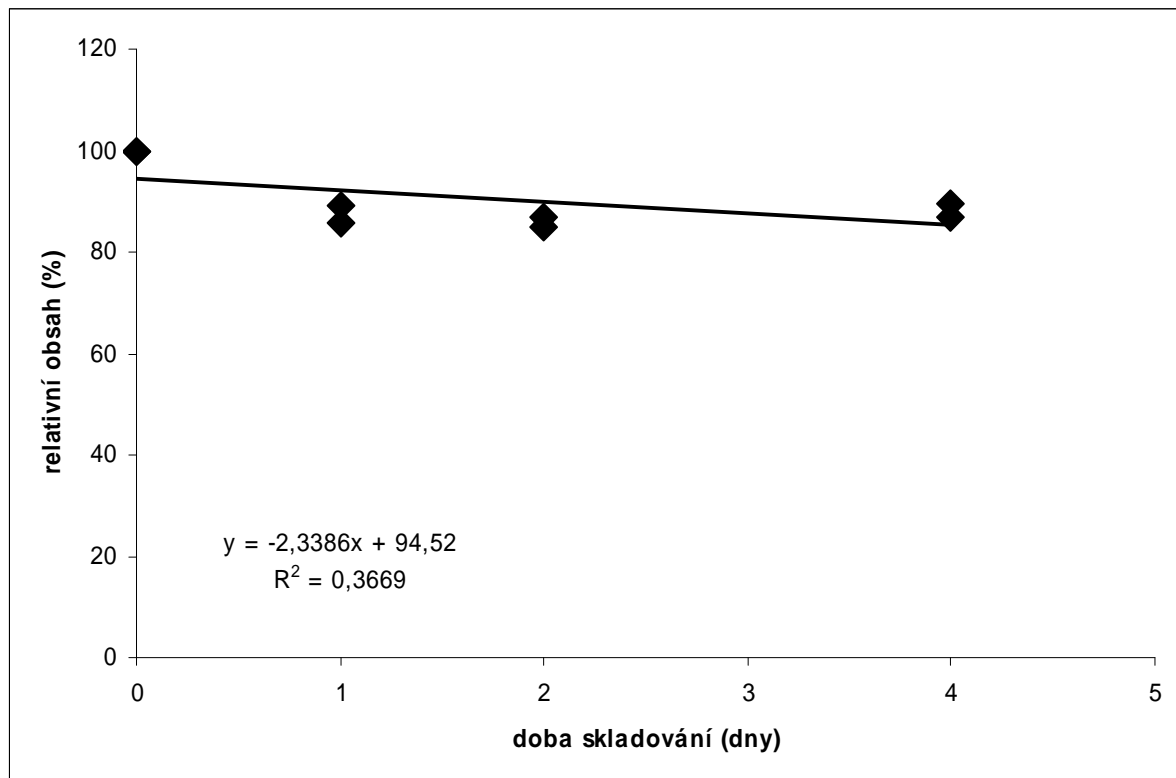
Jak je vidět z tabulky č. 18 a grafu č. 17 došlo během čtyř dnů skladování blanširovaných žampionů k nepatrnému nárůstu SPM. Relativní obsah se zvedl o 7 %.

Graf 18: Obsah SPM při skladování



V tabulce č. 18 a grafu č. 18 je vidět velké kolísání hodnot v průběhu skladování syrových žampionů. Přesto můžeme říci, že první a čtvrtý den došlo k výraznému zvýšení obsahu SPM a druhý den naopak poklesu těchto obsahů. I proto se průměrný relativní obsah během čtyř dnů zvedl o 40 %.

Graf 19: Obsah SPM při vaření



Tabulka č. 18 a graf č. 19 ukazují pokles obsahu SPM během prvních dvou dnů, čtvrtý den došlo opět k nepatrnému zvýšení. Přesto průměrný relativní obsah během tohoto skladování vařených žampionů klesl o 13 %.

Obsah SPM v tekutém podílu z vařených žampionů byl 2,8 mg/l.

