

**MENDELOVA UNIVERZITA V BRNĚ
AGRONOMICKÁ FAKULTA**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BRNO 2016

KRISTÝNA BUBELOVÁ

Mendelova univerzita v Brně
Agronomická fakulta
Ústav technologie potravin



**Agronomická
fakulta**

**Mendelova
univerzita
v Brně**



**Biogenní aminy ve fermentovaných mléčných
výrobcích**

Bakalářská práce

Vedoucí práce:
prof. MVDr. Ing. Tomáš Komprda, CSc.

Vypracovala:
Kristýna Bubelová

Brno 2016

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem práci: „Biogenní aminy ve fermentovaných mléčných výrobcích“ vypracovala samostatně a veškeré použité prameny a informace uvádím v seznamu použité literatury. Souhlasím, aby moje práce byla zveřejněna v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách ve znění pozdějších předpisů a v souladu s platnou *Směrnici o zveřejňování vysokoškolských závěrečných prací*.

Jsem si vědoma, že se na moji práci vztahuje zákon č. 121/2000 Sb., autorský zákon, a že Mendelova univerzita v Brně má právo na uzavření licenční smlouvy a užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona.

Dále se zavazuji, že před sepsáním licenční smlouvy o využití díla jinou osobou (subjektem) si vyžádám písemné stanovisko univerzity, že předmětná licenční smlouva není v rozporu s oprávněnými zájmy univerzity, a zavazuji se uhradit případný příspěvek na úhradu nákladů spojených se vznikem díla, a to až do jejich skutečné výše.

V Brně dne:.....

.....

podpis

Poděkování:

Děkuji vedoucímu bakalářské práce prof. MVDr. Ing. Tomáši Komprdovi, CSc. za cenné rady a připomínky, ochotnou pomoc a literární prameny, které mi během zpracování této bakalářské práce poskytl.

ABSTRAKT

Tato bakalářská práce je zaměřena na biogenní aminy ve fermentovaných mléčných výrobcích, zejména v sýrech. Biogenní aminy jsou nízkomolekulární dusíkaté báze vznikající zejména dekarboxylací volných aminokyselin působením bakteriálních dekarboxylačních enzymů. Nejvýznamnější bakterie tvořící biogenní aminy v sýrech jsou součástí kontaminující mikroflóry (např. *Enterococcus*) i startovacích kultur (např. *Lactobacillus*). V sýrech se nejvíce vyskytuje histamin, tyramin, kadaverin, putrescin. Dále jsou v práci popsány účinky, faktory ovlivňující výskyt a metody stanovení.

Klíčová slova: biogenní aminy, zrající sýry, histamin, tyramin

ABSTRACT

This bachelor thesis is focused on biogenic amines in fermented dairy products, particularly in cheeses. Biogenic amines are low molecular weight nitrogenous base formed mainly by decarboxylation of free amino acids by treatment with bacterial decarboxylation enzymes. The most important bacteria forming biogenic amines in cheese are part of contaminating microflora (e.g. *Enterococcus*) and starter cultures (e.g. *Lactobacillus*). The cheeses are most prone to histamine, tyramine, cadaverine, putrescine. Furthermore, the work described effects, factors affecting the incidence and methods of determination.

Keywords: biogenic amines, ripened cheese, histamine, tyramin

OBSAH

1	ÚVOD	8
2	CÍL PRÁCE	9
3	LITERÁRNÍ PŘEHLED	10
3.1	Charakteristika biogenních aminů	10
3.1.1	Chemická struktura biogenních aminů	11
3.1.2	Vznik biogenních aminů	12
3.1.3	Výskyt biogenních aminů	13
3.1.3.1	Nefermentované potraviny	13
3.1.3.2	Fermentované potraviny	14
3.1.4	Obecné faktory ovlivňující výskyt biogenních aminů	15
3.1.5	Prevence rizik z biogenních aminů	16
3.2	Význam biogenních aminů	16
3.2.1	Fyziologický význam biogenních aminů	16
3.2.2	Toxikologický význam biogenních aminů	18
3.2.2.1	Detoxifikační mechanismus odbourávající biogenní aminy	18
3.2.2.2	Toxické účinky tyraminu	19
3.2.2.3	Toxické účinky histaminu	19
3.2.2.4	Toxické dávky biogenních aminů	20
3.2.3	Hygienický význam biogenních aminů	21
3.3	Biogenní aminy ve zrajících sýrech	21
3.3.1	Faktory ovlivňující obsah biogenních aminů v sýrech	23
3.3.2	Mikroorganismy podílející se na tvorbě biogenních aminů	25
3.3.2.1	Kontaminující mikroflóra	25
3.3.2.2	Startovací mikroflóra	25
3.4	Legislativa	26
3.5	Stanovení biogenních aminů	27
3.5.1	Obecné schéma stanovení biogenních aminů a polyaminů	27
3.5.1.1	Extrakce	27
3.5.1.2	Derivatizace	28
3.5.1.3	Separace	29
3.5.1.4	Detekce	29

3.5.1.5	Vyhodnocení dat	30
3.5.2	Metody izolace mikroorganismů	30
4	ZÁVĚR	33
5	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	34
6	SEZNAM ZKRATEK	37
7	SEZNAM TABULEK	39
8	SEZNAM OBRÁZKŮ	39

1 ÚVOD

Téma bakalářské práce Biogenní aminy ve fermentovaných mléčných výrobcích se zabývá popisem biogenních aminů, jejich výskytem a faktory ovlivňující výskyt, významnými účinky, mikroorganismy podílejícími se na jejich tvorbě a samotným stanovením.

Biogenní aminy jsou velice významná chemická nebezpečí z hlediska hygieny potravin. Vznikají mikrobiální činností a jsou přirozenou složkou téměř všech potravin. Mají mnoho prospěšných fyziologických funkcí. Jsou např. zdrojem dusíku v různých biochemických reakcích, slouží jako prekurzory hormonů, nukleových kyselin nebo proteinů, některé mají význam při regulaci buněčného růstu. Na druhou stranu mají i toxické účinky. Z hlediska toxických účinků je nejvýznamnější histamin, tyramin a fenylethylamin. Obecně se projevují jako látky psychoaktivní, kdy působí na centrální nervový systém a vasoaktivní, kdy působí na cévní systém. Biogenní aminy mají i hygienický význam. Slouží jako indikátory stupně kažení potravin.

Jejich obsah je ovlivněn mnoha faktory, z nichž nejdůležitější je dostupnost substrátu, teplota, pH, přítomnost soli, přístupnost kyslíku, doba skladování výrobku, úroveň hygieny, přítomnost startovací kultury s dekarboxylázovou aktivitou.

Člověk má vyvinut detoxifikační mechanismus v podobě enzymů aminooxidáz, které oxidují aminy, a tím je odbourávají. Tyto mechanismy jsou u každého jedince jinak úspěšně. Jsou nedostatečné u alergiků, pacientů užívajících léky s inhibitory těchto enzymů, při nadbytku aminů v potravě.

Mikroorganismy, které se podílejí na tvorbě biogenních aminů mohou být součástí kontaminující mikroflóry nebo startovacích kultur. Proti působení kontaminující mikroflóry se zavádějí hygienická opatření. Startovací kultury se kontrolují na dekarboxylázovou aktivitu a na výrobu fermentovaných výrobků se vybírají ty kultury, které dekarboxylázovou aktivitu nemají.

Stanovení biogenních aminů je analyticky náročné vzhledem k vysokým požadavkům na citlivost a přesnost. K nejpoužívanějším metodám patří vysokoúčinná kapalinová chromatografie. Součástí analytických metod bývají i mikrobiologické analýzy.

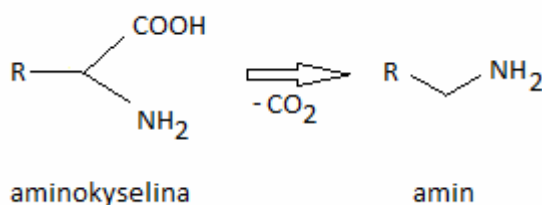
2 CÍL PRÁCE

Cílem této bakalářské práce bylo popsat vznik biogenních aminů, jejich výskyt v potravinách a nevýznamnější faktory. Dále zabývat se účinky jak fyziologickými, tak toxickými. V neposlední řadě podrobněji popsat biogenní aminy nacházející se v sýrech, popsat metody jejich stanovení a zabývat se toxickými dávkami a legislativními limity.

