

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH
BUDĚJOVICÍCH
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA

Studijní program: N4106 Zemědělská specializace

Studijní obor: Biologie a ochrana zájmových organismů

Katedra: Katedra biologických disciplín

Vedoucí katedry: doc. RNDr. Ing. Josef Rajchard, Ph.D.

DIPLOMOVÁ PRÁCE

**Vliv kuchyňských úprav na obsah biogenních aminů
a polyaminů ve vybraných jedlých houbách**

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

Autor diplomové práce: Bc. Pavla Wolfová

České Budějovice, 2018

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE
(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Pavla WOLFOVÁ**
Osobní číslo: **Z16339**
Studijní program: **N4106 Zemědělská specializace**
Studijní obor: **Biologie a ochrana zájmových organismů**
Název tématu: **Vliv kuchyňských úprav na obsah biogenních aminů a polyaminu ve vybraných jedlých houbách.**
Zadávací katedra: **Katedra aplikované chemie**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

Biogenní aminy (BA) a polyaminy (PA) jsou skupinou organických sloučenin, které se přirozeně vyskytují v buňkách všech živých organismů. V nízkých koncentracích jsou běžnou složkou většiny potravin. Aminy patří mezi biologicky aktivní sloučeniny. BA vznikají v materiálu dekarboxylací příslušných aminokyselin hlavně během skladování a mikrobiální cestou. Polyaminy (PA) jsou sloučeniny, které mají ve srovnání s ostatními aminy zvláštní účinky. Účastní se procesů probíhajících při růstu a dělení buněk. Jejich výskyt je vázán hlavně na metabolicky aktivní a rychle rostoucí tkáň a pletiva (mladé tkáň, střední výstelka, novotvary). Na růstu buněk se významně projevují též aminy přijímané potravou. Během skladování a tepelných úprav potravin dochází obvykle ke změnám obsahu BA a PA. Jak se ukazuje, jedlé houby mohou být v potravě významným zdrojem aminů. Navíc patří mezi potraviny s vysokým obsahem vody a velmi brzy podléhají zkáze. Zde se obsah aminů může měnit velmi výrazně. Cílem práce bude sledovat, jak se mění obsah BA a PA při běžných způsobech kuchyňských úprav u vybraných druhů jedlých hub rostoucích volně České republice.

Zadání:

- 1) Vypracujte literární rešerši věnující se změnám obsahu BA a PA při zpracování potravin a zemědělských produktů.
- 2) Navrhněte schéma experimentů zabývajících se běžnými druhy kuchyňských úprav jedlých hub. Provedte navržené experimenty u vybraných druhů jedlých hub, vzorky zpracujte pro účely analýzy.
- 3) U získaných vzorků stanovte obsah BA a PA metodou HPLC.
- 4) Vyhodnoťte získané výsledky.

Rozsah grafických prací: podle potřeby výsledků

Rozsah pracovní zprávy: 50 - 60 stran

Forma zpracování diplomové práce: tištěná

Seznam odborné literatury:

1. Dadakova, E., Krizek, M., Pelikanova, T.(2009): Determination of biogenic amines in foods using ultra-performance liquid chromatography. Food Chem., 116, (1), 365-370.
2. Dadáková, E., Pelikánová, T., Kalač, K. (2009): Content of biogenic amines and polyamines in some species of European wild growing mushrooms. European Food Research and Technology. 230, 163-171.
3. Moinard C., Cynober L., de Brandt J.-P.(2005): Polyamines: Metabolism and implications in human diseases. Clinical Nutrition. 24, 184-197.
4. Halász, A., Barath, Á., Simon-Sarkadi, L., Holzapfel, W. (1994): Biogenic amines and their production by microorganisms in food. Trends in Food Science and Technology, 5, 42-49.


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

Datum zadání diplomové práce: 21. března 2017

Termín odevzdání diplomové práce: 15. dubna 2018


prof. Ing. Milošlav Soch, CSc., dr. h. c.
děkan

JIHOČESKÁ UNIVERZITA
V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
ZEMĚLSKÁ FAKULTA
studijní oddělení
Studentská 159, 370 05 České Budějovice
B.S.


prof. Ing. Martin Křížek, CSc.
vedoucí katedry

V Českých Budějovicích dne 21. března 2017

Prohlašuji, že svoji diplomovou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím 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 elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách.

V Českých Budějovicích dne

Podpis:

Děkuji vedoucí své diplomové práce doc. Ing. Evě Dadákové, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady, připomínky, poskytnuté materiály a vstřícnost při konzultacích, vedoucí k jejímu zdárnému dokončení. Dále děkuji pracovníkům katedry chemie ZF JU, za přípravu vhodných podmínek pro moji práci.

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

SOUHRN

Cílem této diplomové práce bylo stanovení biogenních aminů (BA) a polyaminů (PA) metodou kapalinové chromatografie HPLC, konkrétně histaminu (HIM), tyraminu (TYM), 2 – fenylethylaminu (PEA), tryptaminu (TRM), sperminu (SPM), spermidinu (SPD) a putrescinu (PUT) v klouzku strakoši (*Suillus variegatus*, (Sw.) Kuntze) a suchohříbu hnědém (*Boletus badius*, Fr.). Práce byla zaměřena na vliv kuchyňských úprav metodou pasterace, mražení a následného skladování upravených hub na obsah biogenních aminů a polyaminů.

Pasterované vzorky byly analyzované ihned po úpravě v den 0 a následně po třech, šesti, devíti a dvanácti měsících po uskladnění ve tmě při teplotě 22°C. Nejvyšší koncentrace u pasterovaného klouzka strakoše byla pozorovaná u putrescinu (1080 mg/kg). Jeho obsah v průběhu pokusu společně s obsahy ostatních biogenních aminů klesal, až na obsah tyraminu, u kterého byl zjištěn mírný nárůst. Nejvyšší koncentrace u pasterovaného suchohříbu hnědého byla pozorovaná taktéž u putrescinu (768 mg/kg), jehož obsah společně s obsahy ostatních biogenních aminů klesal.

Mražené vzorky byly uskladněny při teplotě - 16°C a vzorky byly odebírány každý třetí, šestý, devátý a dvanáctý měsíc. Změny koncentrace biogenních aminů a polyaminů u mraženého vzorku klouzka strakoše byly totožné se změnami během pasterace. Změny koncentrace biogenních aminů a polyaminů u mraženého suchohříbu hnědého se od pasterovaného vzorku lišily, došlo k postupnému nárůstu obsahu tryptaminu, putrescinu, spermidinu a sperminu, zatímco hodnoty 2-fenylethylaminu a tyraminu mírně klesaly.

Výsledky sledování ukazují, že ani laický způsob konzervace volně rostoucích hub nevede k podstatnému zvýšení obsahu biogenních aminů a polyaminů v materiálu z volně rostoucích jedlých hub.

Klíčová slova: biogenní aminy, polyaminy, suchohříb hnědý, klouzek strakoš, skladování, tepelné úpravy, HPLC.

SUMMARY

The intention of this dissertation was an assessment of biogenic amines (BA) and polyamines (PA) by the usage of high-performance liquid chromatography (HPLC), in the concrete histamine (HIM), tyramine (TYM), 2-phenyl ethylamine (PEA), tryptamine (TRM), spermine (SPM), spermidine (SPD) and putrescine (PUT) in Velvet Bolete (*Suillus variegatus*, (Sw.) Kuntze) and Bay Bolete (*Boletus badius*, Fr.). The dissertation was focused on the influence of kitchen treatments by the method of pasteurization, freezing and subsequent storage of treated mushrooms on the content of biogenic amines and polyamines.

Pasteurized samples were analysed immediately after adjustment on day 0 and then after three, six, nine and twelve months after storage in the dark place at 22 °C. The highest concentration in the pasteurized Velvet Bolete sample was observed in putrescine (1079 mg/kg). In the process of the experiment, this one and other biogenic amines levels decreased, except for tyramine, which showed a slight increase. The highest concentration in pasteurized Bay Bolete sample was also observed in putrescine (768 mg/kg) which, together with other biogenic amines levels, decreased.

The frozen samples were stored at -16 °C and samples were taken every third, sixth, ninth and doventh month. Changes in the concentration of biogenic amines and polyamines in the frozen sample of Velvet Bolete were identical with changes during pasteurization. Changes in the concentration of biogenic amines and polyamines in frozen sample of Bay Bolete were different from the pasteurized sample. Tryptamine, putrescine, spermidine, and spermine levels increased steadily, whereas the 2-phenylethylamine and tyramine levels decreased slightly.

The monitoring results show that not even a unprofessional method of preserving wild mushrooms will lead to a substantial increase in the levels of biogenic amines and polyamines in the material of the wildly growing edible mushrooms.

Key words: biogenic amines, polyamines, Velvet Bolete, Bay Bolete, storage, heat treatment, HPLC.

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AdoMetDC	S-adenosylmethionindekarboxyláza
AGM	agmatin
AMK	aminokyseliny
BA	biogenní aminy
CAD	kadaverin
CNS	centrální nervová soustava
DAO	diaminooxidáza
DNA	deoxyribonukleová kyselina
HEP	vnitřní standard aminů
HIM	histamin
HIT	histaminová intolerance
IMAO	ireverzibilní inhibitory monoaminooxidázy typu A
L - DOPA	levodopa
MAO - B	monoaminooxidáza B
MAO	monoaminooxidáza
MAOI	inhibitory monoaminooxidázy
mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina
ODC	ornitindekarboxyláza
PA	polyaminy
PEA	2-fenylethylamin
PUT	putrescin

RIMA	reverzibilní inhibitory monoaminoxidázy typu A
RNA	ribonukleová kyselina
SER	serotonin
SPD	spermidin
SPM	spermin
TRM	tryptamin
tRNA	transferová ribonukleová kyselina
TYM	tyramin
UPLC	ultra výkonná kapalinová chromatografie

Obsah

1	Úvod	12
2	Teoretická část.....	13
2.1	Biogenní aminy	13
2.1.1	Biologické účinky biogenních aminů.....	15
2.1.2	Potraviny s obsahem biogenních aminů	17
2.2	Zpracování potravin s obsahem BA.....	22
2.2.1	Definice biotechnologických procesů	23
2.3	Mikroorganismy produkující BA.....	23
2.4	Polyaminy	24
2.4.1	Biologické účinky polyaminů	25
2.4.2	Potraviny s obsahem PA.....	26
2.5	BA v houbách.....	26
2.6	Toxikologické účinky BA a PA	27
2.6.1	Toxicita histaminu	27
2.6.2	Histaminová intolerance (HIT).....	28
2.6.3	Toxicita tyraminu	28
2.6.4	Účast BA na nádorovém bujení.....	29
2.7	Odstranění BA z organismu	30
2.8	Houby.....	31
2.8.1	Jedlé houby.....	31
2.8.2	Složení jedlých hub	31
3	CÍL PRÁCE.....	34
4	Experimentální část	35
4.1	Použité laboratorní chemikálie, pomůcky, přístroje a zařízení	35
4.1.1	Chemikálie.....	35

4.1.2	Přístroje a zařízení	36
4.2	Odběr vzorků.....	36
4.3	Analýza BA a PA metodou HPLC.....	38
4.3.1	Extrakce – tuhé vzorky	38
4.3.2	Analytická koncovka	39
4.4	Zpracování dat.....	41
4.4.1	Statistické zpracování dat	41
5	Výsledky a diskuze.....	42
5.1	Vliv pasterace a skladování na obsah BA	42
5.2	Vliv mražení a skladování na obsah BA	49
6	Závěr.....	55
7	Seznam použité literatury	57
8	Seznam grafů	60
9	Seznam tabulek.....	60

1 Úvod

Biogenní aminy (BA) a polyaminy (PA) jsou látky, které se v lidském těle účastní velkého množství důležitých metabolických procesů. Pro lidské tělo jsou nepostradatelné, ale ve zvýšeném množství mohou mít pro lidský organismus toxické účinky. Vznikají často v potravinách dekarboxylací aminokyselin, což lze v budoucnu využít ke sledování čerstvosti potravin, nekvalitních potravin nebo špatných výrobních postupů (Ladero et al., 2010).

Aminy se běžně vyskytují v mase a masných výrobcích, alkoholu, sýrech, rybách, fermentovaných výrobcích, ale i v ovoci a zelenině. Množství výzkumů zaměřených na obsah BA a PA v potravinách za poslední roky stoupá, ale stále chybí informace o výskytu aminů v jedlých houbách. Z dostupných informací vyplývá, že nejvyššího obsahu dosahuje putrescin (PUT) a spermidin (SPD). Naopak na nízkých úrovních nebo pod hranicí stanovitelnosti se vyskytují histamin (HIM), tyramin (TYM), tryptamin (TRM) a kadaverin (CAD) (Kalač and Křížek, 1996, Dadáková et al., 2009).

Cílem této diplomové práce bylo stanovení biogenních aminů (BA) a polyaminů (PA) metodou kapalinové chromatografie HPLC s využitím techniky UPLC, konkrétně histaminu (HIM), tyraminu (TYM), 2 – fenylethylaminu (PEA), tryptaminu (TRM), sperminu (SPM), spermidinu (SPD) a putrescinu (PUT) v klouzku strakoši a suchohříbu hnědém. Práce byla zaměřena na vliv skladovacích podmínek a kuchyňských úprav jako pasterace a mražení používaných běžným spotřebitelem.

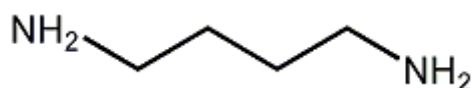
2 Teoretická část

2.1 Biogenní aminy

Biogenní aminy (BA) jsou nízkomolekulární organické báze s biologickou aktivitou. Podle chemické struktury se BA člení na heterocyklické (tryptamin, histamin), alifatické (kadaverin, putrescin), aromatické (2-fenylethylamin, tyramin) a polyaminy (spermin, spermidin, agmatin). BA jsou produkty běžné metabolické aktivity rostlin, živočichů a mikroorganismů. Vznikají z aminokyselin (AMK) působením dekarboxyláz, kdy dojde k odštěpení oxidu uhličitého a vznikne bazický amin, který je následně pojmenován v závislosti na názvu AMK, která vedla k jeho vzniku: z tryptofanu vzniká dekarboxylací tryptamin, z histaminu histidin atd. V potravinách vznikají nejčastěji dekarboxylací AMK působením bakteriálních dekarboxylačních enzymů. Pro vznik BA v potravinách je důležité splnění tří hlavních podmínek: přítomnost AMK v potravine, přítomnost mikroorganismů s dekarboxylázovou aktivitou a vhodné podmínky pro množení a růst organismů (Smělá et al., 2004, Velíšek, 2002, Ladero et al., 2010).

Tradiční skupina výživových BA se v průběhu 90. let rozdělila na dvě podskupiny a to na základě biologických rolí a odlišného způsobu vzniku. BA jsou tvořeny převážně bakteriální dekarboxylací volných AMK v nevhodných podmínkách během zpracování a skladování biologického materiálu. Polyaminy (PA) tvořící druhou skupinu jsou především přírodní složky živých organismů s pozitivními i negativními účinky na lidský organismus za různých podmínek (Dadáková et al., 2009).