Tabulka 19: Obsah SPM během skladování při 22 °C

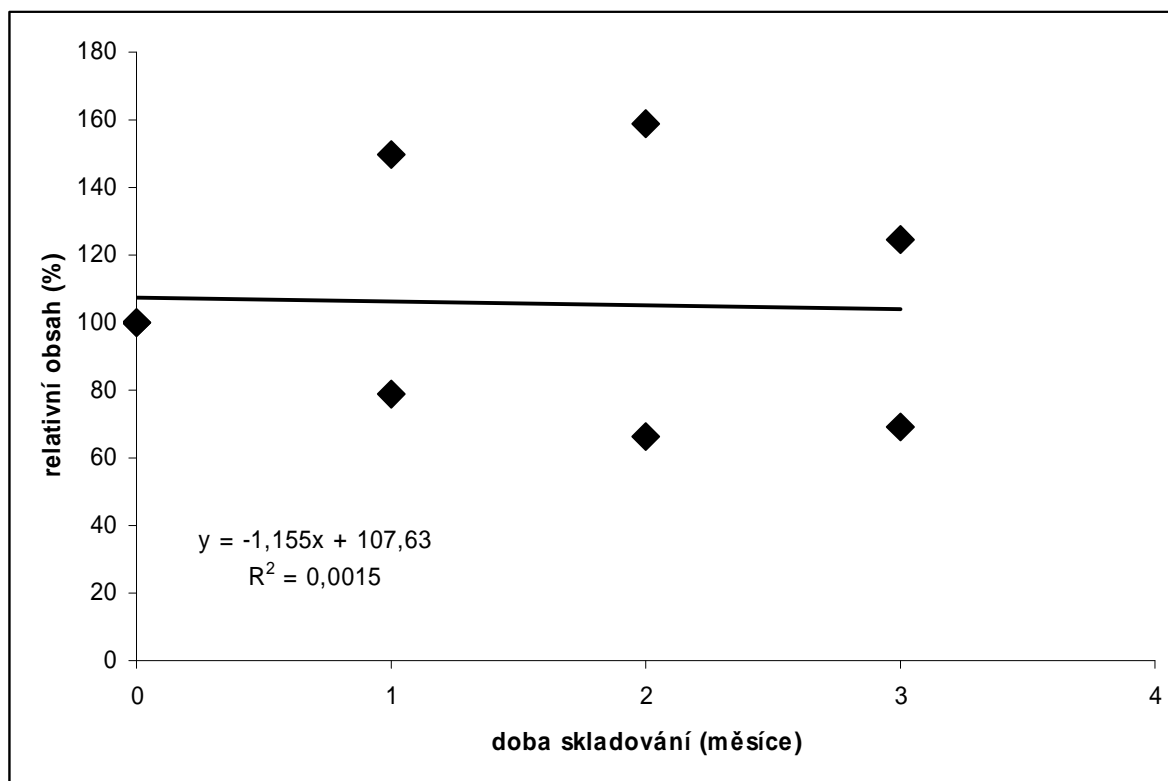
	Vzorek A		Vzorek B	
Den skladování při 22 °C	0	1	0	1
Blanšírování				
Průměrný obsah v sušině (mg/kg)	100,5	97,8	101,6	100
Relativní obsah (%)	100	97,4	100	99,5
Skladování při 22 °C				
Průměrný obsah v sušině (mg/kg)	30,9	89,6	59,4	88,9
Relativní obsah (%)	100	290,6	100	149,7
Vaření				
Průměrný obsah v sušině (mg/kg)	101,9	90,4	94,7	79,4
Relativní obsah (%)	100	88,7	100	83,9

Tabulka č. 19 ukazuje, že při skladování blanšírovaných žampionů v teplotě 22 °C nedošlo k žádné změně v obsahu SPM. Oproti tomu při skladování syrových žampionů se relativní obsah SPM zvedl velmi výrazně o 98 %. U vařených žampionů naopak došlo k poklesu SPM o 14 %.

Tabulka 20: Obsah SPM při mražení

Doba skladování (měsíce)	0	1	2	3
Mražení - vzorek A				
Průměrný obsah v sušině (mg/kg)	30,9	46,1	49,1	38,4
Relativní obsah (%)	100	149,6	159,1	124,3
Mražení - vzorek B				
Průměrný obsah v sušině (mg/kg)	59,4	46,9	39,3	41,0
Relativní obsah (%)	100	78,9	66,2	69,0

Graf 20: Obsah SPM při mražení



Graf č. 20 ukazuje velké kolísání relativního obsahu SPM během mražení. Při pohledu do tabulky č. 20 však zjistíme, že obsah SPM v sušině se nijak výrazně nemění. Kolísání relativního obsahu je způsobeno rozdílnými počátečními hodnotami obsahu SPM. Průměrný relativní obsah za tři měsíce klesl pouze o 4 %.