3 LITERÁRNÍ PŘEHLED

3.1 Charakteristika biogenních aminů

Biogenní aminy (BA) jsou nízkomolekulární bazické dusíkaté látky, které vznikají v potravinách a potravinových surovinách nejčastěji dekarboxylací aminokyselin (obrázek č. 1) působením bakteriálních dekarboxylačních enzymů (Komprda, 2004). Substrátem těchto mikrobiálních enzymů jsou volné aminokyseliny, které se vytvoří proteolýzou (Toldrá, 2007). Z pohledu obecné hygieny potravin řadíme BA mezi chemická nebezpečí (látky vznikající mikrobiální činností – látky přirozeně se vyskytující; Komprda, 2004).



Obrázek č. 1: Dekarboxylace aminokyselin (upraveno dle Velíšek a Hajšlová, 2009a)

BA se nazývají biogenní, protože jsou to biologicky aktivní sloučeniny odvozené od aromatických, heterocyklických a bazických aminokyselin. Rozlišujeme endogenní a exogenní BA.

Endogenní BA jsou přirozenou složkou prakticky všech potravin, jsou produkty metabolismu a nachází se v nízkých koncentracích (Velíšek a Hajšlová, 2009a). Jsou přenášeny lokálně nebo krevním systémem (Velíšek a Cejpek, 2008). Vznikají pomocí endogenních dekarboxylázových enzymů, které jsou přirozeně přítomné v potravine (Flick a Ankenman Granata, 2005).

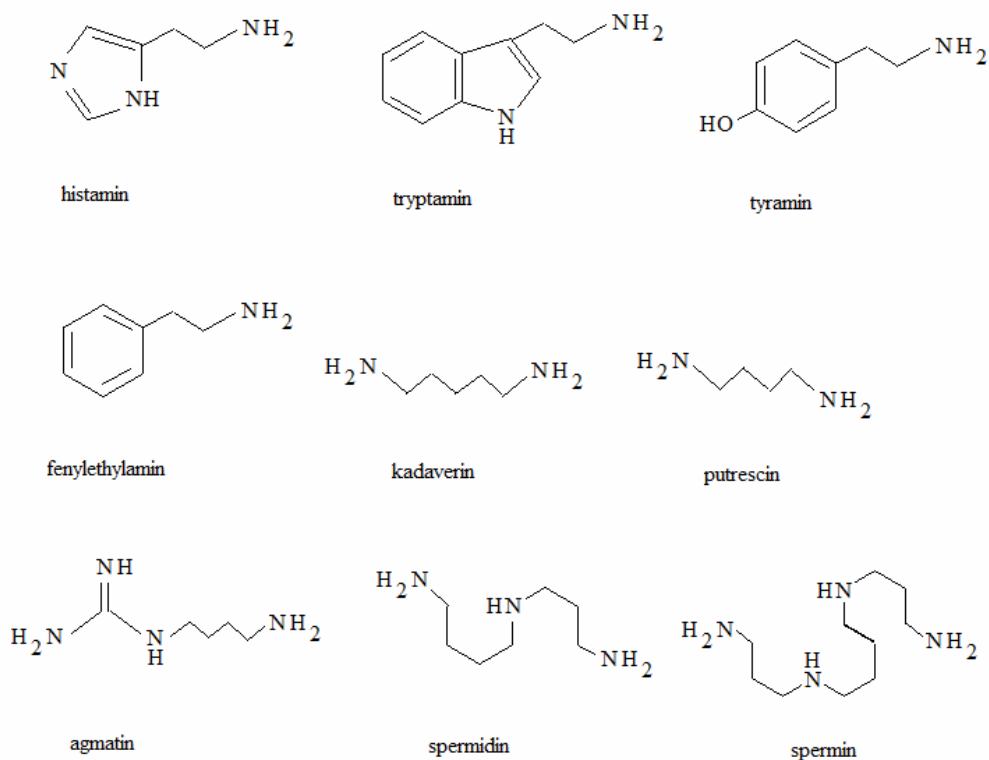
Exogenní BA vznikají v potravinách v důsledku mikrobiální kontaminace a při fermentaci (Velíšek a Hajšlová, 2009a). Přímou se absorbují z potravy ve střevech (Velíšek a Cejpek, 2008). Vznikají pomocí exogenních dekarboxylázových enzymů, které jsou produkovány mikroflórou potravy. Vznik BA endogenní cestou je zanedbatelný ve srovnání s exogenní cestou (Flick a Ankenman Granata, 2005).

3.1.1 Chemická struktura biogenních aminů

Podle chemické struktury (obrázek č. 2) se alimentárně významné BA dělí na:

- Alifatické – kadaverin (CAD), putrescin (PUT), spermidin (SPD), spermin (SPM), agmatin (AGM)
- Aromatické – tyramin (TYR), fenylethylamin (PEA)
- Heterocyklické – histamin (HIS), tryptamin (TRY; Komprda, 2004)

PUT, SPD, SPM, AGM jsou v jiném úhlu pohledu také označovány jako polyaminy (PA; Komprda, 2004). PUT a CAD jsou diaminy, ale z těchto dvou diaminů je jako polyamin z biologického hlediska označován jenom PUT, protože je přímým meziproduktem syntézy spermidinu a sperminu (Komprda, 2005). PA jsou odlišná skupina vzhledem k biochemickým a toxikologickým důvodům (Komprda a Dohnal, 2010).



Obrázek č. 2: Chemická struktura BA (upraveno dle Velíšek a Hajšlová, 2009b)

3.1.2 Vznik biogenních aminů

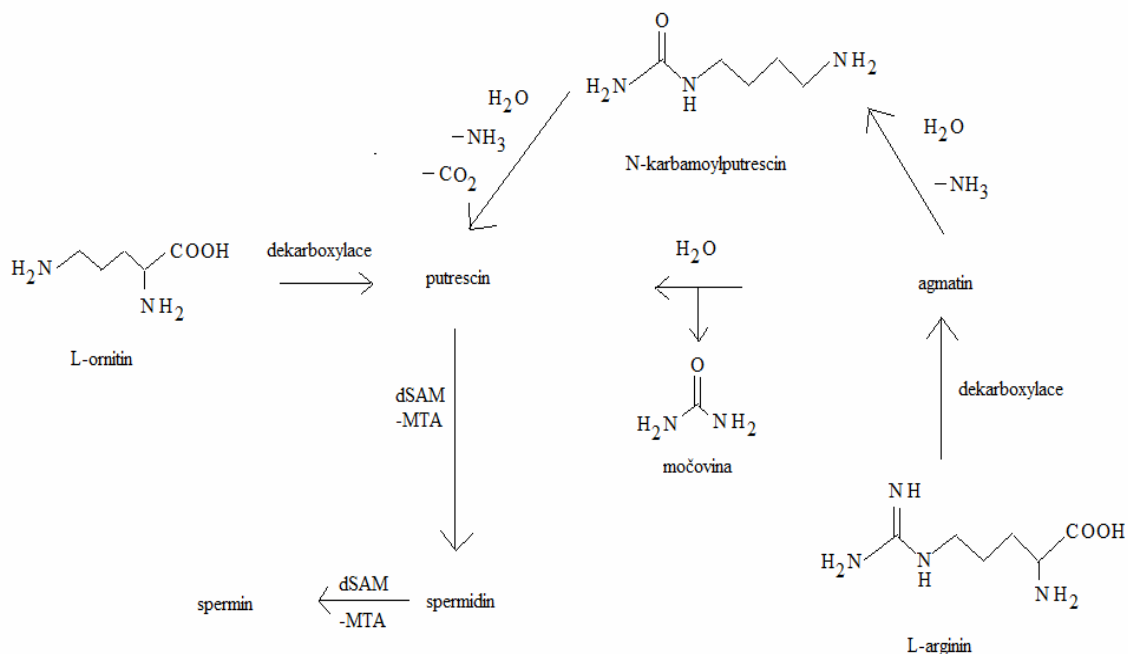
Základní podmínky vzniku BA:

- Obsah aminokyselin v substrátu
- Obsah mikroorganismů, které jsou vybavené dekarboxylázovou aktivitou
- Vhodné podmínky pro růst a množení mikroorganismů (Komprda, 2004)

Prekurzory nejdůležitějších BA jsou následující:

- Histidin → HIS
- Tyrosin → TYR
- Tryptofan → TRY
- Lysin → CAD
- Ornitin → PUT, SPD, SPM (Komprda, 2004)

HIS vzniká z histidinu pomocí histidindekarboxylázy. PEA vzniká z fenylalaninu pomocí fenylalanindekarboxylázy. TYR vzniká z tyrosinu pomocí tyrosindekarboxylázy. TRY vzniká z tryptofanu pomocí dekarboxylázy aromatických aminokyselin (tryptofandekarboxyláza). Dopamin vzniká z 3,4-dihydroxyalaninu (DOPA) také pomocí dekarboxylázy aromatických aminokyselin (dopadekarboxyláza). CAD vzniká z lysinu pomocí lysindekarboxylázy (Velíšek a Hajšlová, 2009b). PUT může být vytvořen buď přímo z ornitinu pomocí ornitindekarboxylázy, nebo nepřímo z argininu pomocí arginindekarboxylázy. Nepřímou cestou vzniká z argininu AGM, který je pak transformován do PUT působením agmatinázy (Velíšek a Cejpek, 2008). Ornitin se tvoří z argininu pomocí arginázy (Velíšek a Hajšlová, 2009b). SPD a SPM vznikají z PUT (Velíšek a Cejpek, 2008). Biosyntézu SPD a SPM (obrázek č. 3) katalyzuje spermidinsyntáza a sperminsyntáza za účasti S-adenosyl-L-methioninu (SAM). Dekarboxylací SAM vzniká S-adenosyl-L-methioninamid (dSAM), který poskytuje trimethylenaminový zbytek pro biosyntézu a vzniká S-methyl-5'-thioadenosin (MTA; Velíšek a Hajšlová, 2009b).



Obrázek č. 3: Biosyntéza SPD a SPM (upraveno dle Velíšek a Hajšlová, 2009b)

3.1.3 Výskyt biogenních aminů

Biogenní aminy můžeme najít téměř ve všech potravinách jako běžné produkty metabolických procesů (Velíšek a Cejpek, 2008). Větší výskyt lze předpokládat ve fermentovaných potravinách, protože většinou vznikají působením bakteriálních dekarboxyláz.

Z hlediska výskytu BA potraviny dělíme:

- Fermentované
- Nefermentované (Komprda, 2004)

3.1.3.1 Nefermentované potraviny

V nefermentovaných potravinách vznikají BA především díky hnilobným bakteriím (Kalač a Křížek, 2005).

Mezi nefermentovanými potravinami je největší výskyt u **ryb**, především u makrelovitých (Komprda, 2004). Obsahují především HIS, AGM, TYR, TRY (Velíšek a Cejpek, 2008). Průměrný obsah HIS ve svalovině ryb je asi 1 – 15 mg/100 g, ve špatně skladovaném produktu se může hodnota zvýšit až na 100 mg/kg. Takový produkt je

značně toxický a otravu tímto produktem nazýváme skombrotoxicitu (Komprda, 2004). V zemích s vysokou konzumací mořských ryb je otrava HIS nejběžnější otravou z potravin (Křížek a Kalač, 1998).

Výskyt malých množství (kolem 1 mg/100 g) lze předpokládat také v **mase**, **mléce**, některé **zelenině** (rajčata) a **ovoci** i **ovocných šťávách**, **čokoládě** a **houbách** (Komprda, 2004). V čokoládě se vyskytuje především PEA (Velíšek a Cejpek, 2008).

3.1.3.2 *Fermentované potraviny*

Ve fermentovaných potravinách vznikají BA především díky bakteriím mléčného kvašení (Kalač a Křížek, 2005).

Sýry. Jsou druhou nejdůležitější skupinou potravin z hlediska vysokého výskytu toxikologicky významných BA. Zrající sýry mohou obsahovat stovky až tisíce mg celkových BA/100 g (především TYR, PUT, CAD, HIS; Komprda, 2005).

Fermentované masné výrobky. V těchto výrobcích bývá celkový obsah BA jednotky až desítky mg/100 g. Kvantitativně nejvýznamnější BA bývá TYR. Obsah ovlivňují následující faktory: zacházení se surovinami, výběr startovací kultury, metody zpracování daného výrobku (Komprda, 2005) (fermentace bez přídavku cukru, aditivní látky; Komprda, 2004 nebo průměr salámu – čím vyšší průměr, tím vyšší obsah BA; Bover-Cid et al., 1999), teplota zrání a skladování, doba zrání a skladování (obsah BA narůstá s dobou zrání i skladování; Komprda, 2004).

Fermentované nápoje. Zde vznikají BA až v průběhu fermentace, protože obsah ve výchozích surovinách je nízký. V evropských pivech se celkový obsah BA pohybuje v jednotkách až desítkách mg/l (Komprda, 2004). V alkoholických nápojích se nejčastěji vyskytuje HIS, TYR, TRY, PEA; konkrétně víno obsahuje TYR, HIS, PEA (Velíšek a Cejpek, 2008).

Fermentované zeleniny. U nás je relativně nejrizikovější potravinou kysané zelí, zvláště spontánně fermentované, které může obsahovat desítky mg BA/100 g (Komprda, 2004). V zelí se nejčastěji vyskytuje HIS, TYR, PEA (Velíšek a Cejpek, 2008).

3.1.4 Obecné faktory ovlivňující výskyt biogenních aminů

Značné kolísání obsahů BA je charakteristické v závislosti na různých faktorech (Velíšek a Hajšlová, 2009b).

Nejdůležitější faktory ovlivňující aktivitu mikrobiálních dekarboxylačních enzymů a tím výskyt samotných BA:

- Dostupnost substrátu
- Teplota
- pH
- Přítomnost soli
- Přístupnost kyslíku
- Doba skladování výrobku
- Hygiena
- Startovací kultury (Komprda, 2004)

Aktivita mikrobiálních dekarboxylačních enzymů je ovlivněna obsahem volných aminokyselin a cukrů v substrátu. Optimální koncentrace glukosy je 0,5 – 2 %. Teplota výrazně ovlivňuje vznik BA. Např. HIS se tvoří řádově méně při 5 °C než při 20 °C. Optimální pH pro mikroorganismy s dekarboxylázovou aktivitou je 4 – 5,5. Sůl obecně inhibuje tvorbu BA, ale HIS nebo TYR může působit na některé bakterie osmoprotektivně, což způsobí zvýšení tvorby BA v přítomnosti NaCl. Přístup ke kyslíku je jednoznačný faktor, protože na tvorbě BA se podílí bakterie jak aerobní, tak anaerobní a fakultativně anaerobní. Jednoznačný faktor je doba skladování výrobku, kdy s delší dobou skladování se obsah BA v potravině zvyšuje. Obsah BA je výrazně ovlivněn hygienickým získáváním surovin a jejich zpracováním. Při výrobě fermentovaných potravin se musí vybírat startovací kultury bez dekarboxylázové aktivity (Komprda, 2004).

3.1.5 Prevence rizik z biogenních aminů

Prevenci rizik lze shrnout v následujících doporučeních:

- Hygienické zacházení a skladování se surovinami a finálními výrobky
- Správný výběr startovacích kultur bez dekarboxylázové aktivity
- Kratší doba fermentace
- Doporučení pro rizikové skupiny konzumentů
- Zavedení hygienických limitů (Komprda, 2005)

Mezi rizikové skupiny konzumentů patří alergici a pacienti užívající léky s inhibitory monooxidáz (Komprda, 2005). Odstranění již jednou vzniklých BA z potraviny je velmi obtížné. K částečnému snížení může docházet v tepelně opracovaných výrobcích (Velíšek a Hajšlová, 2009b). Histamin není ničen vařením (Moy, 2009). Některé bakterie jsou naopak schopny vytvořit BA ve skladované potraviny rozkládat. Mezi takové patří *Pseudomonas* ssp., *Serratia mercenscens*, *Sarcina lutea* (Komprda, 2004).