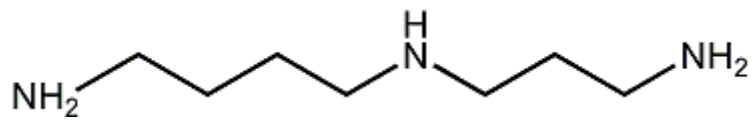
Obrázek 1: Strukturní vzorce BA a PA



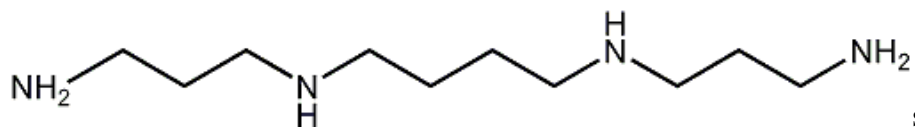
putrescin



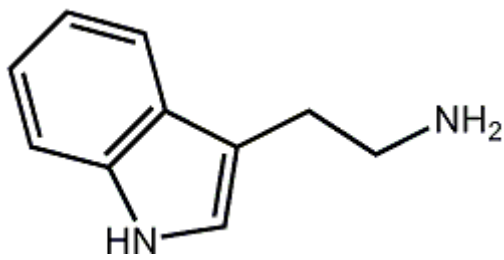
kadaverin



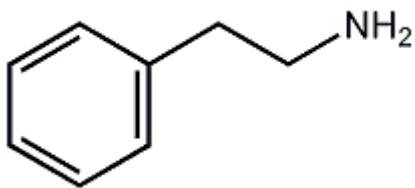
spermidin



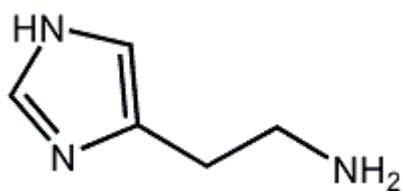
spermin



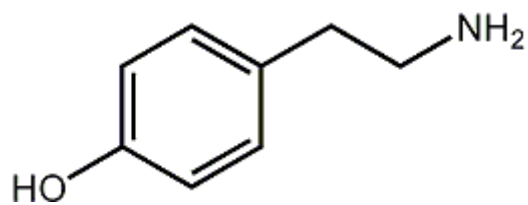
tryptamin



fenylethylamin



histamin



tyramin

2.1.1 Biologické účinky biogenních aminů

Biogenní aminy jsou pro tělo nepostradatelné, jelikož se podílí na řadě metabolických procesů a mají zásadní role v rozvoji a fyziologii eukaryotních buněk. Jsou zdrojem dusíku a prekurzorů pro syntézu hormonů, alkaloidů, nukleových kyselin a bílkovin. Při příjmu většího množství se BA stávají toxickými a působí jako látky vazoaktivní a psychoaktivní (Károvičová and Kohajdová, 2005, McCabe-Sellers et al., 2006).

Psychoaktivní BA slouží jako přenašeči v centrální nervové soustavě, zatímco vazoaktivní BA, mezi něž patří např. tyramin, jehož zvýšené množství vyvolává zrychlené dýchání, periferní vazokonstrikci, zvýšenou srdeční činnost, hladinu glukózy v krvi a uvolnění noradrenalinu (McCabe-Sellers et al., 2006).

Tabulka 1: Biogenní aminy, jejich prekurzory, produkty transformace a biologický význam (Velíšek and Hajšlová, 2009)

Biogenní amin	Původní aminokyselina	Další produkty aminokyselin a transformace aminu	Biologický význam
Histamin	histidin		lokální tkáňový hormon, snižuje krevní tlak, vliv na sekreci žaludeční šťávy, účast při anafylaktickém šoku a alergických reakcích
Kadaverin	lysin		stabilizace makromolekul (nukleové kyseliny), subcelulárních struktur (ribozomy), stimulace diferenciac buněk, rostlinný hormon
Putrescin	arginin <i>via</i> ornithin <i>nebo</i> citrullin	<i>N</i> -methylputrescin, PA spermin a spermidin	stabilizace makromolekul (nukleové kyseliny), subcelulárních struktur (ribozomy), stimulace diferenciac buněk, rostlinný hormon
Agmatin	arginin	putrescin, <i>N</i> -methylputrescin, PA spermin a spermidin	stabilizace makromolekul (nukleové kyseliny), subcelulárních struktur (ribozomy), stimulace diferenciac buněk, rostlinný hormon
Fenylethylamin	fenylalanin	tyramin, dopamin, adrenalin, noradrenalin	
Tyramin	tyrosin	dopamin, epinefrin, norepinefrin, synefrin, hordenin	prekurzor dopaminu, lokální tkáňový hormon, zvyšuje krevní tlak, vliv na kontrakce hladkého svalstva
Dopamin	DOPA	norepinefrin, epinefrin	mediátory sympatických nervů
Tryptamin	tryptofan	serotonin, melatonin	lokální tkáňové a rostlinné hormony (katecholaminy), vliv na krevní tlak, peristaltiku střev, psychické funkce

2.1.2 Potraviny s obsahem biogenních aminů

BA vznikají v různých fermentovaných i nezkašených potravinách a nápojích aktivitou některých bakterií mléčného kvašení, ale zejména aktivitou hnilobných bakterií, což je předurčuje jako ukazatele degradace potravin. Vyskytují se ve všech potravinách, které obsahují volné aminokyseliny nebo proteiny a jsou v nich vytvořeny podmínky umožňující mikrobiální a biochemickou aktivitu. BA jsou přítomné v široké škále potravinářských produktů, jako jsou alkoholické nápoje (víno, pivo), zelenina a ovoce, mléčné, masné a rybí výrobky, ořechy a čokoláda.

Celkové množství aminů závisí na povaze mikroorganismů a potravin. Při výrobě fermentovaných potravin lze očekávat velké množství mikroorganismů, z nichž některé produkují BA. Většina produktů s výskytem bakterií mléčného kvašení obsahuje značné množství histaminu, tyraminu, kadaverinu a putrescinu (Santos, 1996).

Maso a masné výrobky

Čerstvě zpracované vepřové maso obsahuje vysoké hladiny adrenalinu, sperminu a spermidinu, zatímco v tepelně upravovaném hovězím a vepřovém mletém masu je výskyt BA různý. Čerstvé mleté hovězí a vepřové maso nese vyšší riziko rozkladu v důsledku větší plochy povrchu, spojení několika odřezů masa a potenciálního smíchání staršího masa nebo masa o nízké kvalitě.

U vepřového masa bylo zjištěno, že hladiny BA jsou závislé na teplotě skladování. Vzorky skladované při 30°C měly vyšší hladiny BA než vzorky skladované při 4°C. Oproti tomu u čerstvého vakuově baleného hovězího masa bylo zjištěno, že i při skladování při 1°C se po 20. dni skladování hladiny BA začaly zvyšovat, což upozornilo, že i přes senzoričnou vhodnost může představovat riziko pro citlivější osoby (Santos, 1996, Shalaby, 1996).

Proces fermentace může být důležitý pro tvorbu histaminu v některých druzích uzenin. Do polosuchých uzenin, které se fermentují kratší dobu, bývají přidány přísady se startérovou kulturou, zatímco suché uzeniny se fermentují po delší dobu působením přirozené mikroflóry. U salámů je obsah BA zcela variabilní, což je

vysvětlováno jako působení rozdílných dob zrání a rozdílné aktivity dekarboxyláz v přirozené mikroflóře (Shalaby, 1996).

Ryby

Sledování BA u ryb a rybích výrobků je nejvíce spojováno s čeledí ryb makrelovití (*Scombridae*) a vysokým obsahem histaminu způsobujícím intoxikaci. Tyto ryby mají červenou svalovinu velmi bohatou na volný histidin, ze kterého se dekarboxylací tvoří histamin (Santos, 1996).

Studie zkoumající vliv skladovací teploty na tvorbu BA u ryb ukazují, že čerstvé ryby neobsahují histamin, ale při skladování v pokojové teplotě jeho obsah rapidně vzrůstá již po 24 hodinách. Ryby a rybí výrobky velmi rychle podléhají rozkladu, a proto se stále hledají vhodné skladovací techniky. Jako nejpříjemnější jsou zatím uváděny skladování při nízkých teplotách a konzervace solí. Žádná z těchto technik není zatím úplně bezpečná, jelikož průzkumy poukazují, že obsah histaminu nezávisí na druhu ryb, ale rychlosti rozkladných procesů, které mohou při špatných podmínkách skladování započít během několika málo hodin (Shalaby, 1996).

Sýry

Sýr je po rybách druhým produktem spojovaným s otravou histaminem a také obsahuje vysoké hodnoty tyraminu. Mléko obsahuje kasein, který je v průběhu zrání pomalu degradován proteolytickými enzymy, což vede ke zvýšení obsahu volných AMK, a proto byly BA nalezeny v malém množství v sušeném mléce a v mnoha variantách sýrů (Shalaby, 1996).

Množství BA v sýrech je ovlivněno mnoha faktory. Mezi hlavní faktory patří zejména délka zrání a způsob skladování sýrů. Bylo prokázáno, že během skladování při vyšších teplotách se zvýšila i tvorba BA. Například u sýrů skladovaných při 5°C byl zaznamenán nárůst BA během 3 týdnů, zatímco u sýrů skladovaných při 20°C byl nárůst pozorován již za týden. Tvorba BA může být také ovlivněna ošetřením vysokým tlakem během zrání sýrů. Jedná se o ošetření za zvýšeného tlaku, než je tlak atmosférický a dochází k ovlivnění proteolýzy. Tím dojde ke zvýšení produkce aminokyselin a peptidů, která následně může způsobit zvýšení produkce BA (Velíšek and Hajšlová, 2009).

Sýry vyráběné z pasterizovaného mléka mají menší pravděpodobnost výskytu BA, pokud nejsou staré nebo špatně skladované. Ve starších zrajících sýrech, jako je anglický Stilton, Cheshire a dánský Bleu se obsahy BA pohybují na střední až vysoké úrovni (McCabe-Sellers et al., 2006).

Obsah BA může dosahovat jednotek až stovek mg/kg tyraminu, histaminu, kadaverinu a putrescinu, jednotky až desítky mg/kg 2-fenyletylalaninu a nepatrná množství tryptaminu. Obsahy BA mohou výjimečně dosáhnout až gramových množství na kilogram sýra, což závisí na ošetření výchozí suroviny a technologických faktorech, jako jsou použití plísňových a startovacích kultur nebo teplota sýření (Standarová et al., 2008).

Sýry zrající pod mazem

Zvýšený obsah BA v sýrech zrajících pod mazem může být způsoben startérovými bakteriemi mléčného kvašení, non- startérovými bakteriemi mléčného kvašení nebo dalšími mikroorganismy. Obsah BA v těchto druzích sýrů je značný, jelikož obsahují velké množství mikroorganismů, které jsou schopné je tvořit. Bakterie rodu *Lactobacillus* produkují putrescin a histamin. Některé kmeny, jako *Lactobacillus brevis* se podílí na tvorbě tyraminu. Enterokoky, které jsou velmi odolné vůči vysoké teplotě a koncentraci chloridu sodného, tvoří velkou část mikroflóry sýrů zrajících pod mazem a podílejí se na dekarboxylaci tyrosinu za vzniku tyraminu (Velíšek and Hajšlová, 2009).

Ovoce a zelenina

V potravinách rostlinného původu tvoří BA jejich přirozenou součást. Hlavním BA v ovoci a zelenině je tyramin, v menším množství se vyskytuje i řada dalších. Často se vyskytují konjugáty BA se skořicovými či mastnými kyselinami. V některých rostlinách se nacházejí různé deriváty BA, které se běžně řadí mezi protoalkaloidy. Příkladem konjugátů BA s fenolovými kyselinami vykazujícími fungicidní aktivitu jsou hordatiny obsažené v klíčícím ječmeni. V pšenici se nacházejí amidy 2-hydroxyputrescinu s kyselinou ferulovou a *p* – kumarovou, které vznikají jako fytoalexiny při napadení rostliny (Velíšek and Hajšlová, 2009).

BA se většinou vyskytují v neškodném množství, ale pokud dojde ke zvýšení jejich obsahu k hranici škodlivosti, mohou se zařadit do skupiny přírodních

rizikových látek. Příčinou vyšší koncentrace je zejména mikrobiální kontaminace nebo nevhodné podmínky skladování (Velíšek, 2002, Komprda et al., 2004).

Hlavním BA je tyramin, který se nachází v červeném víně, banánech nebo jablkách. Další BA se vyskytují v menším množství např. v rajčatech, švestkách a listovém špenátu. 2-fenylethylalanin je také přirozenou složkou kakaových bobů a tak se vyskytuje v čokoládě, čokoládových výrobcích a cukrovinkách s obsahem čokolády (Santos, 1996, Kalač and Krausová, 2005, McCabe-Sellers et al, 2006).

Vyšší množství BA vykazuje fermentovaná zelenina, např. ve střední Evropě je nejrizikovější potravinou kysané zelí, zejména jestliže se vyrábí spontánní fermentací. Koncentrace BA se tak může vyšplhat až na desítky mg/100g (Komprda et al., 2004).

Tabulka 2: Obsah biogenních aminů a polyaminů v potravinách – živočišné produkty (Velíšek and Hajšlová, 2009)

Potraviny	Obsah v mg/kg (nebo v mg/dm ³) ^{c)}									
	HIM	CAD	PUT	SPD	SPM	AGM	PEA	TYM	TRM	SER
maso										
vepřové	0-45	0-171	s-702	s-5	5-40			1-35	1-48	
hovězí	0-217	0-27	s-26	s-5	5-40	2-112		s-61		
kuřecí	1	9	s-10	5-10	20-60		s	23		
masné výrobky										
šunka	1-271	s-97	s-20	s-8	20-60		s-215	s-618	8-67	
slanina	15	s-1	s-8	2-42	1-212			1-3	4	
uzeniny	s-550	s-787	1-396	s-10	10-60		0-696	0-1240	0-29	
ryby										
tuňák	s-8000	s-447	s-200	1-10	2-35		s-45	s-1060		
makrela	s-3000	s-226	s-40	2-4	s-8		s-126	s-75		
sýry										
měkké	0	0-1,5	0-3,1	0-0,8	0-1,1	0	0	0-0,6	0	
tvrdé a)	0-301	0-710	0-612	0-43	0-19	0-22	0-32	0-301	0-45	
tvrdé b)	0-609	0-389	0-670	0-40	0-22	0-27	0-30	0-609	0-34	
Cheddar	0-1300	0	1-996				0-303	0-1500	0-300	
Emmental	s-2000	0-460	1-130				0-490	0-1000	0-210	
Gouda	0-850	1-140	1-200				0-46	0-670	10-200	
Eidam	0-88	s	s					s-320		
Roquefort	0-4100	42-905	44-830				10-25	s-1350	10-1100	
Sýry celkem				s-40	s-20					

Tabulka 3: Obsah biogenních aminů a polyaminů v potravinách – rostlinné produkty (Velíšek and Hajšlová, 2009)

Potraviny	Obsah v mg/kg (nebo v mg/dm ³) ^{c)}									
	HIM	CAD	PUT	SPD	SPM	AGM	PEA	TYM	TRM	SER
ovoce										
banány			5	10	s			7-95		12-78
ananas	2-65							0-4		
pomeranč			95-150	s-10	s			1-10	s	
grapefruit			20-90	2-15	s			0-1400		
zelenina										
špenát	60		s-120	1-15	s-4			0-680		
rajčata	s-1		10	s	s			0-1200	4	12
Další potraviny										
Kysané zelí	1-200	1-311	6-550	s-45	s		0-9	2-310		
Sójová omáčka	0-274		s-500				s	s-882	s-100	
Pivo	0-22	0-40	2-15	0-7	0-4	1-41	0-8	1-68	0-5	
Slad	1-4		4-10			23-117		9-28		
Červené víno	0-30	0-47	2-20	s	s		s	0-90		
Bílé víno	0-20	3-108	1-11	s	s			s-212		
Sherry	0-31	1	3-25				1	1-17		
Čokoláda	0-10	0-8	0	1-2	s-11		0-27	0-2	s-1	

^{a)}Z pasterovaného mléka. ^{b)}Ze syrového kravího a ovčího mléka. ^{c)}s=stopy.

2.2 Zpracování potravin s obsahem BA

Fermentační technologie jsou řazeny mezi mikrobiální technologie, které jsou součástí biotechnologií. Společným principem těchto technologií je využívání účinku živého organismu pro přeměnu substrátu na produkt. Fermentací se zajišťuje údržnost výrobků, které neprojdou tepelným opracováním. Tyto technologie často zařazujeme mezi klasické biotechnologie, které se vyvíjely zejména v oblasti potravinářských výrob.

Kromě výroby fermentovaných nápojů, jako je pivo, víno a další nápoje zpracovávané dále destilací prokvašených cukerných roztoků, sem patří také výroba

pekařského droždí, octa a dalších organických kyselin využívaných v potravinářském průmyslu. Důležitým procesem je využívání mikroorganismů, které se také uplatňují při výrobě fermentovaných potravin, např. výroba fermentovaných omáček, kefiru, jogurtů, některých sýrů jako Gorgonzola, Roquefort a Emmental, ale také při výrobě kysané zeleniny, jako je kysané zelí a okurky (Ray and Montet, 2014).