4.5.7 Změna obsahu aminů po uvaření a blanšírování žampionů

Tabulka č. 21 zaznamenává počáteční hodnoty aminů zjištěné v čerstvých žampionech a změny v obsahu aminů ihned po provedení tepelných kuchyňských úprav vaření a blanšírování.

Tabulka 21: Změny obsahu aminů po tepelných úpravách (mg/kg v sušině)

	Počáteční obsah	Vaření	Blanšírování
Tryptamin	LOQ	LOQ	LOQ
2-fenylethylamin	7,9	7,5	6,8
Putrescin	22,1	19,5	17,8
Kadaverin	LOQ	LOQ	LOQ
Histamin	LOQ	5,2	LOQ
Tyramin	55,2	29,2	87
Spermidin	925,9	1221,1	972
Spermin	45,1	98,3	100,7

TRM a CAD byly při všech měřeních pod hranicí stanovitelnosti (LOQ). HIM byl objeven pouze po uvaření žampionů.

Obsah PEA po uvaření klesl o 6 % a po blanšírování o 14 % svého původního obsahu. I přes následující nárůst obsahu během skladování se PEA na původní hodnoty nevrátil. Také u PUT můžeme sledovat pokles obsahu po vaření o 12 % a o 20 % po blanšírování.

Největší kolísání je viditelné u TYM. Po uvaření žampionů se jeho obsah oproti počátečnímu obsahu snížil o 47 %. Naopak po blanšírování obsah TYM stoupl o 58 % a následující dny skladování docházelo k dalšímu výraznému vzestupu obsahu TYM.

Obsah SPD se po uvaření zvýšil o 32 % a i přes pokles v následujících dnech skladování zůstal obsah SPD vyšší o 15 % oproti počátečnímu obsahu. Po blanšírování došlo ke zvýšení obsahu jen o 5 %.

Velký nárůst po provedení kuchyňských úprav lze vysledovat u SPM. Po uvaření žampionů se obsah SPM zvedl o 118 % oproti počátečnímu obsahu. Během následujícího skladování však docházelo k postupnému snižování SPM, proto byl po čtyřech dnech obsah SPM už jen o 97 % vyšší než na počátku. Po blanšírování se obsah SPM zvýšil o 123 % a během následujících dnů skladování stoupl ještě o dalších 11 %.

5 Závěr

Cílem této diplomové práce bylo stanovení obsahu osmi BA a PA, přesněji putrescinu (PUT), spermidinu (SPD), sperminu (SPM), histaminu (HIM), kadaverinu (CAD), 2-fenylethylaminu (PEA), tyraminu (TYM) a tryptaminu (TRM) v žampionu zahradním. Práce byla zaměřena na vliv skladovacích podmínek, mražení a kuchyňských úprav používaných běžným spotřebitelem jedlých hub.

Dle dostupných údajů ze studií dosahují nejvyšších obsahů v houbách běžně aminy SPD a PUT. Oproti tomu se aminy CAD, TYM, TRM a HIM nevyskytují v houbách vůbec nebo na velice nízkých úrovních. Více údajů k obsahu BA a PA v houbách se v literatuře zatím nevyskytuje.

Při této práci se zkoumaly žampiony zakoupené u firmy zabývající se komerčním pěstováním hub. Vzorky byly analyzovány po skladování a úpravách jako je mražení, vaření a blanšírování.

Nejvyšší základní hodnoty byly naměřeny u SPD, v průměru 925 mg/kg v sušině. Základní obsah TYM byl 55 mg/kg v sušině, obsah SPM 45 mg/kg v sušině. Zhruba poloviční obsah byl změřen u PUT – 22 mg/kg v sušině. PEA se objevil pouze v hodnotách 8 mg/kg v sušině. Aminy TRM a CAD se během měření neobjevily vůbec, HIM byl nalezen až po uvaření vzorků a skladování vzorků při teplotě 22 °C ve výši 5 mg/kg v sušině.