3.2 Význam biogenních aminů

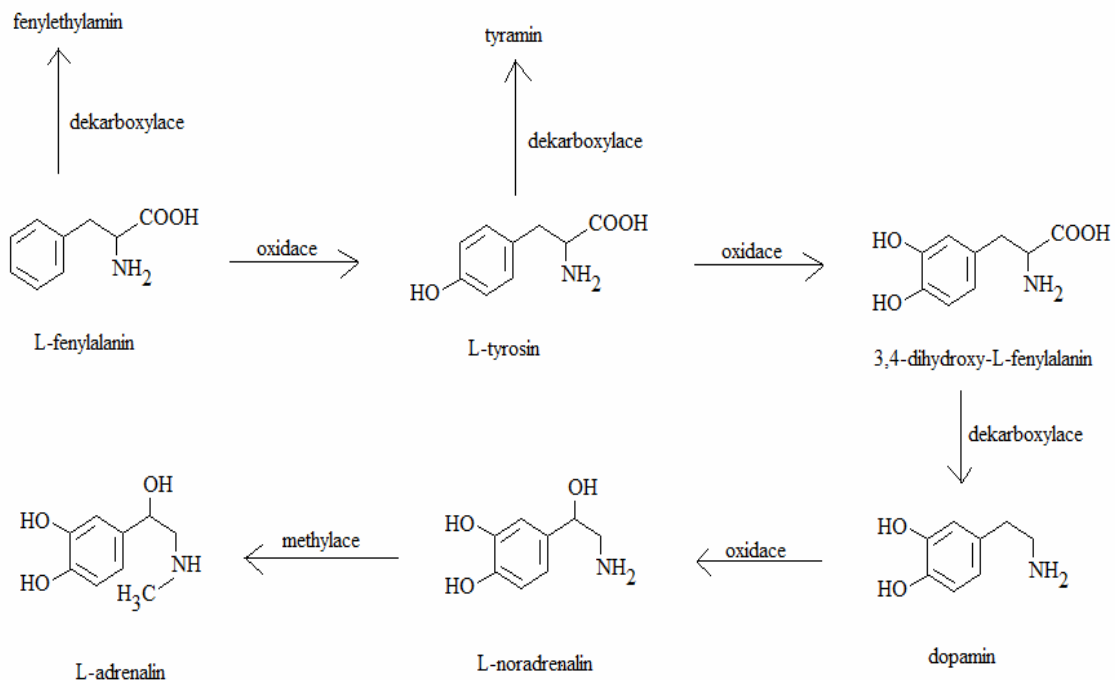
3.2.1 Fyziologický význam biogenních aminů

Některé BA mají významné fyziologické funkce v organismu živočichů a lidí. Bývají zdrojem dusíku v různých biochemických reakcích, slouží jako prekurzory hormonů, nukleových kyselin nebo proteinů, mohou spoluvytvářet aroma výsledného produktu (Komprda, 2004). HIS se např. účastní imunologických reakcí organismu (Velíšek a Hajšlová, 2009a). Dále má HIS regulující fyziologickou funkci a působí jako neurotransmitér tkáňových hormonů (Velíšek a Cejpek, 2008).

PA mají význam při regulaci buněčného růstu, hlavně při diferenciaci a růstu buněk střevní tkáně a v rámci metabolické aktivity střeva (Komprda, 2004). Jejich zvýšený příjem je žádoucí při hojení ran, popálenin, ale nežádoucí u osob s onkologickým onemocněním (Velíšek a Hajšlová, 2009b). Spolupůsobí při vychytávání volných radikálů (Komprda, 2005). V lidském těle se PA nachází ze 3 zdrojů:

vzniklé vlastní biosyntézou z aminokyselin, produkované střevními bakteriemi, přijaté potravou (Kalač a Křížek, 2005).

Svou strukturou patří mezi BA také katecholaminy adrenalin, noradrenalin (Komprda, 2004) a dopamin (Velíšek a Cejpek, 2008). Katecholaminy vznikají z PEA (Velíšek a Hajšlová, 2009a). Hydroxylací dopaminu pomocí dopamin- β -monoxygenázy vzniká noradrenalin, který se methyluje na adrenalin pomocí noradrenalin-N-methyltransferázy. Průběh biosyntézy (obrázek č. 4) závisí na dostupnosti enzymů, které se podílejí na přeměně PEA a meziproductů na uváděné katecholaminy. Katecholaminy jsou hormony, které se produkují v nadledvinách v stresových situacích (psychický stres, nízká hladina cukru v krvi, apod.; Velíšek a Cejpek, 2008). Noradrenalin je mediátorem v rámci sympatického nervového systému. Adrenalin je důležitým hormonem dřeně nadledvin. Má účinek na hladkou svalovinu krevních cév: dilatace v kosterní svalovině, konstrikce ve střevě (Komprda, 2004). Celkově převládá u adrenalinu účinek vazodilatační, u noradrenalinu vazokonstrikční (Komprda, 2005). Adrenalin má za následek zvýšení srdeční funkce a zvýšení hladiny krevní glukosy (Komprda, 2004).



Obrázek č. 4: Biosyntéza katecholaminů (upraveno dle Velíšek a Hajšlová, 2009b)

3.2.2 Toxikologický význam biogenních aminů

BA mohou být prekurzory karcinogenních N-nitrososloučenin. Především sekundární aminy (R-NH-R; Komprda, 2004), jako například PUT a CAD (Flick a Ankenman Granata, 2005), vytvářejí stabilní a tedy nebezpečné produkty, na rozdíl od primárních aminů (R-NH₂; Komprda, 2004).

Výraznější nepříznivé účinky na organismus mají HIS, TYR a PEA (Velíšek a Hajšlová, 2009b). PEA zvyšuje krevní tlak (Kalač a Křížek, 2005). Nepříznivé účinky ostatních BA jsou založeny na tom, že zesilují účinky TYR nebo HIS (Komprda a Dohnal, 2010). BA se mohou se projevovat jako látky psychoaktivní a vasoaktivní. Psychoaktivní aminy působí na centrální nervový systém a vasoaktivní aminy působí na vaskulární systém. Vasoaktivní aminy podle účinky dělíme na vasokontraktibilní (HIS) a vasodilatační (TYR; Velíšek a Hajšlová, 2009b).

Obecné symptomy vyšších dávek BA jsou zvracení, pocení, dýchací potíže, hypotenze nebo hypertenze, bušení srdce, migrény (Velíšek a Hajšlová, 2009b), zvláštní chuť, závratě, obličejové otoky, zrudnutí, průjmy a bolesti břicha. Projevy intoxikace nastávají několik minut až hodinu po požití potravin (Moy, 2009).

V dnešní době jsou PA studovány v souvislosti s procesem karcinogeneze. Toxicita PA je zvyšována s jejich rostoucí molekulovou hmotností a nábojem (Komprda, 2005).

3.2.2.1 Detoxifikační mechanismus odbourávající biogenní aminy

Organismus člověka má k dispozici detoxifikační mechanismy, které působí především ve střevě (Komprda, 2004). Rozhodující cestou odbourávání BA v organismu člověka je oxidace. Odbourávání BA je katalyzováno enzymy, které nazýváme aminooxidázy (monoaminoxidáza – MAO, diaminoxidáza – DAO, polyaminoxidáza – PAO; Komprda, 2005). Detoxifikační kapacita těchto enzymů je individuální, snižuje se s rostoucím věkem (Kalač a Křížek, 2005).