2.2.1 Definice biotechnologických procesů

Fermentační proces se týká pochodů, při kterých probíhá kvašení, tedy k procesu, kdy dochází za nepřístupu vzduchu k odbourávání cukrů, vzniku oxidu uhličitého a některého metabolitu. Hlavním představitelem tohoto procesu je lihové kvašení, ale také mléčné nebo máselné kvašení. Fermentační proces se ale týká také mikrobiálních procesů za přístupu vzduchu, kdy mikroorganismy využívají kyslík a zdroj uhlíku. Všechny tyto mikrobiální procesy jsou založeny na činnosti mikroorganismů a využívají se pro výrobu důležitých produktů, nebo také za účelem zneškodnění některých nežádoucích látek vyskytujících se v životním prostředí. Pro růst mikroorganismů a pro tvorbu jejich produktů je důležité zajistit vhodné podmínky, jako jsou: pH, teplota, složení média, oxidačně-redukční potenciál aj. Mikroorganismy musí mít pro svou činnost zajištěn dostatečný přívod živin a energie, kromě toho také zdroje fosforu, dusíku a dalších biogenních prvků, specifické růstové faktory (AMK, vitamíny, minerální látky aj.), které si mikroorganismus nedokáže opatřit vlastní syntézou (Bamforth and Ward, 2014).

2.3 Mikroorganismy produkující BA

Důležitým faktorem pro tvorbu BA je přítomnost mikroorganismů schopných dekarboxylovat AMK. Dekarboxylázy jsou enzymy, které spadají do třídy lyáz. Existuje šest AMK dekarboxyláz, které jsou orientovány na L-izomery AMK lysinu, tyrosinu, argininu, histidinu, glutamové kyseliny a ornitinu. Tyto enzymy se vyskytují u rostlin, živočichů a mikroorganismů, zejména u bakterií vykazují dekarboxylázy výraznou aktivitu. Dekarboxylační aktivita se vyskytuje u bakterií rodu *Bacillus*, *Citrobacter*, *Clostridium*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Laktobacillus*, *Photobacterium*, *Enterococcus*, *Hafnia*, *Morganella*.

Tabulka 4: Mikroorganismy produkující BA a PA podle Shalaby (1997):

Potravina	Mikroorganismy	Produkované aminy
Sýry	<i>Bacillus macerans</i> , <i>ropionibacteria</i> , <i>Lactobacillus buchneri</i> , <i>Lactobacillus 30a</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>L. arabinose</i> <i>Streptococcus faecium</i> , <i>L. bulgaricus</i> , <i>S. mitis</i>	kadaverin, putrescin, Histamin, tyramin, β -enylethylalanin, tryptamin
Ryby	<i>Morganella morganii</i> , <i>Klebsiella pneumonia</i> , <i>Hafnia alvei</i> , <i>Proteus mirabilis</i> , <i>Proteus vulgaris</i> , <i>Clostridium perfringenes</i> , <i>Enterobacter aerogenes</i> , <i>Vibro alginolytiens</i> , <i>Bacillus spp.</i> , <i>Staphylococcus xylosus</i>	Histamin, tyramin, kadaverin, putrescin, agmatin, spermin, spermidin
Maso a masné výrobky	<i>Pediococcus</i> , <i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Lactobacillus</i> . <i>Pseudomonas</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>Micrococcus</i>	Histamin, kadaverin, putrescin, tyramin, β - fenylethylalanin, tryptamin
Fermentovaná zelenina	<i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Pediococci sp.</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Histamin, kadaverin, putrescin, tyramin, tryptamin
Fermentované sójové produkty	<i>Rhizopus oligosporus</i> , <i>Trichosporon beiglli</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i>	Histamin, kadaverin, putrescin, tyramin, tryptamin

2.4 Polyaminy

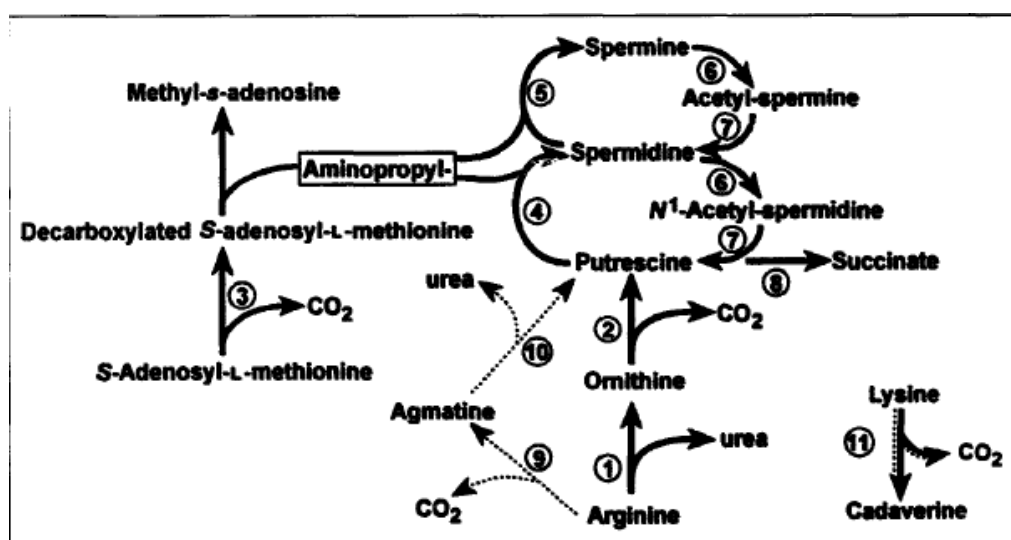
Polyaminy jsou částí skupiny BA, která se účastní mnoha procesů v lidském metabolismu. Jako biologicky aktivní PA byly klasifikovány spermin (SPM), spermidin (SPD) a putrescin (PUT), který byl zařazen kvůli jeho roli prekurzoru pro fyziologické PA (Dadáková et al., 2009).

Stejně jako jiné růstové faktory se putrescin, spermidin a spermin podílejí téměř na každém kroku syntézy DNA, RNA a bílkovin a mají tak zásadní roli pro buněčnou proliferaci a růst. PA jsou velmi stabilní sloučeniny schopné odolat teple, kyselým nebo alkalickým podmínkám. Mohou plnit širokou škálu jednoznačně

specifických funkcí v buňkách, jako je například kontrola a zahájení translace mRNA při vzniku proteinů. PA mohou stimulovat sdružování podjednotek ribozomů, stabilizovat strukturu tRNA a snížit rychlost degradace RNA, zvýšit syntézu RNA i DNA, kovalentně modifikovat proteiny a regulovat tuhost a stabilitu buněčných membrán (Bardócz, 1995).

Bylo prokázáno, že snížení obsahu PA inhibuje buněčnou migraci a proliferaci, může způsobit vadný vývoj embrya, zatímco jejich nadměrné hromadění způsobuje transformaci buněk a apoptózu (Moinard et al., 2005).

Obrázek 2: Biosyntéza polyaminů (Bardócz, 1995)



2.4.1 Biologické účinky polyaminů

Polyaminy putrescin, spermidin a spermin mají řadu biologických funkcí důležitých pro regulaci růstu a diferenciaci buněk, zejména u buněk střevních tkání. Mají úlohu při regulaci střevní metabolické aktivity, ale také u biosyntézy a proteosyntézy nukleových kyselin. To je důvodem, proč jsou vysoké hladiny PA pozorované v rychle se dělících buňkách, jako jsou nádorové buňky. Mají také pozitivní vliv na regeneraci a hojení poraněných tkání. Jejich nejdůležitější funkcí je působení jako tzv. second messenger (druzí poslové), čímž zprostředkovávají působení hormonů a růstových faktorů, v takových významných procesech jako je růst buněk, tkání a orgánů (Bardócz, 1995).

Pro biosyntézu PA u savců jsou důležité dva enzymy: S-adenosylmethionindekarboxyláza (AdoMetDC) a ornitindekarboxyláza (ODC), jejichž substráty pro tvorbu jsou methionin a arginin. Hlavní syntéza putrescinu v savčích buňkách se uskutečňuje z argininu činností ODC. Dále z putrescinu činností enzymů sperminsyntaxy a spermidinsyntaxy vznikají vyšší PA – spermin a spermidin. Pro tvorbu těchto dvou PA je důležitý aminopropyl, který je poskytován methioninem (Kalač and Krausová, 2005).

2.4.2 Potraviny s obsahem PA

PA se nacházejí zejména v potravinách rostlinného původu, jako je zelenina a ovoce, společně s ovocnými šťávami, kdy aminem s nejvyšším obsahem je putrescin. Vyskytují se také v produktech živočišného původu, jako je maso, ryby a mléko, kdy při dobře ošetřených potravinách jsou hladiny putrescinu velmi nízké. Mléčné výrobky obsahují vysoké množství hlavně spermidinu a putrescinu (Santos, 1996, Moinard et al., 2005, Kalač and Krausová, 2005 Larqué et al., 2007).

Existují zajímavé rozdíly v relativních množstvích PA v různých typech potravin. Červené maso obsahuje spermidin jako hlavní polyaminovou složku, zatímco ryby mají více putrescinu a obsah PA u kuřecího masa je podobný, jako u masa červeného. Obsah PA v mléce a mléčných výrobcích je nízký, s výjimkou sýrů, produktu mikrobiální fermentace, které mají vysoké hladiny putrescinu a spermidinu. Ovoce je bohaté na putrescin a spermidin a neobsahuje téměř žádný spermin. Stejně tak v zelenině je hlavním PA putrescin nebo spermidin (Bardócz, 1995).

Lidská strava jako celek obsahuje více putrescinu než spermidinu nebo sperminu, pocházejícího převážně ze zeleniny, zejména brambor, ovoce a sýrů. Nejlepšími zdroji spermidinu jsou chléb a obiloviny, ale přibližně polovina denního příjmu se získává z ovoce a zeleniny, včetně brambor, nebo z jejich produktů. Hlavními zdroji sperminu jsou maso, kuře a ryby spolu s chlebem a obilovinami (Bardócz, 1995, Moinard et al., 2005).

2.5 BA v houbách

Největší množství údajů o BA v houbách pochází z Japonska, kde se autoři zaměřují na druhy používané v tradiční japonské kuchyni. Syrové houby jsou potravinou s vysokým obsahem spermidinu, zatímco spermin ve většině případů nebyl detekován a kadaverin s putrescinem vykazovaly značné kolísání v závislosti na testovaných druzích (Nishimura et al. 2006).

Dadáková et al.(2009) zkoumali obsah BA v sedmnácti druzích volně rostoucích jedlých hub a zjistili, že nejvyšší množství BA obsahovaly zástupci čeledi *Boletaceae*, kdy putrescin dosahoval hodnoty až 150 mg/kg čerstvé hmoty, zatímco množství tyraminu bylo nízké, PEA značně kolísal od nedetekovatelných hodnot až po téměř 40 mg/kg. Obsah SPD se obvykle pohyboval kolem hodnoty 10 mg/kg čerstvé hmoty. Bylo zjištěno, že obsah BA závisí i na částech plodnice, kdy sporotvorné části vykazovaly vyšší obsah spermidinu, což bylo odůvodněno přítomností PA v metabolicky aktivních tkáních. Statisticky významné účinky roku sklizně, věk, částí plodnic a vzájemné interakce mezi obsahy fenylalaninu, putrescinu a sperminu byly nalezeny v *X. badius*. Produkce některých biogenních aminů se však může během skladování hub značně zvětšovat, jelikož je známo, že houby extrémně rychle podléhají zkáze (Dadáková et al., 2009, Kalač, 2016)

Významným faktorem ovlivňujícím obsah BA v plodnicích hub je počasí. Houby rostoucí v suchém období obsahují relativně větší množství sušiny a nízký obsah BA, zatímco houby rostoucí při vysoké vlhkosti obsahují více BA vlivem intenzivnější mikrobiální aktivity. (Dadáková et al., 2009).

2.6 Toxikologické účinky BA a PA

I když jsou BA důležité pro různé fyziologické funkce, jejich vysoký obsah může mít toxické účinky na lidský organismus. Vysoké množství aminů je tvořeno bakteriemi během dekarboxylace AMK a je používáno jako významný indikátor způsobující intoxikace. Spotřeba potravin s obsahem BA je zodpovědná za mnoho negativních účinků, které mohou vést k různým druhům alimentárních onemocnění (Ladero et al., 2010). Mezi nejvýznamnější BA s toxikologickými účinky patří histamin a tyramin (viz níže).

2.6.1 Toxicita histaminu

Nejzávažnějším důsledkem toxicity BA je vyvolání histaminové otravy (scombroid syndrom). Jedná o souhrn příznaků, které jsou vyvolané po požití histaminu v potravě a následném vstřebání v gastrointestinálním traktu. Název scombroid syndrom pochází od potravin nejčastěji spojovaných s touto otravou – rybami čeledi *Scombridae* a *Scomberesocidae*, jako je zejména makrela a tuňák, ale také treska, sled' nebo sardinky. Hladina HIM schopná vyvolat tento syndrom se pohybuje mezi 20 – 100 mg/100g rybiho masa, což mnohonásobně převyšuje obvyklé množství, které se např. u tuňáka pohybuje v rozmezí 0 – 10 mg/kg. Při

špatném skladování dochází ke zvýšení obsahu histaminu až na 3000 mg/kg. Vedle koncentrace histaminu se na příznacích podílí také množství spotřebované ryby a zejména použitá část ryby – za nejrizikovější se označuje střední část trupu (Malone and Metcalfe, 1986, Bělohlávková and Fuchs, 2005).

Potíže po požití potravin s vysokým obsahem histaminu se projevují během několika minut, maximálně do 24 hodin. Mezi příznaky patří např. průjem, nauzea, poruchy zraku a bolest hlavy, mezi vážnější patří hypotenze nebo hypertenze, tachykardie, vzácněji může dojít i k bronchospasmu, vazodilataci, šoku a arytmiím. Charakteristickým kožním projevem je kopřivka, vyrážky, lokální záněty nebo otok rtů a obličeje. Je nutné zmínit také možnost náhlých nebo vleklejších změn chování, úzkostné stavy a fobie, poruchy spánku a u žen poruchy menstruačního cyklu (Bělohlávková and Fuchs, 2005, Fuchs et al., 2011).

2.6.2 Histaminová intolerance (HIT)

Nadměrné množství HIM, a to exo i endogenního, spolu s poruchou degradace aminů, vyvolává reakci podobnou alergii – histaminovou intoleranci (HIT). Degradace histaminu je součástí homeostaze, kdy rovnováha mezi přísunem a odstraněním je životně důležitá pro centrální nervovou soustavu (CNS), ale také pro optimální napětí hladké svaloviny, tak i pro mnoho dějů probíhajících ve sliznicích, cévách a specifických orgánech. Za degradační metabolismus histaminu jsou odpovědné dva enzymy: diaminoxidáza (DAO), která oxidační deaminací inaktivuje histamin a N-metyltransferáza. Pro případnou HIT je správná sekrece a funkce DAO rozhodujícím faktorem (Fuchs et al., 2011).

Kromě perorálně podané dávky má hlavní význam stav regulačních systémů střev a jater: střevní absorpci histaminu reguluje enzym monoaminoxidáza (MAO), která je uvolňována z enterocytů tenkého střeva do střevního lumen. V důsledku toho mohou mít poruchy nebo snížená aktivita MAO za následek vysoký obsah histaminu v krvi, což vede k přetížení vnitřního jaterního inaktivačního systému (Rauscher et al., 2009).

2.6.3 Toxicita tyraminu

Tyramin, společně s tryptaminem a 2-fenylethylalaninem patří mezi vasokonstriktivní aminy. Význam tyraminu v potravinách je zejména kvůli jeho toxikologickým důsledkům, nejen, že je sám o sobě mírně toxický, ale také reaguje

s inhibitory monoaminoxidázy (MAOI), které se používají jako léky. Jejich užívání společně s potravinami s obsahem tyraminu mohou vyvolat hypertenzní krizi. Hlavním účinkem tyraminu je uvolňování noradrenalinu ze sympatického nervového systému, které způsobuje periferní vasokonstrikci, zvýšení krevního tlaku a srdeční činnosti (Shalaby, 1996).

Inhibitory monoaminoxidázy se používají zejména k inhibici tohoto enzymu v centrálním nervovém systému a dělí se do několika generací léčiv. Příkladem mohou být inhibitory monoaminoxidázy B (MAO-B), které jsou dnes k dispozici jako jedna z látek sloužící k léčbě motorických příznaků Parkinsonovy choroby. Podání těchto inhibitorů zvyšuje účinnost metylesteru levodopa (L-DOPA), který je nejvíce využívanou látkou k léčbě pozdních hybných stádií této nemoci (Bareš, 2010). Dalším využitím těchto inhibitorů jsou antidepressiva. Pro ta se využívají zejména ireverzibilní inhibitory monoaminoxidázy typu A (IMAO) a reverzibilní inhibitory monoaminoxidázy typu A (RIMA), (Fujáková and Kopeček, 2012).