Mražené vzorky byly skladovány v PE obalech při teplotě -18 ± 1 °C po dobu tří měsíců. Během této doby se zvýšil obsah TYM a SPD o 6 %. Obsah SPM za tuto dobu naopak poklesl o 4 % a u PUT dokonce o 12 %. Obsah PEA, který byl ihned po odebrání vzorků 8 mg/kg v sušině, klesl po zmražení žampionů pod mez stanovitelnosti.

Vzorky žampionů skladované při teplotě 6 °C byly analyzovány v den odběru a poté 1., 2. a 4. den skladování. Největší pokles byl viditelný u PEA o 15 % a u PUT jen o 8 %. Obsah TYM a SPD se při skladování nezměnil. Výrazné kolísání a zvýšení obsahu bylo pozorováno u SPM a celkový nárůst obsahu SPM činil 40 %.

Blanšírované vzorky byly skladovány při teplotě 6 °C a analyzovány v den 0, 1, 2 a 4. U aminů PEA a PUT došlo ihned po blanšírování k poklesu obsahu aminů ve vzorcích. Následující dny však během skladování došlo k opětovnému zvýšení obsahu aminů, ale ani jeden již nedosáhl na původní zjištěné hodnoty. Obsah SPD naopak nejprve nepatrně stoupl, ale během skladování začal opět klesat až na základní obsah. Výrazné zvýšení obsahu bylo pozorováno ihned po blanšírování u TYM – základní obsah se zvýšil o 58 % a během

skladování nadále stoupal, celkový nárůst tak činil po čtyřech dnech 73 % počáteční hodnoty. Nejvyšší nárůst byl zaznamenán po blanšírování u SPM – zvýšení činilo 123 % oproti základnímu obsahu. Během skladování se obsah nadále zvyšoval, až nakonec dosáhl zvýšení o 134 % počáteční hodnoty.

Vzorky, které byly uvařené, se nadále skladovaly čtyři dny při teplotě 6 °C. Měření proběhlo v den 0, 1, 2 a 4. Po uvaření se ve vzorcích žampionů objevil HIM (v koncentraci 5 mg/kg), který se v syrovém stavu pohyboval pod mezí stanovitelnosti. Po uvaření došlo u aminů PEA, PUT a TYM ke snížení základního obsahu. PEA klesl o 6 % a PUT o 12 %, jejich obsah se během dalších čtyř dnů skladování již dále neměnil. Obsah TYM ihned po uvaření klesl o 47 %, ale v následujících dnech došlo k nárůstu obsahu TYM, a proto je odchylka od počátečního stavu po čtyřech dnech skladování pouze -37 %. U SPD jsme naopak sledovali nárůst obsahu po uvaření o 32 %. V následujících dnech obsah klesal, a tak byl konečný obsah zvýšen oproti základním hodnotám pouze o 15 %. Nejvýraznější změna po uvaření se projevila opět u SPM. Obsah se zvýšil o 117 % a další čtyři dny skladování (stejně jako SPD) klesal. Konečná hodnota obsahu byla proto nakonec vyšší o 97 %.

Vzorky z každého pokusu byly také skladovány jeden den při teplotě 22 °C. Obsahy BA a PA během skladování při pokojové teplotě kolísaly. Nedá se říci, že by docházelo pouze k poklesu nebo ke zvýšení obsahu u některého z pokusů. Nejvýraznější změna obsahu se projevila při skladování syrových žampionů – SPM stoupl o 98 %.

Domnívám se, že zjištěné údaje v této diplomové práci budou přínosem a rozšíří informace týkající se této problematiky. Tato práce také ukazuje možnost dalšího výzkumu na toto téma.