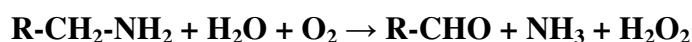
Mechanismy jsou nedostatečné:

- U alergiků
- U pacientů, kteří konzumují léčiva s inhibitory MAO
- Při vysokého příjmu BA (Komprda, 2004)

Léčiva s inhibitory MAO se většinou používají pro léčbu deprese, hypertenze a tuberkulózy (Flick a Ankenman Granata, 2005). Dnes existují léky (např. Rasagiline) pro léčbu Parkinsonovy choroby, které obsahují selektivní inhibitory MAO-B. Tyto selektivní inhibitory nepůsobí na MAO, které odbourávají BA, a proto pacienti nemusí dodržovat diety, při kterých nesmí přijímat potraviny obsahující BA (Goren et al., 2010). MAO mohou být inhibovány i alkoholem. DAO mohou být inhibovány léky pro odkašlávání a uvolňování hlenů (Kalač a Křížek, 2005). Značný obsah PUT a CAD v potravinách saturuje část kapacity potřebné pro detoxikaci především HIS a TYR. PUT a CAD nejsou samy o sobě zdravotně rizikové (Velíšek a Hajšlová, 2009b).

MAO odbourávají především aromatické monoaminy pomocí oxidační deaminace na příslušný aldehyd, čpavek a peroxid vodíku (rovnice č.1). MAO jsou mitochondriální enzymy, které jsou aktivní především v játrech, slezině, ledvinách, mozku, plicích a především ve střevě.

Rovnice č.1: Oxidační deaminace monoaminů (Komprda, 2005)



DAO odbourávají diaminy (PUT, CAD) pomocí oxidační deaminace. Nejvyšší aktivitu vykazují v tenkém střevě, ledvinách a placentě.

PAO využívají jako substrát především PA spermidin a spermin, mohou však odbourávat i monoaminy a diaminy (Komprda, 2005).

3.2.2.2 Toxické účinky tyraminu

TYR je nejvýznamnější vazoaktivní BA. Jeho nejdůležitější toxické účinky jsou zvýšení krevního tlaku, hypertenze, migrény, krvácení do mozku, selhání srdce (Komprda, 2004).

3.2.2.3 Toxické účinky histaminu

Mezi nejdůležitější toxické účinky patří dilatace hladké svaloviny periferních krevních cév (ta vede k poklesu tlaku, zrudnutí obličeje, bolestem hlavy), kontrakce hladké svaloviny střeva (ty vedou k břišním křečím, průjmům, zvracení), dále kopřivka,

zrudnutí očí, dechové potíže, třes (Komprda, 2004), hypotenze, anafylaktický šok (Velíšek a Hajšlová, 2009b), astma, rýma, zánět spojivek (Komprda a Dohnal, 2010).

Toxický účinek závisí zvláště na velikosti přijatého množství, přítomnosti jiných aminů (může docházet k tzv. potenciaci účinku), aktivitě aminoroxidáz a celkovém stavu střev (Komprda, 2004).

HIS uplatňuje své účinky prostřednictvím vazby na receptory na buněčných membránách. Dalším potenciátorem, kromě jiných aminů, mohou být bakteriální endotoxiny. Bakteriální endotoxiny jsou lipopolysacharidy, odolné proti vysokým teplotám a jsou produkovány zejména G- bakterii.

K léčbě příznaků mohou být účinně použity antihistaminika. První ohlášený případ otravy HIS ze sýra byl v roce 1967 ze sýru Gouda (Flick a Ankenman Granata, 2005).

3.2.2.4 Toxické dávky biogenních aminů

Toxické dávky BA je obtížné stanovit. Závisí na individuálních rozdílech mezi lidmi, na přítomnosti různých BA v potravě (Komprda, 2004), na množství spotřebované potraviny, přítomnosti jiných toxických látek (Velíšek a Hajšlová, 2009b) nebo na dalších biologicky aktivních složkách ve fermentovaných potravinách, které chrání proti toxickým vlastnostem BA (Park a Kyung Kim, 2012). Významný je vliv teploty skladování. Při teplotě blízko 0 °C nastanou negativní sensorické změny dříve, než hodnoty obsahu BA dosáhnou toxických dávek. Při teplotě 10 °C nastanou sensorické změny později, než hodnoty obsahu BA dosáhnou toxických dávek (Komprda, 2004).

Koncentrace HIS, která způsobí intoxikaci, je asi 500 – 1000 mg/kg, u TYR asi 100 – 800 mg/kg a u PEA asi 30mg/kg (Flick a Ankenman Granata, 2005). Celkový obsah TYR + HIS + PUT + CAD v dané potravíně by neměl překročit 900 mg/kg (Komprda, 2005).

Pro HIS se dále uvádějí hodnoty:

- 8 – 40 mg – lehká otrava
- 40 – 100 mg – střední otrava
- nad 100 mg – těžké intoxikace (Kalač a Křížek, 2005)

Pro TYR se dále uvádějí hodnoty:

- 10 – 80 mg – vyvolání otoků
- nad 100 mg – vyvolání migrén (Kalač a Křížek, 2005)

3.2.3 Hygienický význam biogenních aminů

BA slouží jako indikátory stupně kažení potravin. Ke zjištění stupně kažení potravin se používá tzv. index biogenních aminů (BAI = obsah BA v mg/kg; Komprda, 2004). BAI (vzorec č.1) využívá skutečnosti, že obsah HIS, PUT a CAD se v průběhu skladování produktu zvyšuje, na druhé straně se obsah SPD a SPM nemění nebo dokonce snižuje (Komprda, 2005). Při hodnotě BAI < 1 je kvalita výborná, při hodnotě BAI > 10 je kvalita velmi špatná (Křížek a Kalač, 1998).

Vzorec č. 1: index BA (upraveno podle Karovičová a Kohajdová, 2003)

$$BAI = \frac{HIS + PUT + CAD}{1 + SPD + SPM}$$

BA některých potravin (např. sýrů) se mohou podílet společně s bílkovinami a aminokyselinami na Maillardově reakci (Velíšek a Hajšlová, 2009a).

3.3 Biogenní aminy ve zrajících sýrech

K výrazné tvorbě BA v sýrech dochází v provozech s nedostatečnou hygienickou úrovní, takže obsah ovlivňuje kontaminující mikroflóra. Při dodržování hygienických podmínek je obsah BA velmi malý. Jinak je tomu u sýrů z nepasterovaného mléka. Takové sýry se často vyrábí v malých provozovnách se špatnou hygienou i ve vyspělých zemích (Velíšek a Hajšlová, 2009b). Koncentrace BA v sýrech mohou být použity jako indikátor pro jeho čerstvost a indikátor kvality syrových materiálů a výrobních procesů (Flick a Ankenman Granata, 2005). BA jsou aromatickou složkou sýrů (Velíšek a Cejpek, 2008). Nejvyšší koncentrace BA byly zjištěny u sýrů s modrou plísní (Walstra et al., 1999) a v sýrech zrajících pod mazem (Kalač a Křížek, 2005). Nejvyšší obsahy PA jsou zjišťovány v sýrech typu čedar: průměrný obsah PUT kolem 650 mg/kg, SPD kolem 200 mg/kg, obsah SPM v rozmezí 20 – 40 mg/kg (Komprda, 2005). Obsah BA v sýrech je uveden v tabulce č. 1 (Velíšek a Hajšlová, 2009b).

Flick a Ankenman Granata (2005) studovali obsah BA v různých typech sýrů. Studie analyzovala 20 čerstvých sýrů, 20 tvrdých zrajících sýrů vyrobených z pasterizovaného mléka, 20 tvrdých zrajících sýrů vyrobených ze syrového mléka, 20 kozích sýrů a 20 sýrů s modrou plísní. Výsledky jsou uvedeny v tabulce č. 2 (Flick a Ankenman Granata, 2005).