První potravina spojovaná se zvýšením krevního tlaku u pacientů podstupujících léčbu MAOI byl sýr, proto je zvyšování krevního tlaku po konzumaci potravin s obsahem tyraminu označováno jako reakce na sýr. Tato reakce může způsobit silné bolesti hlavy, nebo vyvolat krvácení do mozku a srdeční selhání (Shalaby, 1996).

2.6.4 Účast BA na nádorovém bujení

Některé BA mohou vytvářet deriváty dusíkatých sloučenin nebo působit jako prekurzory pro sloučeniny schopné tvořit nitrosaminy. Tyto látky jsou karcinogenní pro mnoho druhů zvířat a mohou tak být i potencionálním nebezpečím pro člověka. Při onemocnění rakovinou se nejčastěji vyskytují PA. Vzhledem k účasti na růstu buněk a proliferaci se PA hromadí také v nádorových tkáních a jejich obsah v tělních tekutinách je vyšší u pacientů, kterým byla diagnostikována rakovina (Toninello et al., 2006, Casero and Marton, 2007).

Léčiva inhibující biosyntézu BA mohou předcházet rakovině a sloužit i k terapeutickým účelům. Výzkum se také zaměřuje na katabolismus BA a katabolických produktů, kde se zdá, že rovnováha antioxidantních enzymů a aminoxidáz může být klíčová pro inhibici a progresi rakoviny. Zdá se, že dlouhodobá nerovnováha těchto dvou enzymů podporuje karcinogenezi, zatímco

během krátkodobé nerovnováhy mohou být amiooxidázy cytotoxické pro nádorové buňky (Kalač and Krausová, 2005, Toninello et al., 2006).

I když léky ovlivňující biosyntézu PA mají velký potenciál jako terapeutická léčiva, nádorové buňky dokážou absorbovat extracelulární polyaminy a to jak alimentární, tak produkované gastrointestinálními bakteriemi a snižovat účinky terapeutických látek (Kalač and Krausová 2005).

2.7 Odstranění BA z organismu

Lidské tělo má k dispozici řadu detoxikačních mechanismů, které slouží k odbourání přebytečného množství BA. Hlavní enzymy, které se podílejí na odbourávání BA ve střevech, jsou mono a diaminooxidáza (MAO a DAO). Odbourávání polyaminů SPD a SPM má na starost polyaminooxidáza. Tyto enzymy ovlivňují toxicitu BA, která může být u jedinců odlišná a závislá na různých faktorech, jako je přítomnost inhibitorů (léčiva, antidepressiva, antiparkinsonika), které mění metabolismus BA a důsledkem je vyvolání zdravotních komplikací. Enzymový systém inhibovaný léčivy však není schopný vysoký obsah BA eliminovat. Určité množství enzymů nutné pro odbourávání HIM a TYM vyčerpávají CAD a PUT, které ale nejsou tak rizikové i přesto, že jejich výskyt v potravinách je značný (Karovičová and Kohajdová, 2005).

Lidé se srdečními a respiračními obtížemi, hypertenzí nebo nedostatkem vitamínu B12 jsou citliví k nižším dávkám BA (Bardócz, 1995). Jedinci s onemocněním zažívacího traktu jako je gastritida, Crohnova nemoc nebo syndrom dráždivého tračníku jsou také ohroženi, jelikož činnost oxidáz ve střevech bývá nižší, než u zdravých jedinců. Toxické účinky BA mohou rozšířit i další látky, např. alkohol nebo acetaldehyd, protože podporují jejich transport stěnou střeva (Ruiz-Capillas and Jimenez-Colmenero, 2004, Kalač and Krausová, 2005).

2.8 Houby

Houby (*Fungi*) se v současné době považují za samostatnou říši, ale původně byly řazeny do rostlinné říše jako nezelené rostliny, navíc nerozlišené v kořeny, stonky, listy a květy. Ve skutečnosti jsou to jedno nebo vícebuněčné heterotrofní organismy a neobsahují chlorofyl. Plodnice hub tvoří jednoduchá pletiva složená z houbových vláken, tzv. hyf, v jejichž stěnách je obsažen hlavně chitin (Valíček, 2011).

Houby mají nezastupitelnou roli jak v přírodě, tak i v lidském životě. Jejich základní úlohou je podílení na rozkladu organické hmoty na anorganické sloučeniny. Podílejí se také na humifikaci. Pokud jde o využití člověkem, nižší houby, např. kvasinky, se používají k výrobě vína a piva, těst, další produkují enzymy, pesticidy, růstové hormony, antibiotika, jiné námel, barviva nebo vitaminy. Vyšší houby mají důležitou roli v každodenním životě člověka, ať už jako léčiva nebo potraviny (Valíček, 2011).

2.8.1 Jedlé houby

Za jedlé houby jsou označovány druhy hub, které po dostatečné tepelné úpravě nevyvolávají zdravotní potíže.

2.8.2 Složení jedlých hub

Nejvíce zastoupenými složkami biologických materiálů v jedlých houbách jsou voda, bílkoviny, sacharidy a lipidy. Značný význam pro lidskou výživu mají také minerální látky a vitamíny, jejichž obsah je podstatně nižší, než výše zmiňovaných živin.

U konzumace hub je třeba brát v úvahu otázku využitelnosti jednotlivých složek. Houby obsahují značné množství nestravitelného chitinu, který omezuje stravitelnost dalších látek. To je příznivé z hlediska snížení rizika nežádoucích látek, např. radioaktivních prvků nebo těžkých kovů, ale také to omezuje vžitá tvrzení, že houby slouží jako bohatý zdroj bílkovin, některých vitamínů a stopových prvků (Kalač, 2008, Valíček, 2011). Kalač (2008) však poukazuje, že objektivních údajů posuzujících stravitelnost různých látek obsažených v houbách je velmi málo a většina dostupných údajů je uváděna pouze pro syrové houby.

Valíček (2011) uvádí, že v houbách je nejvíce obsažena voda, která tvoří 75 – 94 %, zbylá procenta tvoří sušina. V sušině je obsaženo 24,4 – 63 % bílkovin, 4,3– 55 % sacharidů, 0,1 – 6,7 % tuku a 0,6 – 2,5 % minerálních látek. Oproti tomu Kalač (2008) uvádí obsah vody 86 – 94 % a přirovnává tyto hodnoty k hodnotám hlávkového salátu, zelí, rajčat nebo k neslazeným ovocným džusům a mléku.

Bílkoviny

Je známo, že bílkoviny jsou základním stavebním kamenem každého živého organismu. Kvalita bílkovin potom závisí na zastoupení jednotlivých aminokyselin. Z celkového počtu dvaceti aminokyselin tvořících bílkoviny lidského organismu, si může jen 11 vytvořit naše tělo samo a zbytek musí přijmout s potravou jako tzv. esenciální aminokyseliny. V houbách je esenciálních aminokyselin zastoupeno až deset, např. leucin, lysin, metionin, treonin a tryptofan, z ostatních aminokyselin obsahují velké množství prolinu, ale také asparagin, arginin, serin, glutamin, alanin, glycin aj. Volné aminokyseliny jsou důležité nejen pro výživu člověka, ale i výrazně ovlivňují vůni a chuť hub (Kalač, 2008, Valíček, 2011).

Sacharidy

Tuto skupinu obsahových látek tvoří rozpustné cukry obsažené v plazmě. Jedná se hlavně o trehalózu, která se běžně vyskytuje v tělech nižších organismů, např. bakterií, kvasinek a hub, ale také hmyzu. Dále je to ribóza a glukóza, galaktany a glykogen, který slouží jako zásobní polysacharid. V plodnicích se vyskytují také cukerné alkoholy, jako např. mannitol, sorbitol, arabitol, volemitol a erythrinol. Důležité jsou také polysacharidy, především glukany, ale i mannany, chitin a další, kterým jsou připisovány léčivé účinky (Valíček, 2011).

Lipidy

Obsah celkových lipidů v houbách se pohybuje v rozmezí 2 – 6 % v sušině. Výjimkou je údaj 27,5 % pro muchomůrku růžovku. V zastoupení vyšších mastných kyselin převládají kyseliny olejová, linolová a nasycená kyselina palmitová. Z výživového hlediska jsou houby, podobně jako zelenina a ovoce málo významným zdrojem lipidů a nenasycených mastných kyselin, především nedostatkové α -linolenové. Údaje o nežádoucích trans – mastných kyselinách v houbách prakticky

chybějí, takže lze předpokládat, že pokud se vyskytují, není jejich zastoupení zdravotně významné (Kalač, 2008).

Minerální látky

O množství a zastoupení minerálních látek rozhoduje nejen druh houby, ale zvláště podmínky prostředí, zejména místo rozšíření a půdní charakter. Zastoupeno je velké množství draslíku, dále fosfor, dusík, síra, hořčík, železo, vápník a sodík, ale také mikroprvky jako zinek, jód, měď, hořčík, lithium, fluor aj. Zcela mimořádný je obsah selenu, jehož hodnoty mohou být až stokrát vyšší, než v zelených rostlinách. U některých druhů je obsaženo také germanium s protinádorovými účinky. Je však důležité si uvědomit, že houby jsou schopny přijímat z okolního prostředí i těžké kovy, zejména olovo, rtuť a kadmium (Valíček, 2011).

3 CÍL PRÁCE

1. Vypracování literární rešerše.
2. Navržení a provedení experimentů, ve kterých se zkoumá obsah BA a PA při běžných kuchyňských úpravách volně rostoucích jedlých hub.
3. Stanovení vlastního obsahu BA a PA metodou HPLC.
4. Vyhodnocení získaných výsledků.

4 Experimentální část

4.1 Použité laboratorní chemikálie, pomůcky, přístroje a zařízení

Pro analýzu BA a PA byly kromě běžných laboratorních chemikálií, pomůcek a laboratorního skla použity následující chemikálie, přístroje a zařízení. Veškeré použité chemikálie byly analytické čistoty.

4.1.1 Chemikálie

1,7 – heptandiamin, Fluka, Buchs, Švýcarsko

Acetonitril, Merck, Německo

Dansylchlorid, Sigma Aldrich, Německo

Fenylamin hydrochlorid, Sigma Aldrich, Německo

Heptan, Fluka, Buchs, Švýcarsko

Histamin dihydrochlorid, Fluka, Buchs, Švýcarsko

Hydrogenuhličitan sodný, Lach – Ner, Neratovice, ČR

Kadaverin dihydrochlorid, Fluka, Buchs, Švýcarsko

Kyselina chloristá, Acros, Geel, Belgie

Prolin, Fluka, Buchs, Švýcarsko

Putrescin dihydrochlorid, Fluka, Buchs, Švýcarsko

Spermidin trihydrochlorid, Sigma Aldrich, Německo

Spermin tetrahydrochlorid, Sigma Aldrich, Německo

Tryptamin hydrochlorid, Fluka, Buchs, Švýcarsko

Tyramin hydrochlorid, Fluka, Buchs, Švýcarsko

Uhličitan draselný, Penta, Chrudim, ČR

Uhličitan sodný, Penta, Chrudim, ČR

4.1.2 Přístroje a zařízení

Filtr ze skelných vláken Z7, Filpap, Štěstí, ČR

Kapalinový chromatograf (RR – LC), Agilent Technologies, USA

Mlýnek Grandomix GM 200, Retsch, Německo

Odstředivka Sigma 2 – 5, Německo

Thermovap, Ecom, ČR

Třepačka LT2, Kavalier Sázava, ČR

4.2 Odběr vzorků

Pro studium obsahu BA a PA během vybraných kuchyňských úprav byly zvoleny druhy: suchohřib hnědý a klouzek strakoš, u kterých se prováděla pasterace, skladování a mražení. Oba druhy patří mezi nejznámější druhy jedlých hub, které rostou běžně a ve velkém množství v České republice a jsou pravidelně sbírány a upravovány nejrůznějšími způsoby.

Odběrové místo – Skalka je soustavou kopců s nadmořskou výškou okolo 700 m.n.m. přibližně 16 kilometrů západně od Českých Budějovic. Nachází se na severní hranici chráněné krajinné oblasti Blanský les poblíž obce Holašovice. Na stanovišti (48.9574083N, 14.2774281E) roste zhruba padesátiletý porost borovice lesní (*Pinus sylvestris*) s občasným zastoupením buku lesního (*Fagus sylvatica*) a habru obecného (*Carpinus betulus*). Podrost je druhové málo pestrý, převládá brusnice borůvka (*Vaccinium myrtillus*). Oblast je lesnický využívána a patří k oblíbeným lokalitám pro sběr hub.

Vzorky jedlých hub byly odebírány během září roku 2014. Plodnice byly odebrány v ranních hodinách dnů bez srážek a zpracovány během tří hodin po odběru. Plodnice byly povrchově očištěny a vyřazeny ty, které byly poškozené hmyzem nebo okusem. Druh houby byl následně ověřen pomocí literatury. U každého druhu jedlé houby bylo odebráno takové množství plodnic všech věkových skupin, aby výsledný průměrný vzorek po úpravě vážil alespoň 3500g, u hříbu smrkového 2000g. Z tohoto množství byl následně vytvořen průměrný vzorek, který je složením homogenní, z důvodu rozdílného obsahu BA a PA v jednotlivých částech plodnice viz (Wolfová, 2016).

Zpracování základního vzorku

Povrchově očištěné plodnice každého druhu vybrané pro experimenty byly nakrájeny na plátky maximálně 5 mm silné. Celé množství průměrného materiálu bylo po nakrájení promícháno a bylo předmětem dalších experimentů. Z tohoto materiálu byl odebrán základní vzorek ke stanovení výchozího obsahu BA a PA. Tento vzorek byl zmražen při -16°C a posléze lyofilizován a připraven k analýze (viz dále). Celé množství nakrájených hub bylo zváženo a použito pro tepelné úpravy.

Vybrané druhy kuchyňských úprav:

Podušení

Jedná se o krátkodobou tepelnou úpravu, která slouží u zeleniny a hub hlavně k inaktivaci enzymových systémů a zamezení rozkladu a znehodnocení suroviny. U hub slouží také ke snížení obsahu vody.

Pokrájené houby byly dušeny na pánvi s přidavkem vody v množství 20% hmotnostní (prevence připálení) po dobu 15 minut. Po tepelné úpravě byly všechny dávky smíchány a zváženy. Dokonale promíchaný materiál sloužil jako základní surovina pro všechny další kuchyňské experimenty. Také v této fázi byl odebrán vzorek podušeného materiálu ke stanovení obsahu BA a PA.

Pasterace

Je tepelná úprava potravin, která slouží k inaktivaci vegetativních forem mikroorganismů. Spóry sporulujících mikroorganismů nejsou procesem dotčeny. Provedení pasterace závisí na charakteru zpracovávaného materiálu, zejména na kyselosti. Kyselé potraviny lze pasterovat jednoduchým procesem, pasterace nekyselých potravin je většinou doplněna dalším procesem, např. konzervací sníženou teplotou, kdy vlivem zhoršených podmínek dochází ke snížení růstu mikroorganismů. Obvyklým provedením pasterace v domácích podmínkách je zahřátí potravin v uzavřeném obalu ve vroucí vodní lázni.

Podušené houby byly odváženy do sklenice a uzavřeny šroubovacím uzávěrem. Poté byly zahřívány po dobu 30 minut od bodu varu vodní lázně dvakrát s odstupem 48 hodin.

Skladování

V domácnostech bývají podušené houby skladovány pasterované v obale při běžné teplotě nebo jsou zmrazeny. V obou případech je doporučovaná doba skladování maximálně jeden rok. V rámci práce byly použity oba postupy.

Skladování pasterovaných hub

Houby pasterované ve skleněném obale byly skladovány v temnu při teplotě 22 °C jeden rok. Vzorky k analýze byly odebírány každé tři měsíce, přičemž první odběr byl proveden ihned po pasteraci.

Mražení podušených hub

Podušené houby byly naváženy do plastové vzorkovnice, uzavřeny šroubovacím víčkem a umístěny do mrazicího boxu při teplotě -16°C. Během skladování trvajících jeden rok byly každé tři měsíce odebrány vzorky k analýze.

Zpracování průběžně odebíraných vzorků

Všechny vzorky hub byly po odběru zmrazeny při teplotě -16°C a postupně lyofilizovány (24 hodin, -46°C, 0,25 mbar). Sušené vzorky byly homogenizovány na laboratorním mlýnku a upravený vzorek byl uchovávan až do analýzy v uzavřené plastové vzorkovnici při teplotě -16°C. Veškerý materiál byl lyofilizován proto, že čerstvé houby jsou neúdržné a rychle podléhají zkáze.