6 Použitá literatura

- 1) ALARCÓN J., ÁGUILA S., ARANCIBIA-AVILA P., FUENTES O., ZAMORANO-PONCE E., HERNANDEZ M. (2003): Production and purification of statins from *Pleurotus ostreatus* (Basidiomycetes) strains, *Zeitschrift für Naturforschung*, 58c, 62-64 (2003).
- 2) BOLYGO E., COOPER P. A., JESSOP K. M., MOFFATT F. (2000): Determination of histamine in tomatoes by capillary electrophoresis, *Journal of AOAC International*, 83(1), 89–94.
- 3) BELUHAN S., RANOGAJEC A. (2010): Chemical composition and non-volatile components of Croatian wild edible mushrooms, *Food Chemistry* 124 (2011) 1076–1082.
- 4) BISEN P.S., BAGHEL R.K., SANODIYA B.S., THAKUR G.S., PRASAD G.B.K.S. (2010): *Lentinus edodes*: A Macrofungus with Pharmacological Activities, *Current Medicinal Chemistry* 2010;17(22):2419-30
- 5) BODMER S., IMARK C., KNEUBÜHL M. (1999): Biogenic amines in foods: Histamine and food processing, *Inflammation Research*, 48 (1999) 296-300.
- 6) ČSN 46 3195: Jedlé houby a výrobky z hub (1997), *Český normalizační institut*.
- 7) ČSN 46 3197: Pěstované žampiony (2002), *Český normalizační institut*.
- 8) DADÁKOVÁ E., KRÍŽEK M., PELIKÁNOVÁ T. (2009): Determination of biogenic amines in foods using ultra-performance liquid chromatography (UPLC), *Food Chemistry* 116 (2009) 365–370.
- 9) DADÁKOVÁ E., PELIKÁNOVÁ T., KALÁČ P. (2009): Content of biogenic amines and polyamines in some species of European wild-growing edible mushrooms, *European Food Research Technoogyl* (2009) 230:163–171.

- 10) FAVARO G., PASTORE P., SACCANI G., CAVALLI S. (2007): Determination of biogenic amines in fresh and processed meat by ion chromatography and integrated pulsed amperometric detection on Au electrode, *Food Chemistry*, 105(4), 1652-1658.
- 11) FERREIRA I.C.F.R., VAZ J.A., VASCONCELOS M.H., MARTINS A. (2010): Compounds from Wild Mushrooms with Antitumor Potential, *Anti-cancer Agents in Medicinal Chemistry* (2010), 10(5):424-436.
- 12) FIECHTER G., SIVEC G., MAYER H.K. (2012): Application of UHPLC for the simultaneous analysis of free amino acids and biogenic amines in ripened acid-curd cheeses, *Journal of Chromatography B*, 927 (2013) 191– 200.
- 13) HAGARA L. (1995): Atlas hub, *Martin: Neografia* 461 s., 80-85186-84-5.
- 14) JAWORSKA G., BERNAS E., MICKOWSKA B. (2010): Effect of production process on the amino acid content of frozen and canned *Pleurotus ostreatus* mushrooms, *Food Chemistry* 125 (2011) 936–943.
- 15) KALAČ P. (2009): Recent advances in the research on biological roles of dietary, polyamines in man, *Journal of Applied Biomedicine* 7: 65–74, 2009,ISSN 1214-0287.
- 16) KALAČ P., HLA VATÁ V., KRÍŽEK M. (1996): Concentrations of five biogenic amines in Czech beers and factors affecting their formation, *Food Chemistry*, 209-214, 1997.
- 17) KALAČ P., KRAUSOVÁ P. (2005): A review of dietary polyamines: Formation, implications for growth and health and occurrence in foods, *Food Chemistry* 90 (2005) 219–230.
- 18) KALAČ P., KRÍŽEK M. (1996): Formation of biogenic amines in four edible mushroom species stored under different conditions, *Food Chemistry*, Vol. 58, No. 3, pp. 233-236, 1997.

- 19) KALAČ P., ŠPIČKA J., KRÍŽEK M., STEIDLOVÁ Š., PELIKÁNOVÁ T. (1999): Concentrations of seven biogenic amines in sauerkraut, *Food Chemistry* 67 (1999) 275-280.
- 20) KOVACS A., SIMON-SARKADI L., GANZLER K. (1999): Determination of biogenic amines by capillary electrophoresis, *Journal of Chromatography A*, 836(2), 305–313.
- 21) KOVÁŘ L.(1999):Brevíř o houbách, *Nakladatelství Olympia a.s.* 160 s., 27-043-99.
- 22) KRÍŽEK M., PELIKÁNOVÁ T. (1998): Determination of seven biogenic amines in foods by micellar electrokinetic capillary chromatography, *Journal of Chromatography A*, 815(2), 243–250.
- 23) LADERO V., CALLES M., FERNÁNDEZ M., ALVAREZ M. A.: Toxicological Effects of Dietary Biogenic Amines, *Current Nutrition and Food Science* 6, 145-156, 2010.
- 24) LAPA-GUIMARAES J., PICKOVA J. (2004): New solvent systems for thin-layer chromatographic determination of nine biogenic amines in fish and squid, *Journal of chromatography A*, 1045(1-2),223-232.
- 25) LIU M., LI Y. G., CHOU G. X., CHENG X. M., ZHANG M., WANG Z. T. (2007): Extraction and ultra-performance liquid chromatography of hydrophilic an lipophilic bioactive components in a Chinese herb Radix Salviae Miltiorrhizae, *Journal of Chromatography A*, 1157(1–2), 51–55.
- 26) McCABE-SELLERS B.J., STAGGS C.G., BOGLE M.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* 19 (2006) S58–S65.
- 27) MOINARD CH., CYNOBER L., BANDT J-P. (2005): Polyamines: metabolism and implications in human diseases, *Clinical Nutrition* (2005) 24, 184–197.