Tabulka č. 1: Obsah BA v mg/kg (upraveno dle Velíšek a Hajšlová, 2009b)

Sýr	HIS	CAD	PUT	AGM	PEA	TYR	TRY
<i>Měkké</i>	0	0 – 1,5	0 – 3,1	0	0	0 – 0,6	0
<i>Tvrdé sýry^a</i>	0 – 301	0 – 710	0 – 612	0 – 22	0 – 32	0 – 301	0 – 45
<i>Tvrdé sýry^b</i>	0 – 609	0 – 389	0 – 670	0-27	0 – 30	0 – 609	0 – 34
<i>Čedar</i>	0 – 1300		1 – 996		0 – 303	0 – 1500	0 – 300
<i>Ementál</i>	S – 2000	0 – 460	1 – 130		0 – 490	1 – 1000	0 – 210
<i>Gouda</i>	0 – 850	1 – 140	1 – 200		0 – 46	0 – 670	10 – 200
<i>Eidam</i>	0 – 88	S	S			S – 320	
<i>Roquefort</i>	0 – 4100	42 – 905	44 – 830		10 – 25	S – 1350	10 – 1100

a...z pasterovaného kravského mléka

b...ze syrového kravského a ovčího mléka

s...stopy

Tabulka č. 2: Obsah BA v mg/kg (upraveno dle Flick a Ankenman Granata, 2005)

Amin	Čerstvý sýr	Tvrký zrající sýr z pasterizovaného mléka	Tvrký zrající sýr ze syrového mléka	Kozí sýr	Sýr s modrou plísní
TRY	0,6	301	609	830	1585
HIS	Nedetekováno	163	391	88	377
PEA	Nedetekováno	32	28	12	40
TYR	Nedetekováno	45	34	17	129
PUT	3,1	615	670	192	257
CAD	1,5	710	369	89	2101

Zrající sýry obsahují vyšší průměrné koncentrace aminů než čerstvé sýry. Proteolýza kaseinu při zrání má za následek zvýšení hladiny volných aminokyselin, potřebné ke tvorbě BA. Delší proces zrání může vést k vyšším koncentracím biogenních aminů.

Velmi nízké hladiny biogenních aminů se vyskytují u čerstvých sýrů vyrobených z pasterizovaného mléka z důvodu pasterizace a nedostatečné délky zrání. Vysoké úrovně BA v čerstvých sýrech mohou vznikat v důsledku použití nekvalitního mléka (Flick a Ankenman Granata, 2005).

3.3.1 Faktory ovlivňující obsah biogenních aminů v sýrech

Obsah BA v sýrech ovlivňuje hygiena produkce surovin, výběr startovacích kultur, doba skladování, pH, aktivita vody, obsah soli, obsah tuku, teplota v průběhu zrání (Komprda, 2004), tvar sýra (vyšší obsah v kulatých sýrech ve srovnání s pravoúhlými), obal (vyšší obsah BA při zrání pod fólií než při zrání pouze pod kůrou; Petridis a Steinhart, 1996a), teplota syřidla, proteolytická činidla (Komprda, 2005), vrstvy sýra (vnější část sýra má podstatně vyšší obsah než část vnitřní, proto se rizikovým spotřebitelům doporučuje odstranit vnější třicentimetrové vrstvy vyzrálého sýra před jeho konzumací; Komprda et al., 2014). Vliv způsobu úpravy, doby a teploty skladování zrajícího sýru ementálského typu na obsah celkových BA je uveden v tabulce č. 3 (Petridis a Steinhart, 1996b).

Tabulka č. 3: Vliv způsobu úpravy, doby a teploty skladování zrajícího sýru ementálského typu na obsah celkových BA (upraveno dle Petridis a Steinhart, 1996b)

Způsob úpravy	Doba skladování (měsíce)	Teplota skladování (°C)	Obsah celkových BA (mg/kg)
Strouhaný	1	5	650
		15	1600
	5	5	2000
		15	4900
Kusový	1	5	450
		15	550
	5	5	1200
		15	4000

Doba zrání, doba a teplota skladování. Prodloužení zrání zvyšuje koncentraci BA. Flick a Ankenman Granata (2005) provedli studii s cílem zkoumat vliv teploty skladování na obsah BA. Vzorok sýra Azeitao byly transportovány při 4 °C a při 25 °C, pak udržovány při teplotě 4 °C po dobu dvou týdnů, poté udržovány při teplotě 25 °C po dobu dalších dvou týdnů. BA byly významně vyšší v sýru transportovaného při 25 °C než při teplotě 4 °C. Když byl sýr ze 4 °C umístěn do teploty 25 °C po dobu dvou týdnů došlo k nárůstu koncentrace BA o 37 %. Proto je důležité, aby správné teploty byly udržovány po celou dobu přepravy, distribuce, nákupu a skladování (Flick a Ankenman Granata, 2005).

Hodnota pH. Hodnota pH může mít významný vliv na produkci BA. Optimální pH pro tyrosin dekarboxylázovou a histidin dekarboxylázovou aktivitu je pH 5. (Flick a Ankenman Granata, 2005).

Druh sýra. Obsah BA je ovlivněn druhem sýra. Rozdíly v rámci různých druhů sýra mohou být způsobeny výrobním postupem, počtem bakterií v mléce, tepelným zpracováním, použitím startovacích kultur a dobou trvání a podmínkami procesu zrání (Flick a Ankenman Granata, 2005). Zrající sýry jsou jednou ze základních surovin pro výrobu tavených sýrů, proto existují i údaje o průměrném obsahu TYR, SPM a PUT v různých druzích taveného sýra: TYR 59 mg/kg, SPM 56 mg/kg, PUT 21 mg/kg (Komprda, 2005).

3.3.2 Mikroorganismy podílející se na tvorbě biogenních aminů

Mezi nejdůležitější bakteriální druhy produkující BA patří: *Bacillus macerans*, *Propionibacterium* ssp. (Komprda, 2004), *Citrobacter*, *Clostridium*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Shigella*, *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Streptococcus* (Kalač a Křížek, 2005).

Z rodu *Lactobacillus* jsou nejdůležitější následující druhy: *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus acidophilus* (Komprda, 2004), *Lactobacillus arabinosae* (Velíšek a Hajšlová, 2009b). Z rodu *Streptococcus* jsou nejdůležitější následující druhy: *Streptococcus faecium* (Komprda, 2004), *Streptococcus mitis* (Velíšek a Hajšlová, 2009b).

Dále k výrobě BA přispívají *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus helveticus*, *Streptococcus lactis*, čeleď *Enterobacteriaceae* a *Enterococcus faecalis*. (Flick a Ankenman Granata, 2005)

Stanovovaná množství BA v potravinách se často neshodují s počty výše uvedených mikroorganismů, protože jednotlivé kmeny se mohou lišit svou dekarboxylázovou aktivitou (Komprda, 2005). Mikroorganismy s dekarboxylázovou aktivitou mohou být startovací mikroorganismy nebo kontaminující mikroorganismy vzniklé ve výrobním procesu mléka a sýrů (Burdychová a Komprda, 2007).

3.3.2.1 Kontaminující mikroflóra

Přítomnost kontaminujících mikroorganismů v potravinách může být považována za ukazatel kvality nebo stupně hygieny suroviny použité při výrobě potravin nebo jako indikátor úrovně hygieny u výrobce. Mezi kontaminující mikroflórou může patřit *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus lactis* a bakterie rodu *Enterococcus* (Burdychová a Komprda, 2007).

3.3.2.2 Startovací mikroflóra

Startovací kultury na výrobu sýrů by měly být kontrolovány na jejich schopnost produkovat biogenní aminy před jejich použitím. Při výrobě sýru Manchego bylo vypořazováno, že při použití 1 % startovacích kultur se vytvořilo o 15 % více TYR a o 28 % více HIS než při použití 0,1 % startovacích kultur (Flick a Ankenman Granata, 2005).

Mezi startovací mikroflóru může patřit *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*, *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*, *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *cremoris*, *Lactococcus lactis* ssp. *diacetyllactis*, *Streptococcus thermophilus* a *Lactobacillus helveticus* (Burdychová a Komprda, 2007).

3.4 Legislativa

Legislativní limity obsahu BA jsou poměrně rozdílné v různých zemích (Komprda, 2004).