4.3 Analýza BA a PA metodou HPLC

4.3.1 Extrakce – tuhé vzorky

Extrakce byla provedena podle publikovaného postupu (Dadáková et al. 2009).

Postup extrakce:

Do 50 ml plastové odstředivací kyvety byl navážen 1g lyofilizovaného vzorku hub a následně bylo přidáno 3,5 ml vnitřního standardu HEP (400 ml.l⁻¹ roztoku heptandiaminu v 0,6M roztoku kyseliny chloristé). Směs byla po dobu 30 minut homogenizována na třepačce LT 2 při pokojové teplotě a poté byla odstředěna na odstředivce 10 minut při 3500 otáčkách. Na závěr byl supernatant přefiltrován přes papírový filtr.

Derivatizace:

Byl napipetován 1 ml extraktu hub (v 0,6M roztoku kyseliny chloristé) a následně zneutralizován 1,5 ml uhličitanového extraktu, který se vždy připravuje čerstvý podle následujícího schématu:

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	6,328
(ml) AB	2	4	6	8	10	12	14

Příprava roztoku AB:

A: Na₂CO₃ 2,65 g ad 50 ml

B: NaHCO₃ 4,2 g ad 100 ml

pH pufru B bylo nastaveno pomocí pufru A na hodnotu 9,2. Následně bylo přidáno 2 ml derivatizačního činidla (dansynchlorid o koncentraci 5 mg/ 1 ml acetonu), který se připravuje vždy čerstvý. Směs byla po dobu 20 hodin třepána ve tmě při laboratorní teplotě. Následovalo přidání 200 µm prolinu (0,1 g prolinu / 1 ml vody) a extrahování 3 ml heptanu s 2,5 minutovým pomalým protřepáváním. Následně byl odebrán 1 ml heptanového extraktu, poté odpařen do sucha pod dusíkem a rozpuštěn v 1,5 ml acetonitrilu. Na závěr byl rozpuštěný odparek přefiltrován přes skleněný filtr.

4.3.2 Analytická koncovka

Analýza derivatizovaného vzorku s obsahem dansylderivatů přítomných aminů byla provedena metodou kapalinové chromatografie s využitím UPLC techniky. Provedení odpovídalo publikované metodě (Dadáková et al,2009).

K analýze byl použit kapalinový chromatograf vybavený binární pumou, zařízením na odplynění mobilních fází, autosamplerem, termostatem kolon a diodearray 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

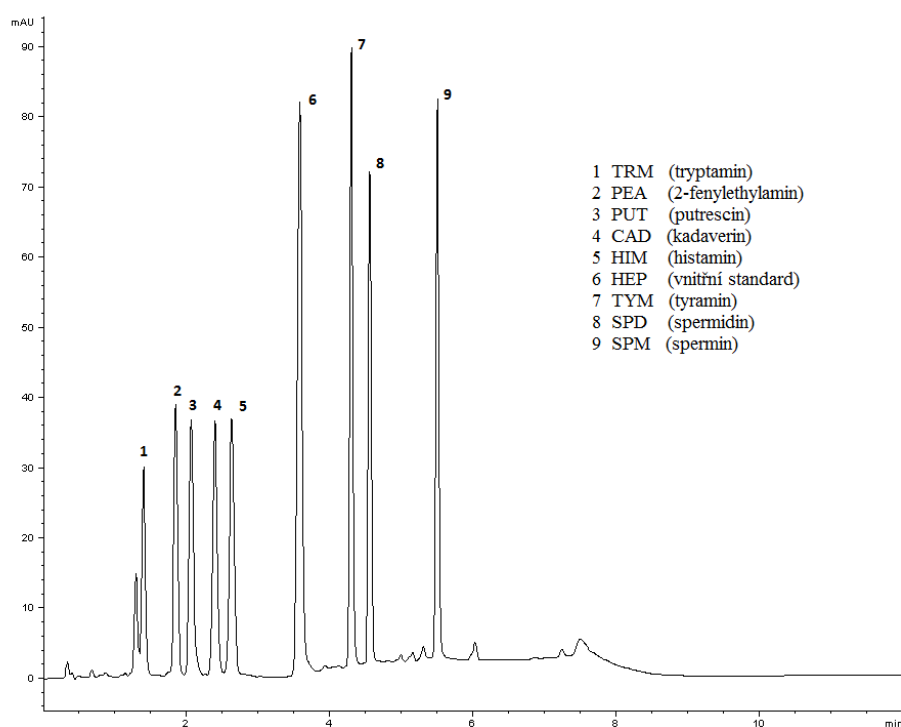
fází A (100% acetonitril) a B (50% acetonitril) a gradientové eluce podle následujícího programu:

Schéma gradientu:

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 1ml/min. Kolona byla termostatována na 25°C, objem nástřiku činil 5 µl a jednotlivé analyty byly detekovány při vlnové délce 225 nm.

Obrázek 3: Záznam standardu BA a PA



Tabulka 5: Meze stanovitelnosti aminů v sušině (mg/kg)

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

4.4 Zpracování dat

Naměřené hodnoty byly vyhodnoceny pomocí programu ChemStation 3,0 forLCsystems (Agilent Technologies). Obsah BA a PA byl stanoven metodou vnější kalibrace pomocí kalibračních závislostí. Pro výpočet obsahů BA a PA byly použity nástroje programu MS Office Excel.

4.4.1 Statistické zpracování dat

Získaná data byla vyhodnocena statistickými nástroji pro analýzu dat programu Excel. Data byla testována regresní analýzou a dvouvýběrovým párovým t-testem na střední hodnotu na hladině významnosti $p < 0,05$.

5 Výsledky a diskuze

5.1 Vliv pasterace a skladování na obsah BA

5.1.1 Vliv pasterace a skladování na obsah BA u klouzka strakoše

Ze sledovaných aminů byly v K. strakoši naměřeny hodnoty PUT, TYM, SPD a SPM. Nejvyšší obsah byl naměřen u PUT, jehož hodnoty při prvním odběru byly 1100 mg/kg sušiny, zatímco v průběhu skladování jeho hodnota kolísala. Hodnoty TYM do šestého měsíce skladování mírně klesaly a poté se jeho hodnota zvýšila na 23,2 mg/kg sušiny. Hodnoty SPD ve třetím až devátém měsíci klesaly, zatímco ve dvanáctém měsíci došlo k mírnému nárůstu. Zatímco SPM do devátého měsíce odběru vzorku klesal, poté došlo ke zvýšení hodnot a opětovnému poklesu.

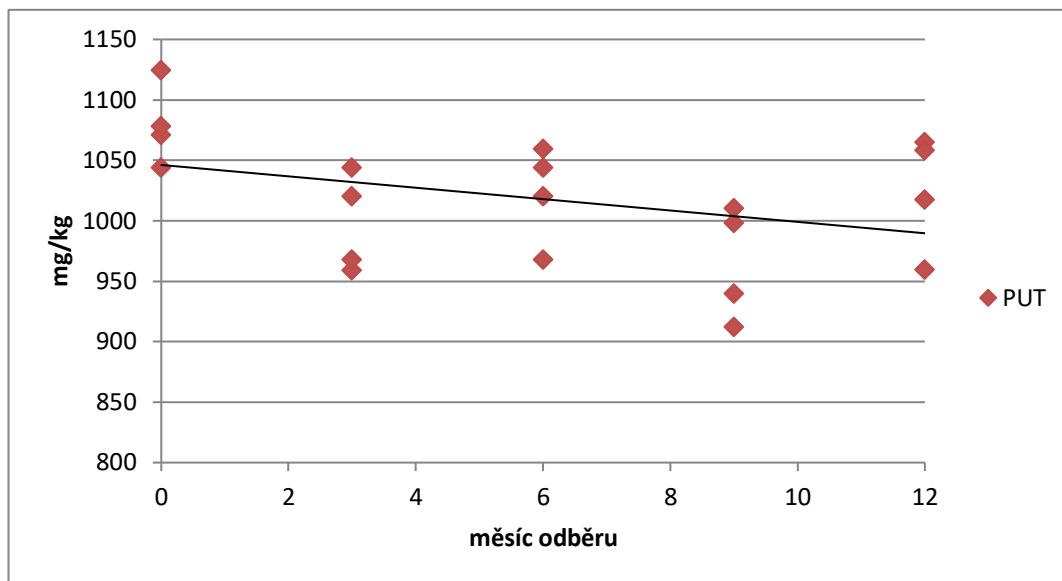
Při vyhodnocení základního vzorku (L) byly stanoveny hodnoty pro BA a PA (viz tabulka 6) a při porovnání s dušeným vzorkem (D) lze vidět, že hodnoty aminů u K. strakoše klesají. Porovnání vlivu úprav mezi základním vzorkem a vzorkem dušeným vyšlo pro všechny BA statisticky nevýznamné, zatímco porovnání mezi základním vzorkem a vzorkem odebraným ihned po pasteraci (0) bylo statisticky významné pro všechny sledované BA.

Tabulka 6: Obsah BA a PA v pasterovaném K. strakoši (mg/kg)

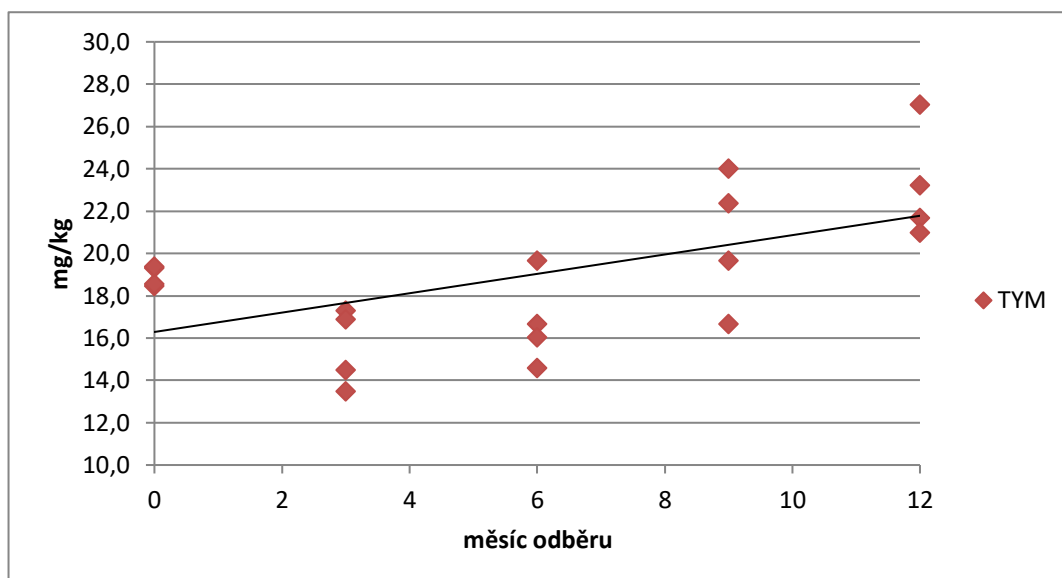
měsíc	PUT	TYM	SPD	SPM
L	1520±39,4	26,3±0,1	463±9,9	94±4,7
D	1180±56,1	21,6±0,5	362±31,7	87,5±0,3
0	1100±29,1	18,9±0,4	304±20,3	79±0,8,0
3	998±35,5	15,5±1,6	270±18,2	70,4±3,8
6	1000±34,6	15,5±1,6	270±18,2	70,4±3,8
9	965±40,7	20,7±2,8	258±22,0	73,1±3,7
12	1000±42,1	23,2±2,3	278±19,1	70,2±6,7

Změny obsahu BA a PA během ročního skladování jsou znázorněny v grafech 1 až 4. Změny obsahu PUT a SPD vyšly statisticky nevýznamné, zatímco u SPM a TYM se statistická významnost potvrdila.

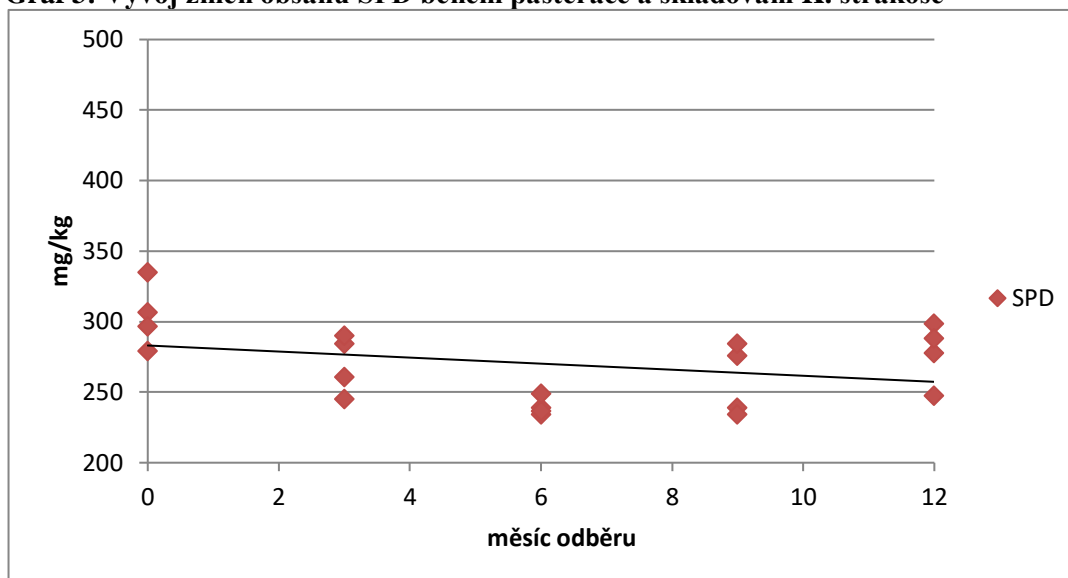
Graf 1: Vývoj změn obsahu PUT během pasterace a skladování K. strakoše



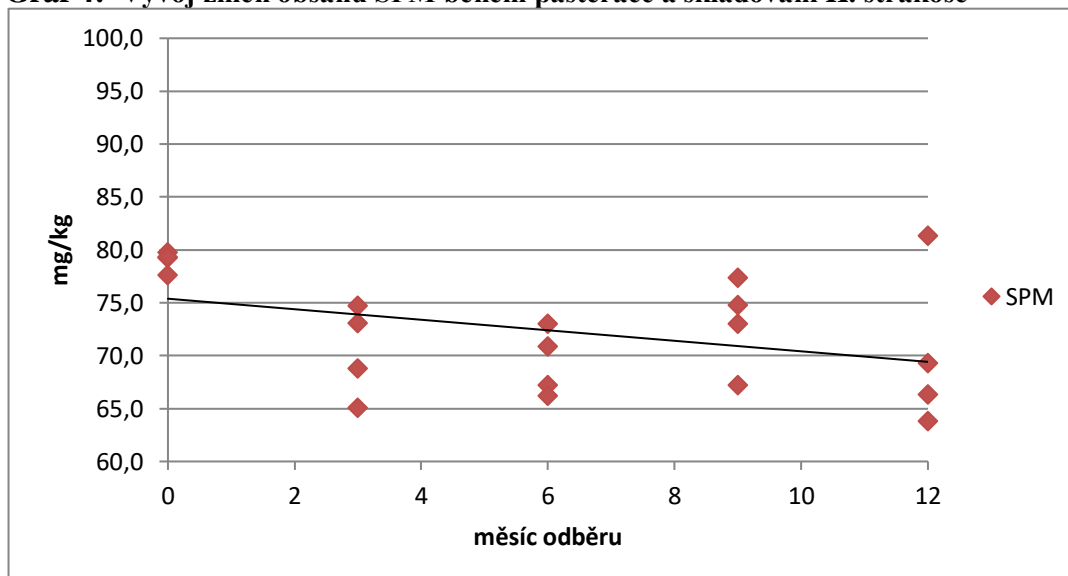
Graf 2: Vývoj změn obsahu TYM během pasterace a skladování K. strakoše



Graf 3: Vývoj změn obsahu SPD během pasterace a skladování K. strakoše



Graf 4: Vývoj změn obsahu SPM během pasterace a skladování K. strakoše



5.1.2 Vliv pasterace a skladování na obsah BA u suchohříbu hnědého

V S. hnědém byly naměřeny hodnoty TRM, PEA, PUT, TYM, SPD a SPM (viz tabulka 7). Nejvyšší hodnoty byly naměřeny u SPD a to 780 mg/kg při prvním odběru a jeho hodnoty po dobu pokusu vzrostly až na 925 mg/kg. Druhým aminem

s nejvyššími hodnotami byl PUT, jehož obsah vzrostl ze 768 mg/kg na 885 mg/kg. Kalač and Křížek (1996) zkoumali obsah PUT v S. hnědém sesbíraném v roce 1994 a 1995 a zjistili, že v čerstvě dušeném vzorku z roku 1994 dosahuje hodnot 137 mg/kg, zatímco v sušině bylo obsaženo 1460 mg/kg. Ve vzorku z roku 1995 se obsah PUT vyskytoval v 46,8 mg/kg čerstvě dušeného vzorku, zatímco v sušině bylo obsaženo 521 mg/kg. Zajímavostí je, že autoři vystavili dušené vzorky také extrémním podmínkám skladování, kdy byly umístěny v teplotách 6°C a 20°C po dobu 48 hodin, přičemž se zjistilo, že PUT při vyšší teplotě dosahoval téměř dvojnásobku hodnot, než tomu bylo u teploty nižší.