- 28) MORET S., CONTE L.S. (1996): High-performance liquid chromatographic evaluation of biogenic in foods – An analysis of different methods of sample preparation in relation to food characteristics, *Journal of Chromatography A*, 729(1-2),363-369.
- 29) NISHIBORI N., FUJIHARA S., AKATUKI T. (2007): Amounts of polyamines in foods in Japan and intake by Japanese, *Food Chemistry*, 100:491–497.
- 30) NISHIMURA K., SHIINA R., KASHIWAGI K., IGARASHI K. (2006): Decrease of polyamines with aging and their ingestion from food and drink, *The Journal of Biochemistry*, 139:81–90.
- 31) NOVELLA-RODRÍGUEZ S., VECIANA-NOGUES M. T., IZQUIERDO-PULIDO M., VIDAL-CAROU M. C. (2003): Distribution of biogenic amines and polyamines in cheese, *Journal of Food Science*, 68, 750-755.
- 32) OKAMOTO A., SUGI E., KOIZUMI Y., YANAGIDA F., UDAKA S. (1997): Polyamine content of ordinary foodstuffs and various fermented foods, *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*,(1997) 61:1582–1584.
- 33) ÖNAL A. (2007): A review: Current analytical methods for the determination of biogenic amines in foods, *Food Chemistry* 103 (2007) 1475-1486.
- 34) ROSSANO R., MASTRANGELO L., UNGARO N., RICCIO P. (2006): Influence of storage temperature, freezing time on histamine level in the European anchovy *Engraulis encrasicolus* (L., 1758): A study by capillary electrophoresis, *Journal of Chromatography B – Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 830(1), 161–164.
- 35) SHALABY A. R. (1996): Significance of biogenic amines to food safety and human health, *Food Research International*, 29(7), 675–690.
- 36) SILLA-SANTOS M H. (1996): Biogenic amines: their importance in foods, *International Journal of Food Microbiology* 29 (1996): 213-231.

- 37) SIMPSON A.G., ROGER A.J. (2004): The real 'kingdoms' of eukaryotes, *Current Biology* 14: R693-R496.
- 38) SMOTLACHA M., MALÝ J. (1999): Smotlachův atlas hub. *Praha: Ottovo nakladatelství s.r.o.*, 271 s.
- 39) SVOBODA L., ZIMMERMANNOVÁ K., KALÁČ P. (1999): Concentrations of mercury, cadmium, lead and copper in fruiting bodies of edible mushrooms in an emission area of a copper smelter and a mercury smelter, *The Science of the Total Environment* 246 (2000) 61-67.
- 40) YAMAMOTO S., ITANO H., KATAOKA H., MAKITA M. (1982): Gas-liquid chromatographic method for analysis of di- and polyamines in foods, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 30:435-439.
- 41) YEN G-C. (1992): Effects of heat treatment and storage temperature on the biogenic amine contents of straw mushroom (*Volvariella volvacea*), *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 58:59-61.
- 42) ZHANG L. Y., TANG X. C., SUN M. X. (2005): Simultaneous determination of histamine and polyamines by capillary zone electrophoresis with 4-fluor-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole derivatization and fluorescence detection, *Journal of Chromatography B – Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 820(2), 211-219.
- 43) www.21stoleti.cz/blog/2012/01/13/kde-se-berou-zampiony/ - How It's Made – Mushrooms (Discovery/ Science Channel's)
- 44) www.aftol.org