Nařízení Komise (ES) č. 2073/2005 udává limit HIS pro ryby a produkty z rybolovu. Produkty rybolovu z druhů ryb spojovaných s vysokým množstvím histidinu (čeleď *Scorridae*, *Clupeidae*, *Engraulidae*, *Coryfenidae*, *Pomatomidae*, *Scombrosidae*) mají limit 100 mg/kg, u dvou vzorků z 9 je limit 200 mg/kg a hlavní referenční analytická metoda je metoda HPLC. Produkty rybolovu, které byly ošetřeny enzymatickým zráním v láku, vyrobené z druhů ryb spojovaných s vysokým množstvím histidinu (čeleď *Scorridae*, *Clupeidae*, *Engraulidae*, *Coryfenidae*, *Pomatomidae*, *Scombrosidae*) mají limit 200 mg/kg, u dvou vzorků z 9 je limit 400 mg/kg a hlavní referenční analytická metoda je metoda HPLC.

Před vstupem České republiky do Evropské Unie platily dvě vyhlášky. Vyhláška MZd. č. 53/2002 Sb., která udávala nejvyšší přípustné množství HIS v rybách a rybích výrobcích a přípustné množství HIS v pivu a vínu a vyhláška MZd. č. 298/1997 Sb., která udávala přípustné množství TYR ve vínu, v sýrech a v potravinách všeobecně. Po vstupu České republiky do Evropské Unie se vydala **vyhláška MZd. č. 305/2004 Sb.**, která udává přípustné množství HIS v rybách a rybích výrobcích 100 mg/kg (2 vzorky z 9 mají povoleno maximální překročení o 100%).

Zatím nikde neurčuje legislativa výrobcům, aby deklarovali obsah HIS a TYR na obalu. Tenhle údaj by rizikové skupiny konzumentů ocenily, ale je to obtížné vzhledem k velkému kolísání obsahu aminů v rámci určitého druhu potravin. Proto se snaží výzkumy vyvíjet rychlé, jednoduché a levné metody stanovení BA, především HIS a TYR (Kalač a Křížek, 2005).

3.5 Stanovení biogenních aminů

Analyticky se BA stanovují kapalinovou chromatografií, kapilární zónovou elektroforézou (Komprda, 2004) nebo micelární elektrokinetickou kapilární chromatografií. Nevýhodou většiny analytických postupů pro stanovení obsahu BA je nutnost hledané analyty před vlastní detekcí derivatizovat (Komprda, 2005). Nedílnou součástí stanovení BA jsou mikrobiologické analýzy, protože BA jsou vytvořeny zejména bakteriemi s dekarboxylázovou aktivitou (Komprda a Dohnal, 2010).

3.5.1 Obecné schéma stanovení biogenních aminů a polyaminů

Na začátku je třeba vzít v úvahu počet vzorků pro správné statistické zpracování. BA a PA mohou být v sýrech distribuovány nerovnoměrně (rozdíly v koncentraci mezi jádrem a okrajovými částmi), proto je nutná dostatečná homogenizace vzorku pro získání průměrného obsahu. Vlastní stanovení BA je analyticky náročné vzhledem k vysokým požadavkům na citlivost a přesnost (Komprda a Dohnal, 2010).

Schéma:

- Extrakce – pomocí CCl_3COOH (kyselina trichloroctová), HClO_4 (kyselina chloristá), HCl (kyselina chlorovodíková)
- Derivatizace – pomocí dansylchloridu, o-ftaldialdehydu
- Separace – pomocí chromatografie, elektroforézy
- Detekce – pomocí UV, MS (Komprda a Dohnal, 2010)

3.5.1.1 Extrakce

Před extrakcí se do vzorku přidá přesné množství vnitřního standardu (1,7-diaminoheptan). Extrakcí jsou vzorky dezintegrovány a aminy jsou rozpuštěny v extrakčním rozpouštědle. Pro dezintegraci vzorku jsou typicky používány Ultra-Turrax homogenizátory.

Při čištění se odstraňují další látky, které obsahují aminovou skupinu a mohly by reagovat s derivatizačním činidlem. Proto se při čištění odstraňují aminokyseliny, aby byl zajištěn přebytek derivatizačního činidla k dosažení kvantitativní derivatizace. Často

se používá metoda extrakce aminových derivátů do diethyletheru. Vysoký obsah volných aminokyselin může působit problémy v chromatografiích, protože dochází k eluci těchto aminokyselin v prvních minutách analýzy, které mohou interferovat s časnou elucí některých BA. Dále se odstraňuje z matrice tuk. Lipidové frakce se odstraní za použití nízké teploty v chlazené odstředivce (obvykle při 4 °C).

Pro extrakci se nejčastěji používá kyselina chlorovodíková (0,1 M) nebo kyselina chloristá (0,2 a 0,6 M). Dávka činidel bývá 25 nebo 50 ml 0,1 M kyseliny chlorovodíkové na 5 – 10 g vzorku, 15 ml 0,2 M kyseliny chloristé na 4 g vzorku, 40 ml 0,6 M kyseliny chloristé na 10 g vzorku (Komprda a Dohnal, 2010).

3.5.1.2 *Derivatizace*

Derivatizací se vloží skupina chromoforu nebo fluoroforu do molekuly aminu, čímž se umožní jejich detekce. Derivatizační činidla jsou následující: dansylchlorid (DCI – 1-dimethylaminonaftalen-5-sulfonylchlorid), dabsylchlorid, o-ftaldialdehyd (OPA), deriváty fluoresceinu (dichlorotriazinylaminofluorescein), benzoylchlorid, 6-aminoquinolyl-N-hydroxysukcinimidylkarbamát, 9-fluorenylmethyloxykarbonylchlorid (Fmoc), fenylisothiokyanát, 4-fluor-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol a 3-(2-furoyl)-chinolin-2-karboxaldehyd. Dvě nejpoužívanější derivatizační činidla jsou DCI a OPA.

Dansyl deriváty. Umožňují rychlou separaci v kombinaci s UV detekcí při 254 nm. DCI je nejrozšířenější činidlo pro derivatizaci aminů před separací HPLC. Je ovšem citlivý na světlo a má omezenou stabilitu. DCI se obvykle používá rozpuštěný v acetonu za mírně alkalických podmínek ($\ominus \text{NaHCO}_3$) a při vyšší teplotě (40 °C – 60 °C) po dobu 20 – 60 minut.

OPA deriváty. Mají delší separaci s použitím fluorometrické detekce při excitační vlnové délce 330 nm a emisní vlnové délce 440 nm. OPA je nedostatečný v případě aminů se sekundárními aminoskupinami (SPD, SPM).

Fmoc. Toto derivatizační činidlo se používá pro aminokyseliny a PA se sekundárními aminoskupinami (SPD, SPM). Tyto deriváty jsou stabilní při pokojové teplotě a v kyselém prostředí. Výhodou je možnost detekovat velmi nízké koncentrace. Derivatizace se provádí v roztoku hydrogenuhličitanu sodného nebo uhličitanu sodného při teplotě 40 °C po dobu 10 minut. Používá se fluorescenční detekce s excitační vlnovou délkou 262 nm a emisní vlnovou délkou 615 nm (Komprda a Dohnal, 2010).

3.5.1.3 *Separace*

Pro screening se často používá tenkovrstvá chromatografie (TLC). Pro přesnější stanovení BA a PA se používá chromatografie (plynová, kapalinová, iontoměničová) a elektromigrační metody (kapilární elektroforéza, kapilární elektrochromatografie, micelární elektrokinetická chromatografie).

Kapalinová chromatografie (LC). Může být bez derivatizace, s derivatizací předkolumnovou nebo pokolumnovou. Je nejčastěji používanou metodou separace pro stanovení aminů. Předkolumnová derivatizace přímo ovlivňuje separační vlastností aminů, pokolumnová derivatizace umožňuje pouze zvýšení citlivosti detekce (Komprda a Dohnal, 2010).

Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC). Je to nejčastěji používaná metoda. Využívá se derivatizace pokolumnová s ninhydrinem nebo OPA v přítomnosti 2-merkapt ethanolu. Pro zvýšení citlivosti se používá derivatizace předkolumnová s DCI, benzoylchloridem nebo FMOC. Kolona bývá kovová se stacionární fází Nucleosil 100 C18 a mobilní fází methanol : acetonitril : voda v poměru 2 : 1 : 1 (Greif et al., 1997).