Nejvyšších hodnot SPM bylo dosaženo ve třetím měsíci odběru, kdy jeho hodnoty dosáhly 35,8 mg/kg a postupně se snižovaly. Obsah TRM kolísal a nejvyšší hodnoty 49,9 mg/kg dosáhl v devátém měsíci. Obsah TYM se postupně zvyšoval až na 81,9 mg/kg v devátém měsíci, poté klesl. Hodnoty PEA se s mírným kolísáním snižovaly ze 197 mg/kg v prvním odběru po 189 mg/kg ve dvanáctém měsíci skladování.

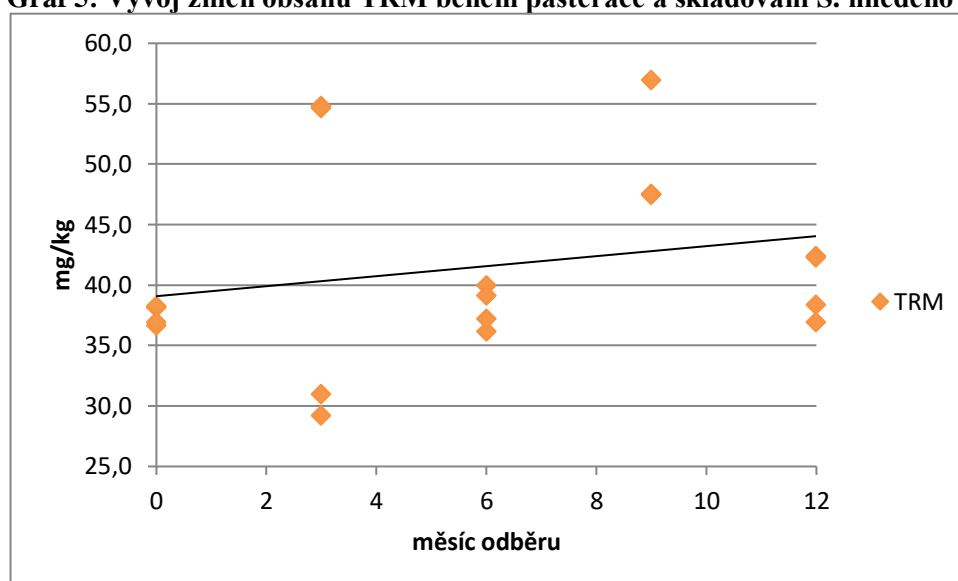
Při vyhodnocení základního vzorku (L) byly stanoveny hodnoty pro BA a PA (viz tabulka 7) a při porovnání s dušeným vzorkem (D) lze vidět, že u S. hnědého dochází ke zvyšování a následnému poklesu obsahu BA a PA v poslední fázi. Porovnání vlivu úprav mezi základním vzorkem a vzorkem dušeným vyšlo statisticky významné pouze pro TRM, zatímco porovnání mezi základním vzorkem a vzorkem odebraným ihned po pasteraci bylo statisticky významné pro všechny sledované BA vyjma SPD.

Tabulka 7: Obsah BA a PA v pasterovaném S. hnědém (mg/kg)

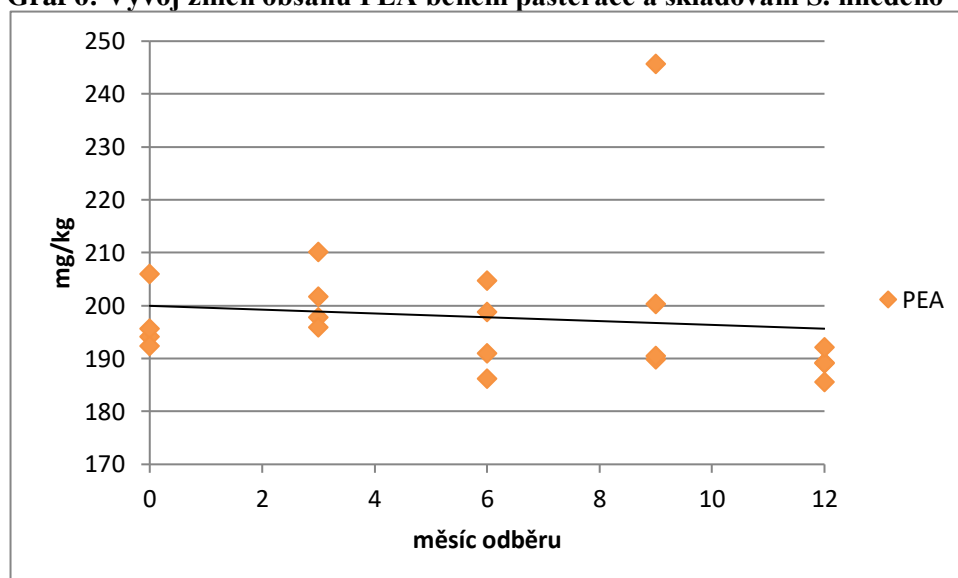
měsíc	TRM	PEA	PUT	TYM	SPD	SPM
L	96,8±3,8	277±21,4	1100±64,3	97,4±0,1	791±4,7	49,4±5,7
D	44,1±0,1	204±0,9	798±21,0	81,9±1,6	639±21,6	33,2±2,3
0	37,5±0,7	197±5,3	768±36,2	73,9±1,1	780±26,8	29,8±1,7
3	42,4±12,3	201±5,5	810±15,0	80,0±3,1	843±12,4	35,8±1,3
6	38,1±1,5	195±7,1	813±37,1	78,0±2,4	893±40,0	33,5±1,0
9	49,9±4,1	207±23,0	922±101	81,9±9,8	959±122	32,7±4,1
12	40,0±2,4	189±2,3	885±35,0	74,9±1,1	925±86,3	30,2±1,3

Grafy 5 až 10 ukazují změny obsahu šesti sledovaných aminů v průběhu ročního skladování pasterovaného materiálu ze S. hnědého. Ze šesti sledovaných biogenních aminů a polyaminů vyšly statisticky významné změny obsahu pouze u PUT a SPD, ostatní změny nebyly statisticky významné.

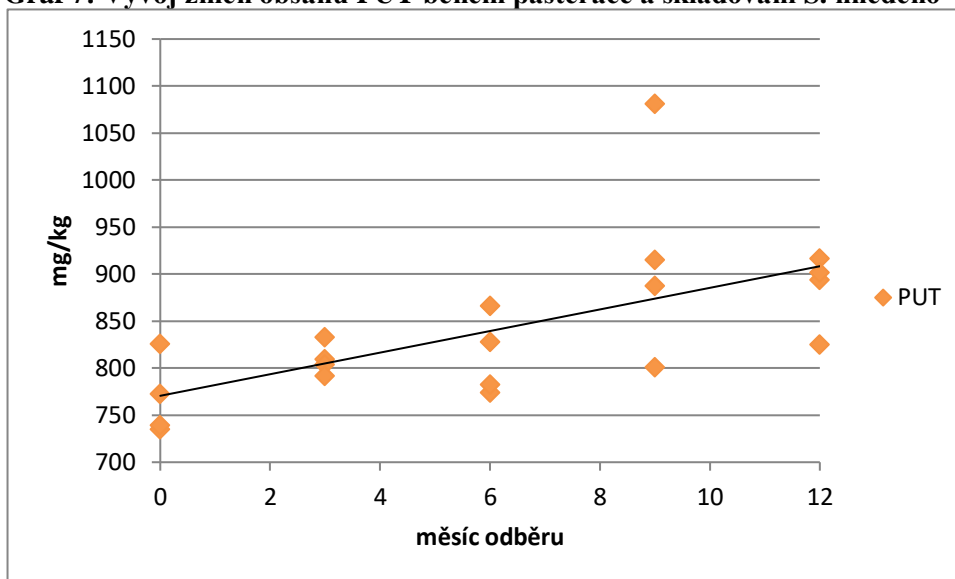
Graf 5: Vývoj změn obsahu TRM během pasterace a skladování S. hnědého



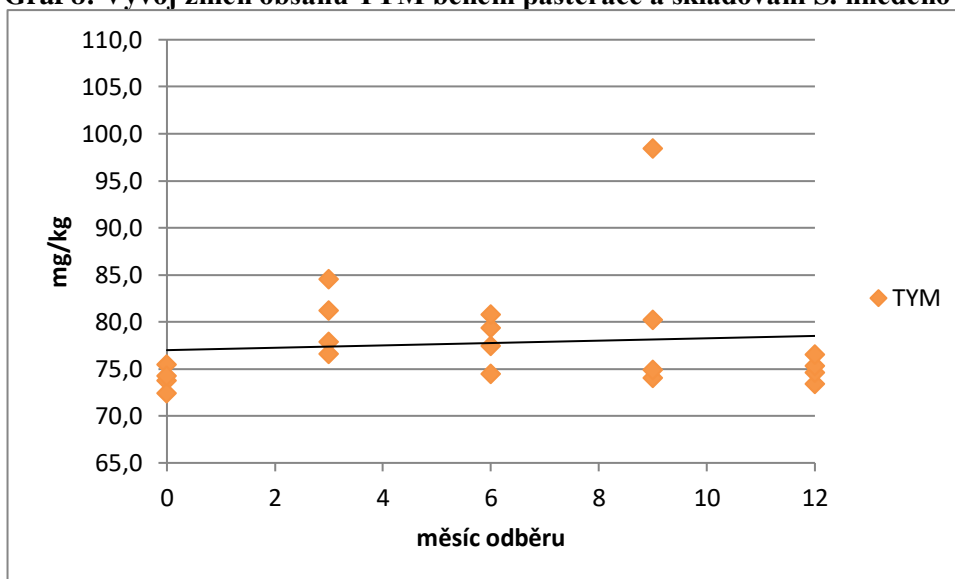
Graf 6: Vývoj změn obsahu PEA během pasterace a skladování S. hnědého



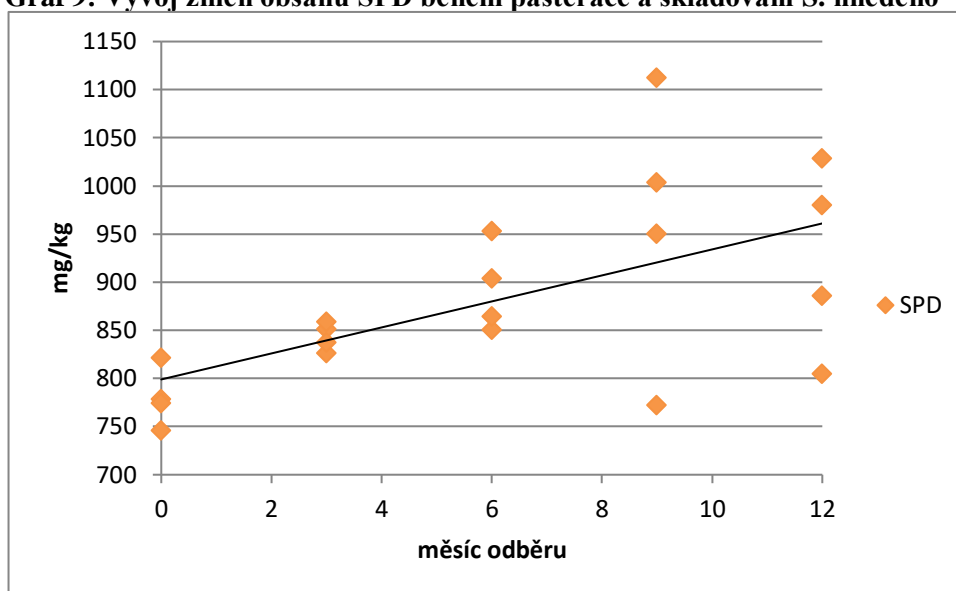
Graf 7: Vývoj změn obsahu PUT během pasterace a skladování S. hnědého



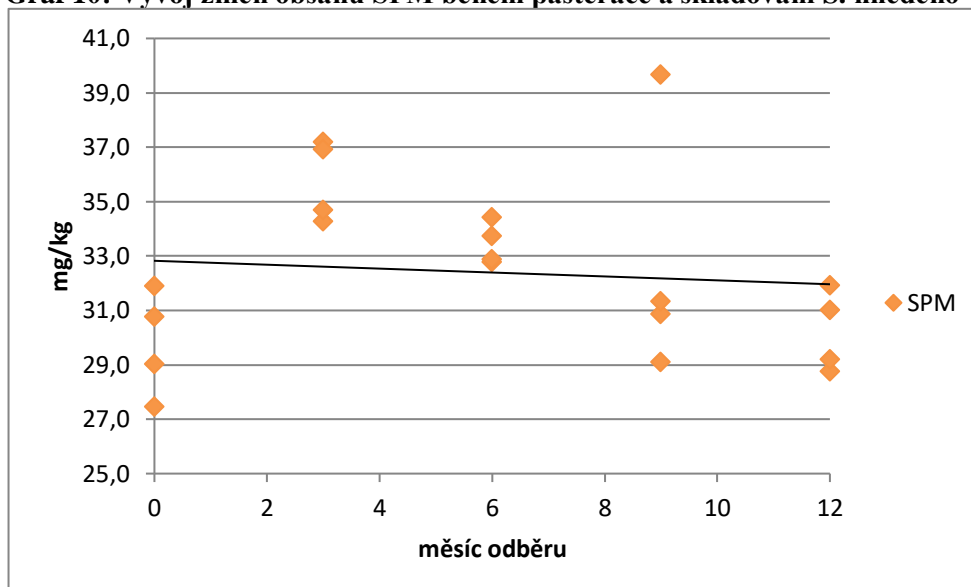
Graf 8: Vývoj změn obsahu TYM během pasterace a skladování S. hnědého



Graf 9: Vývoj změn obsahu SPD během pasterace a skladování S. hnědého



Graf 10: Vývoj změn obsahu SPM během pasterace a skladování S. hnědého



5.2 Vliv mražení a skladování na obsah BA

5.2.1 Vliv mražení a skladování na obsah BA u klouzka strakoše

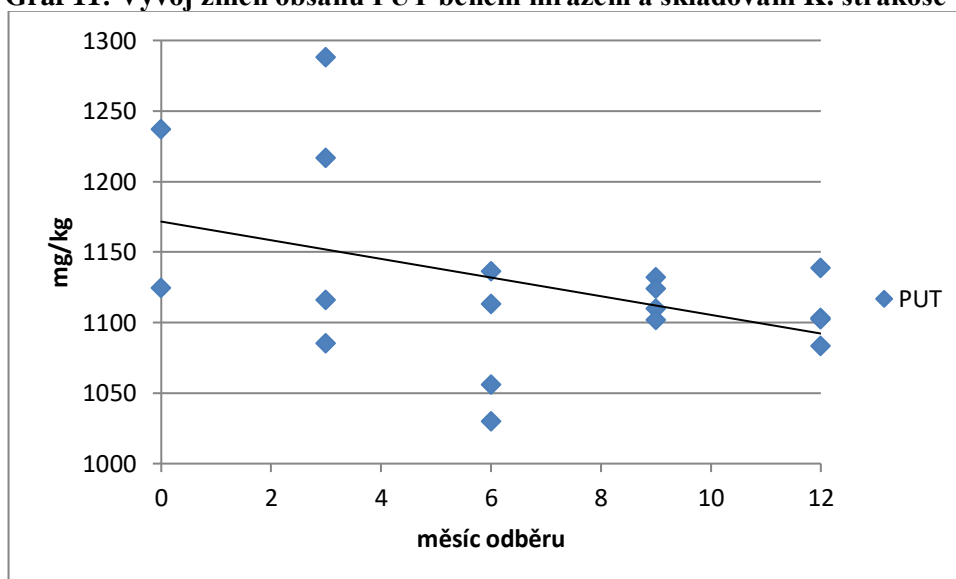
Při analýze mražených vzorků dušeného K. strakoše byly naměřeny nejvyšší hodnoty PUT, které při prvním odběru dosahovaly 1180 mg/kg a následně klesaly. Hodnoty TYM do šestého měsíce odběru klesaly a následně vzrostly na 25,1 mg/kg. SPD dosáhl nejvyšších hodnot v devátém měsíci pokusu a to 369 mg/kg. Hodnoty SPM viditelně klesaly ze 74,3 mg/kg při prvním odběru na 63,8 mg/kg při odběru posledním (viz tabulka 8).

Tabulka 8: Obsah BA a PA v mraženém vzorku K. strakoše (mg/kg)

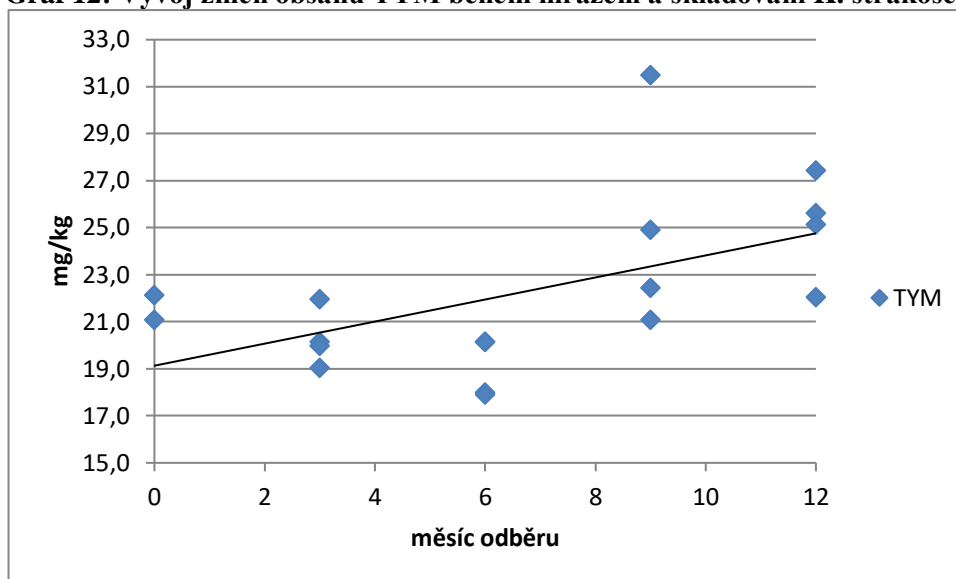
měsíc	PUT	TYM	SPD	SPM
3	1180±80,7	20,3±1,1	360±50,2	74,3±1,7
6	1100±42,7	19,0±1,1	318±15,5	68,9±5,1
9	1120±11,8	25,0±4,0	369±3,6	65,2±3,9
12	1110±19,9	25,1±1,9	358±11,8	63,8±3,5

Vývoj změn obsahů BA a PA během pokusu jsou znázorněny v grafech 11 až 14. Změny obsahu PUT a SPD vyšly statisticky nevýznamné, zatímco u SPM a TYM se statistická významnost potvrdila, stejně jako tomu bylo v případě vzorku pasterovaného.

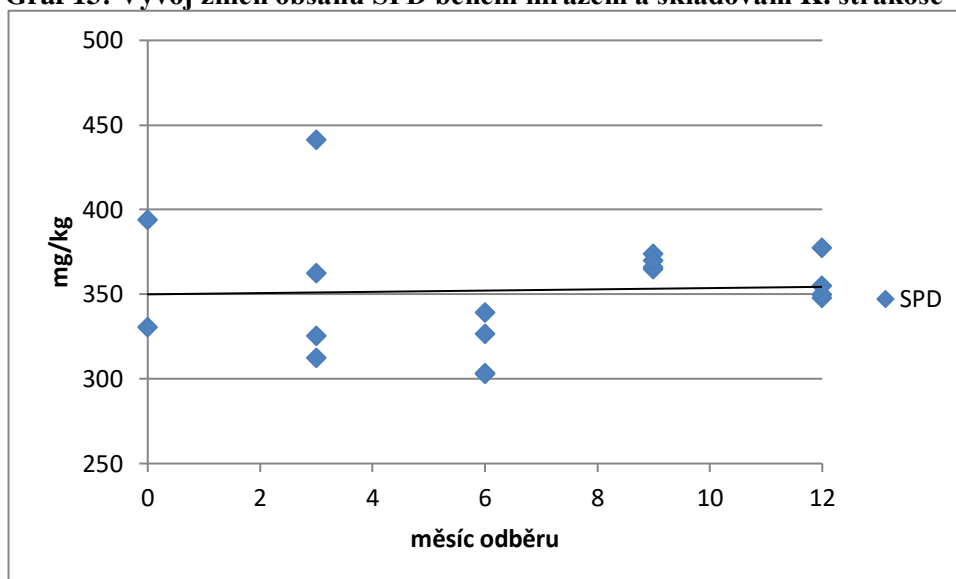
Graf 11: Vývoj změn obsahu PUT během mražení a skladování K. strakoše



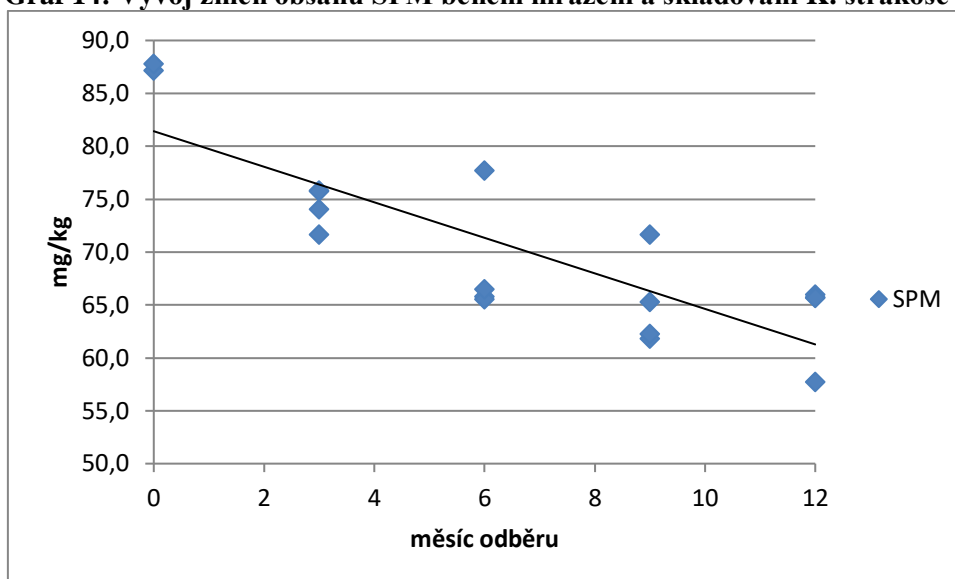
Graf 12: Vývoj změn obsahu TYM během mražení a skladování K. strakoše



Graf 13: Vývoj změn obsahu SPD během mražení a skladování K. strakoše



Graf 14: Vývoj změn obsahu SPM během mražení a skladování K. strakoše



5.2.2 Vliv mražení a skladování na obsah BA u suchohříbu hnědého

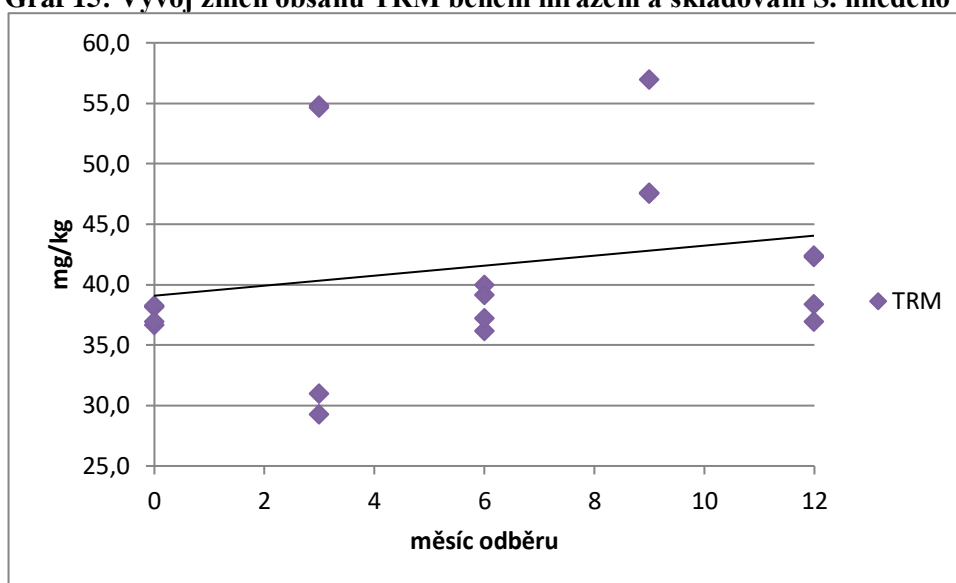
Mražené vzorky S. hnědého obsahovaly nejvyšší hodnoty SPD ve dvanáctém měsíci, kdy jeho hodnoty vzrostly ze 785 mg/kg v prvním odběru na 882 mg/kg při odběru ve dvanáctém měsíci. Druhým aminem s nejvyšším obsahem byl PUT a to 842 mg/kg ve dvanáctém měsíci, zatímco během celkového množství odběrů jeho hodnota klesala. Hodnota PEA v šestém měsíci vzrostla na 201 mg/kg a následně klesla na 185 mg/kg. Obsah TRM a SPM se postupně zvyšoval, u TRM na 66,4 mg/kg a SPM na 38,6 mg/kg (viz tabulka 9).

Tabulka 9: Obsah BA a PA v mraženém vzorku S. hnědého (mg/kg)

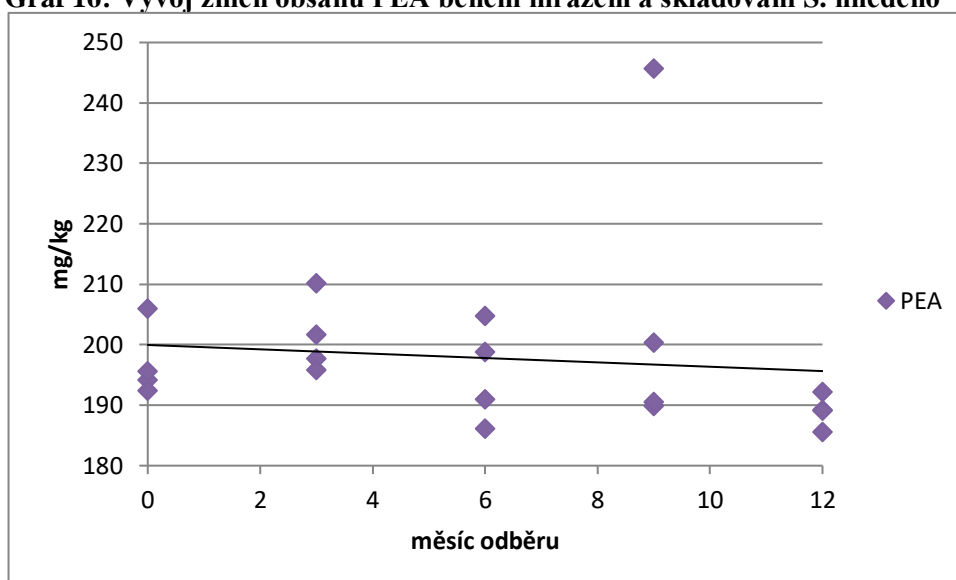
měsíc	TRM	PEA	PUT	TYM	SPD	SPM
3	55,5±1,7	195±2,5	811±16,8	80,7±3,3	785±53,7	32,5±1,6
6	55,6±1,1	201,0±4,4	804±36,0	81,6±1,6	825±49,1	30,7±1,5
9	63,9±1,2	180±1,8	795±20,3	77,3±4,1	817±25,2	35,3±5,0
12	66,4±2,5	185±5,1	842±24	79,1±2,3	882±59,0	38,6±4,5

Vývoj změn obsahů BA a PA během ročního skladování jsou znázorněny v grafech 15 až 20. Stejně jako u pasterovaného vzorku byly statisticky významné změny zjištěny pouze u PUT a SPD, zatímco změny ostatních sledovaných BA a PA nebyly statisticky významné.

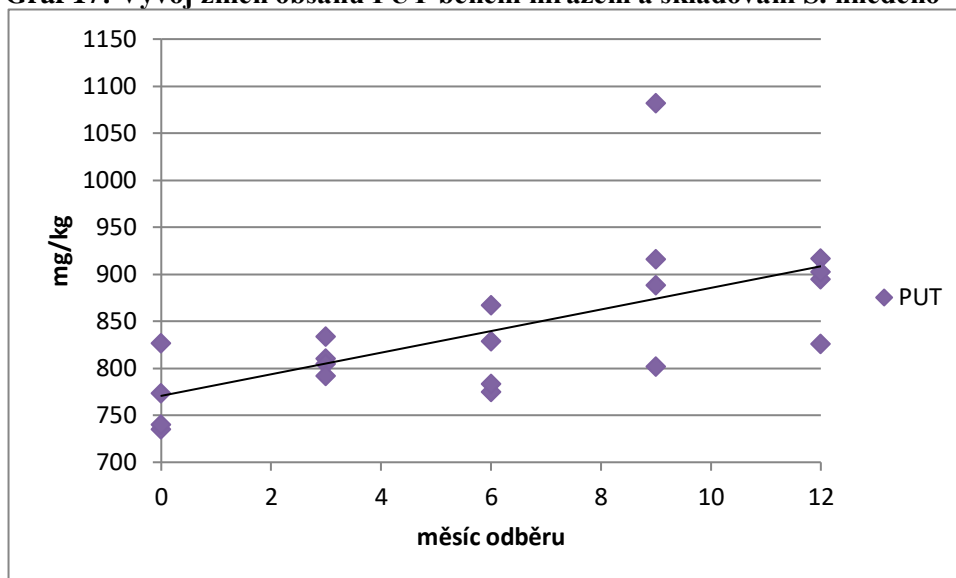
Graf 15: Vývoj změn obsahu TRM během mražení a skladování S. hnědého



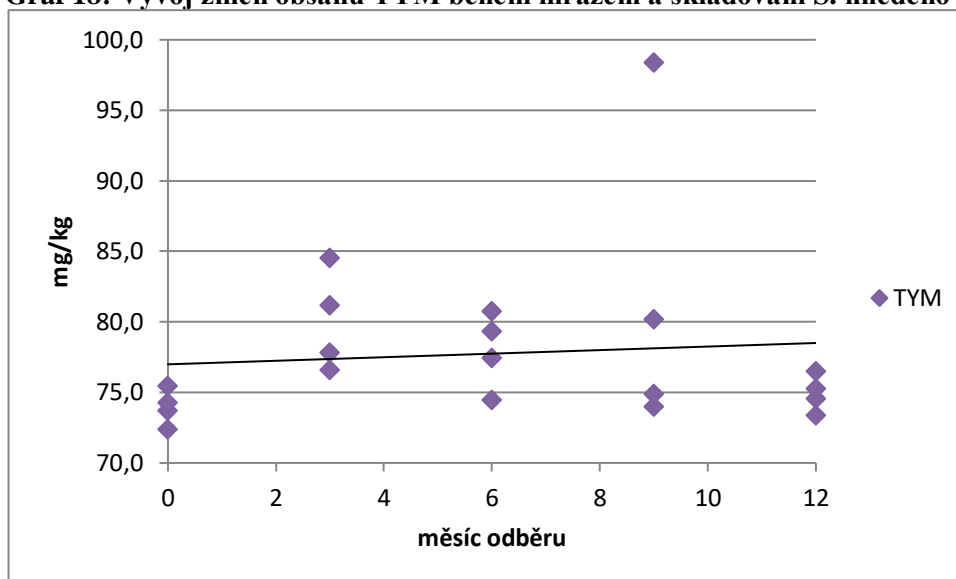
Graf 16: Vývoj změn obsahu PEA během mražení a skladování S. hnědého



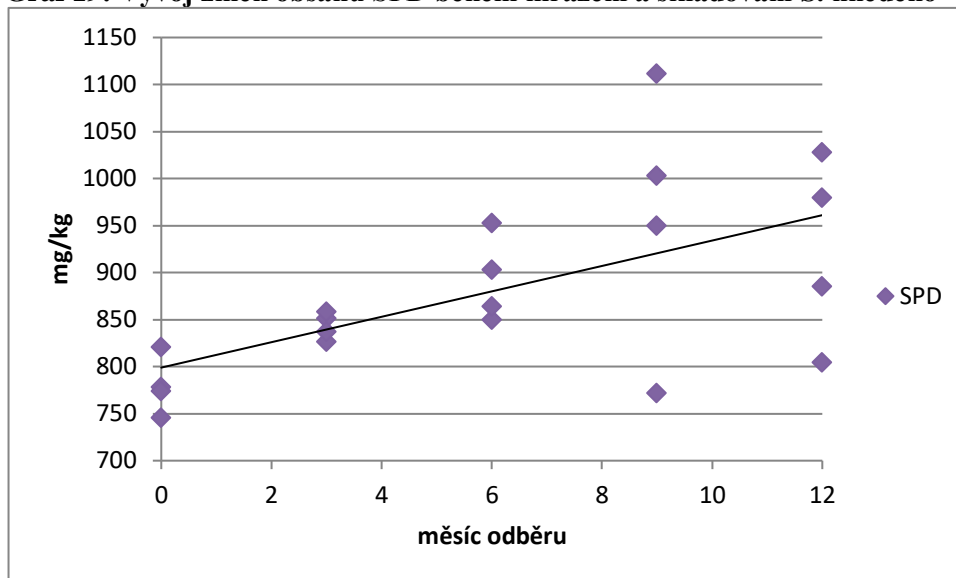
Graf 17: Vývoj změn obsahu PUT během mražení a skladování S. hnědého



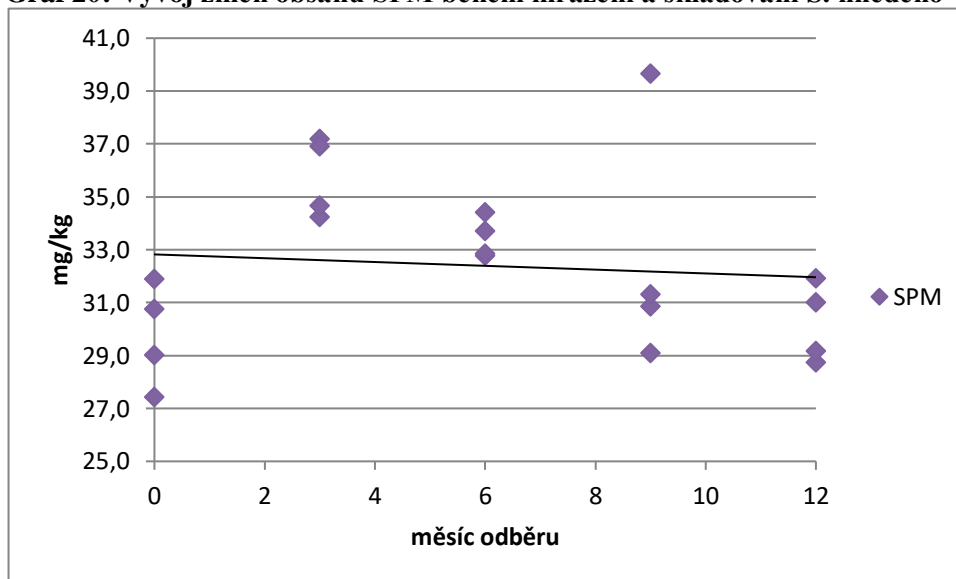
Graf 18: Vývoj změn obsahu TYM během mražení a skladování S. hnědého



Graf 19: Vývoj změn obsahu SPD během mražení a skladování S. hnědého



Graf 20: Vývoj změn obsahu SPM během mražení a skladování S. hnědého



6 Závěr

Cílem této diplomové práce bylo stanovení biogenních aminů (BA) a polyaminů (PA) metodou kapalinové chromatografie HPLC, konkrétně histaminu (HIM), tyraminu (TYM), 2 – fenylethylaminu (PEA), tryptaminu (TRM), sperminu (SPM), spermidinu (SPD) a putrescinu (PUT) v klouzku strakoši a suchohříbu hnědém. Práce byla zaměřena na vliv skladovacích podmínek a kuchyňských úprav jako pasterace a mražení používaných běžným spotřebitelem.

Podle dostupných informací získaných z literatury dosahují nejvyšších obsahů v houbách aminy PUT a SPD. Oproti tomu se aminy TRM, TYM a HIM nevyskytují téměř vůbec nebo na velmi nízkých úrovních. Více informací k obsahu BA a PA se v literatuře prozatím nevyskytuje.

Při této práci se zkoumaly jedlé houby, konkrétně klouzek strakoš a suchohřib hnědý, získané z odběrového místa Skalka, přibližně 16 km západně od Českých Budějovic. Vzorky byly analyzovány po skladování a kuchyňských úpravách, jako je pasterace a mražení.

Nejvyšší základní hodnoty K. strakoše byly naměřeny u PUT a to 1520 mg/kg. Stejně tak byly nejvyšší sledované hodnoty v základním vzorku i u TYM, SPD a SPM. Při podušení vzorku došlo k celkovému snížení obsahu BA a PA, které následovalo i během skladování, kdy hodnoty PUT klesly s mírným kolísáním na 1000 mg/kg, TYM ze základní hodnoty 26,3 mg/kg klesl na 15,5 mg/kg v devátém měsíci pokusu a následně vzrostl na 23,2 mg/kg. SPD s mírným kolísáním klesl ze 463 mg/kg na 278 mg/kg. Hodnoty SPM klesly z 94 mg/kg na 70,2 mg/kg.

Nejvyšší základní hodnoty S. hnědého byly naměřeny u PUT a to 1100 mg/kg. Nejvyšší sledované hodnoty byly v základním vzorku také u TRM, PEA, TYM, SPM, výjimkou je SPD, který dosáhl nejvyšší hodnoty 959 mg/kg v devátém měsíci skladování. Při podušení vzorku došlo k celkovému snížení obsahu BA a PA, které následovalo i během skladování, hodnoty PUT klesly s mírným kolísáním na 885 mg/kg, Hodnoty TRM klesly ze základní hodnoty 96,8 mg/kg na 40 mg/kg, PEA z 277 mg/kg na 189 mg/kg, TYM z 97,4 mg/kg s kolísáním na 74,9 mg/kg a SPM z 49,4 mg/kg na 30,2 mg/kg.

Nejvyšší hodnoty PUT v mraženém vzorku K. strakoše byly naměřeny při odběru ve třetím měsíci a to 1180 mg/kg, který následně klesl na 1110 mg/kg. Obsah TYM se během skladování zvyšoval a to z 20,3 mg/kg ze třetího měsíce skladování na 25,1 mg/kg. Pokles obsahu SPD byl během skladovací doby nepatrný a to 2 mg/kg. Obsah SPM klesl ze 74,3 mg/kg na 63,8 mg/kg.

Nejvyšší hodnoty v mraženém S. hnědém byly naměřeny u SPD a to 882 mg/kg ve dvanáctém měsíci skladování. Také obsahy TRM, PUT a SPM se během skladování zvyšovaly a to na 66,4 mg/kg pro TRM, 842 mg/kg pro PUT a 38,6 mg/kg pro SPM. Hodnoty PEA klesly ze 195 mg/kg na 185 mg/kg, pokles TYM byl během skladovací doby nepatrný a to 1,6 mg/kg.

Výsledky sledování ukazují, že ani laickými způsoby konzervace volně rostoucích hub nedochází k výraznému zvýšení obsahu biogenních aminů a polyaminů v materiálu z jedlých hub rostoucích volně.

7 Seznam použité literatury

- 1) Bamforth, C. W., Ward, R. E. (2014). The Oxford handbook of food fermentations. Oxford University Press. 805 p. ISBN: 978-0-19-974270-7.
- 2) Bardócz, S. (1995). Polyamines in food and their consequences for food quality and human health. *Trends in Food Science & Technology*, 6(10), 341-346.
- 3) Bareš, M. (2010). Současné trendy v léčbě Parkinsonovy nemoci. *Psychiatr. prax*, 11(2-3), 70-73.
- 4) Bělohávková, S., Fuchs, M. (2005). Scombroid syndrom. *Alergie*, 7(3): 230-235.
- 5) Casero, R. A. Jr., Marton, J. L. (2007). Targeting polyamine metabolism and function in cancer and other hyperproliferative diseases. *Nat Rev Drug Discov* 6:373–390
- 6) Dadáková, E., Pelikánová, T., Kalač, P. (2009). Content of biogenic amines and polyamines in some species of European wild-growing edible mushrooms. *European Food Research and Technology*, 230(1), 163-171.
- 7) Fuchs, M., Švarcová, I., Macková, L. (2011). Histaminová intolerance a snížená aktivita diaminooxidázy. *Alergie*. Vol. 13, No. 3, 229-233 s.
- 8) Fujáková, M., Kopeček, M. (2012). Antidepresiva—od teorie ke klinické praxi. *Klinická farmakologie a farmacie*, 26(1), 29-37.
- 9) Kalač, P., Krausová, P. (2005). A review of dietary polyamines: formation, implications for growth and health and occurrence in foods. *Food Chemistry*, 90(1), 219-230.
- 10) Kalač P., Křížek 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.
- 11) Kalač, P. (2008). *Houby: víme, co jíme?*. České Budějovice: Dona. ISBN: 978-80-7322-112-6.

- 12) Kalač, P. (2016). *Edible mushrooms: chemical composition and nutritional value*. Boston: Elsevier/AP, Academic Press is an imprint of Elsevier. ISBN: 978-0-12-804455-1.
- 13) Karovičová, J., Kohajdová, Z. (2005). Biogenic amines in food. *Chem. Pap.*, 59(1), 70-79.
- 14) Komprda, T., Smělá, D., Pechová, P., Kalhotka, L., Štencl, J., Klejdus, B. (2004). Effect of starter culture, spice mix and storage time and temperature on biogenic amine content of dry fermented sausages. *Meat Sci* 67(4):607–16
- 15) Ladero, V., Calles-Enriquez, M., Fernández, M., A Alvarez, M. (2010). Toxicological effects of dietary biogenic amines. *Current Nutrition & Food Science*, 6(2), 145-156.
- 16) Larqué, E., Sabater Molina, M. and Zamora, S. (2007): Biological significance of dietary polyamines. *Nutrition*, 23, 87-95.
- 17) Malone, M .H., Metcalfe, D. D.(1986). Histamine in foods: its possible role in non-allergic adverse reactions to ingestants. *N Engl Reg Allergy Proc.*; 7: 241–245
- 18) 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, S58-S65.
- 19) Moinard, C., Cynober, L., de Bandt, J. P. (2005). Polyamines: metabolism and implications in human diseases. *Clinical Nutrition*, 24(2), 184-197.
- 20) Nishimura, K., Shiina, R., Kashiwagi, K., & Igarashi, K. (2006). Decrease in polyamines with aging and their ingestion from food and drink. *Journal of biochemistry*, 139(1), 81-90.
- 21) Rauscher-Gabernig, E., Grossgut, R., Baue,r F., Paulsen, P. (2009). Assessment of alimentary histamine exposure of consumers in Austria and development of tolerable levels in typical foods. *Food Control*; 20: 423–29.

- 22) Ray, R. C., Montet, D.(2014). Microorganisms and fermentation of traditional foods. CRC Press. ISBN: 978-1-4822-2308-8.
- 23) Ruiz-Capillas, C., Jimenez-Colmenero, F. (2004). Biogenic amines in meat and meat products. *Crit Rev Food Sci Nutr* 44(7–8):489–99
- 24) Santos, M. S. (1996). Biogenic amines: their importance in foods. *International journal of food microbiology*, 29(2), 213-231.
- 25) Shalaby, A. R. (1996). Significance of biogenic amines to food safety and human health. *Food Research International*, 29(7), 675-690.
- 26) Smělá, D., Pechová, P., Komprda, T., Klejdus, B., Kubáň, V. (2004). Chromatografické stanovení biogenních aminů v trvanlivých salámech během fermentace a skladování. *Chemické Listy*, 98, 432-437.
- 27) Standarová, E., Borkovcová, I., Vorlová, L. (2008). The occurrence of biogenic amines in dairy products on the Czech market. *Acta Sci. Pol., Med. Veter.* 7 (4), 35-42.
- 28) Toninello, A., Pietrangeli, P., De Marchi, U., Salvi, M., Mondovì, B. (2006). Amine oxidases in apoptosis and cancer. *Biochim. Biophys. Acta* 1765:1–13.
- 29) Valíček, P. (2011). *Houby a jejich léčivé účinky*. Benešov: Start. ISBN: 978-80-86231-54-9.
- 30) Velíšek, J., Hajšlová, J. (2009). *Chemie potravin*. Rozš. a přeprac. 3. vyd. Tábor: OSSIS. ISBN: 978-80-86659-17-6.
- 31) Velíšek, J. (2002). *Chemie potravin*. Vyd. 2. upr. Tábor: OSSIS. ISBN: 80-86659-00-3.
- 32) Wolfová, P. *Obsah biogenních aminů a polyaminů ve volně rostoucích jedlých houbách*. České Budějovice, 2016. Bakalářská práce (Bc.). Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta, Katedra biologických disciplín. 2016-06-08.

8 Seznam grafů

Graf 1: Vývoj změn obsahu PUT během pasterace a skladování K. strakoše	43
Graf 2: Vývoj změn obsahu TYM během pasterace a skladování K. strakoše	43
Graf 3: Vývoj změn obsahu SPD během pasterace a skladování K. strakoše	44
Graf 4: Vývoj změn obsahu SPM během pasterace a skladování K. strakoše	44
Graf 5: Vývoj změn obsahu TRM během pasterace a skladování S. hnědého	46
Graf 6: Vývoj změn obsahu PEA během pasterace a skladování S. hnědého	46
Graf 7: Vývoj změn obsahu PUT během pasterace a skladování S. hnědého	47
Graf 8: Vývoj změn obsahu TYM během pasterace a skladování S. hnědého	47
Graf 9: Vývoj změn obsahu SPD během pasterace a skladování S. hnědého	48
Graf 10: Vývoj změn obsahu SPM během pasterace a skladování S. hnědého ...	48
Graf 11: Vývoj změn obsahu PUT během mražení a skladování K. strakoše	49
Graf 12: Vývoj změn obsahu TYM během mražení a skladování K. strakoše	50
Graf 13: Vývoj změn obsahu SPD během mražení a skladování K. strakoše	50
Graf 14: Vývoj změn obsahu SPM během mražení a skladování K. strakoše	51
Graf 15: Vývoj změn obsahu TRM během mražení a skladování S. hnědého	52
Graf 16: Vývoj změn obsahu PEA během mražení a skladování S. hnědého	52
Graf 17: Vývoj změn obsahu PUT během mražení a skladování S. hnědého	53
Graf 18: Vývoj změn obsahu TYM během mražení a skladování S. hnědého	53
Graf 19: Vývoj změn obsahu SPD během mražení a skladování S. hnědého	54
Graf 20: Vývoj změn obsahu SPM během mražení a skladování S. hnědého	54

9 Seznam tabulek

Tabulka 1: Biogenní aminy, jejich prekurzory, produkty transformace a biologický význam (Velíšek and Hajšlová, 2009)	16
Tabulka 2: Obsah biogenních aminů a polyaminů v potravinách – živočišné produkty (Velíšek and Hajšlová, 2009)	21
Tabulka 3: Obsah biogenních aminů a polyaminů v potravinách – rostlinné produkty (Velíšek and Hajšlová, 2009)	22
Tabulka 4: Mikroorganismy produkující BA a PA podle Shalaby (1997):	24
Tabulka 5: Meze stanovitelnosti aminů v sušině (mg/kg)	40
Tabulka 6: Obsah BA a PA v pasterovaném K. strakoši (mg/kg)	42
Tabulka 7: Obsah BA a PA v pasterovaném S. hnědém (mg/kg)	45
Tabulka 8: Obsah BA a PA v mraženém vzorku K. strakoše (mg/kg)	49
Tabulka 9: Obsah BA a PA v mraženém vzorku S. hnědého (mg/kg)	51