Micelární kapalinová chromatografie (MIC). Je alternativou ke konvenčnímu HPLC, kdy se používá mobilní fáze s povrchově aktivními látkami. Aplikace micelárního prostředí snižuje nároky na přípravu vzorku. Kromě toho zlepšuje chromatografické parametry, například rozlišení píku a citlivost detekce UV při stanovení aromatických BA (Komprda a Dohnal, 2010).

Kapilární zónová elektroforéza (CZE). Je to dobrá separační technika. Ve své většině aplikací se používá pro účinnou separaci nabitých sloučenin. Používá se křemenná kapilára plněná citrátovým puftrem. Hlavní výhodou této metody je zvýšení účinnosti v důsledku lepší možnosti automatizace a velmi nízká cena použitých chemikálií (Křížek a Pelikánová, 1998).

3.5.1.4 *Detekce*

Nejčastěji používaná metoda detekce je měření absorbance v UV oblasti. Podobně se používá i fluorometrická detekce, která je selektivnější a citlivější.

Detekční limity pro individuální BA a PA ve standardním roztoku jsou obvykle v rozmezí od 0,2 – 0,45 µg/l až 5,1 – 35 µg/l. Detekční limity pro aminy získané ze sýrů se pohybují mezi 0,05 – 0,25 mg/kg až 0,7 – 1,5 mg/kg (Komprda a Dohnal, 2010).

3.5.1.5 Vyhodnocení dat

Separované látky ve vzorku se mohou identifikovat pomocí porovnání retenčních časů standardů a přítomných látek ve vzorku (Smělá et al., 2004).

Koncentrace BA ve vzorku (c_x , mg/kg) se pak upravuje v závislosti na koncentraci vnitřního standardu na základě rovnice:

$$c_x = c_{IS} \times \frac{A_x}{A_{IS}} \times RF_x$$

c_{IS} ...koncentrace vnitřního standardu (mg/kg)

A_{IS} ...plocha píku vnitřního standardu (jednotky plochy)

A_x ...plocha píku BA/PA (jednotky plochy)

RF_x ...faktor odezvy aminů

$$RF_x = \frac{c_{xr}}{c_{ISr}} \times \frac{A_{ISr}}{A_{xr}}$$

c_{xr} ...koncentrace BA v referenčním vzorku (mg/kg)

c_{ISr} ...koncentrace vnitřního standardu přidaného do referenčního vzorku (mg/kg)

A_{ISr} ...plocha píku vnitřního standardu v referenčním vzorku (jednotky plochy)

A_{xr} ...plocha píku BA v referenčním vzorku (jednotky plochy; Komprda et al., 2014)

3.5.2 Metody izolace mikroorganismů

Je popisováno mnoho kvalitativních i kvantitativních metod pro stanovení produkce BA mikroorganismy. Většina screeningových postupů zahrnuje použití diferenciálních médií obsahujících indikátory pH (bromkresolová červeň), základní složky (pepton, masový a kvasničný extrakt, glukosu a/nebo sůl) a prekurzory aminokyselin (Bover-Cid a Holzappel, 1999).

Burdychová a Komprda (2007) použili metodu PCR pro screening specifických tyrosindekarboxylázových (tyrDC) a histidinekarboxylázových (hDC) genů, díky kterým vznikají dekarboxylační enzymy. Jako kontrolní kmeny byly použity HIS nebo TYR produkující kmeny *Lactobacillus* a *Enterococcus faecalis*. Tyto kontrolní kmeny byly pěstovány na MRS agaru při 30 °C nebo na kanamycin aesculin azidovém agaru při 37 °C. Dva vzorky polotvrdého sýra holandského typu byly vyrobeny s použitím dvou startovacích kultur, které byly analyzovány po 21 dnech zrání. První výchozí kultura

(1) se skládala z *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*, *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*, *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *cremoris*, *Lactococcus lactis* ssp. *diacetylactis*, *Streptococcus thermophilus* a *Lactobacillus helveticus*. Druhá výchozí kultura (2) se skládala z *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* a *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*.

Byla provedena izolace mikroorganismů ze sýru, izolace jejich DNA a PCR. PCR byla prováděna v konečném objemu 25 ml, který obsahoval 10 ng genomické DNA. Vzorky DNA byly nejprve kompletně denaturovány inkubací při 94 °C po dobu 15 minut. DNA byla amplifikována ve 30 cyklech denaturace při 95 °C po dobu 45 s, nasednutí primerů při 52 °C po dobu 45 s a prodloužení při 72 °C po dobu 75 s. V konečném amplifikačním cyklu byly vzorky inkubovány při 72 °C po dobu 5 minut pro kompletní prodloužení konečných PCR produktů.

Bylo vybráno celkem 17 kolonií *Lactobacillus*, 19 kolonií *Enterococcus* a 16 kolonií koliformních bakterií. 17 bakteriálních izolátů bylo pozitivních na tyrDC a hDC (tabulka č. 4). Celkem 14 bakteriálních izolátů ukázalo amplifikaci fragmentů 1100 bp charakteristickou pro tyrDC. 3 izoláty ukázaly amplifikaci fragmentů 440 bp pro hDC. Metody PCR jsou rychlé, jednoduché a spolehlivější než metody založené na fenotypických znacích bakterií.

Lactobacillus curvatus a *Lactobacillus lactis* nepochází ze startovací kultury, takže jejich přítomnost v sýrech je pravděpodobně výsledkem kontaminace syrového mléka, znečištění po pasteraci během výroby sýru nebo z přísad používaných pro výrobu sýra. Ani žádný enterokokový kmen nebyl přítomen ve startovací kultuře, proto všechny druhy tohoto rodu izolovány ze vzorků sýrů jsou reprezentovány jako kontaminující mikroflóra (Burdychová a Komprda, 2007).

Tabulka č. 4: Identifikace bakteriálních izolátů na tyrDC a hDC (upraveno dle Burdychová a Komprda, 2007)

Izolát	Encoccus test	API test	PCR identifikace	PCR detekce		HPLC detekce	
				tyrDC	hDC	TYR	HIS
1	E.durans	-	E.durans	+	-	+	-
2	E.faecalis	-	E.faecalis	+	-	+	-
3	E.durans	-	E.casseliflavus	+	-	+	-
4	E.durans	-	E.durans	+	-	+	-
5	E.faecium	-	E.faecium	+	-	+	-
6	E.faecium	-	E.faecalis	+	-	+	-
7	E.durans	-	E.durans	+	-	+	-
8	E.durans	-	E.casseliflavus	+	-	+	-
9	E.durans	-	E.durans	+	-	-	-
10	E.durans	-	E.durans	+	-	+	-
11	E.faecalis	-	E.faecalis	+	-	+	-
12	E.faecium	-	E.faecalis	+	-	+	-
13	E.durans	-	E.durans	+	-	+	-
14	E.durans	-	E.durans	+	-	+	-
15	-	L.curvatus	L.curvatus	-	+	-	+
16	-	L.lactis	L.lactis	-	+	-	+
17	-	L.helveticus	L.helveticus	-	+	-	+

4 ZÁVĚR

Tato bakalářská práce se zabývá obecně popisem BA, jejich vznikem a výskytem, faktory ovlivňující jejich výskyt a účinky. Dále se zabývá výskytem BA ve zrajících sýrech, mikroorganismy podílejících se na jejich vzniku a faktory ovlivňující výskyt v sýrech. Nakonec se zabývala stanovením biogenních aminů v sýrech.

BA mohou spoluvytvářet aroma sýrů. Jejich obsah je v sýrech silně ovlivněn dobou a teplotou skladování, dobou zrání, hygienou výroby, výběrem startovacích kultur. Nejvyšší obsahy byly zjištěny v sýrech s modrou plísní a v sýrech zrajících pod mazem. BA vznikají mikrobiální činností. Mikroorganismy s dekarboxylázovou aktivitou mohou být součástí kontaminující mikroflóry (např. *Enterococcus*) nebo startovacích kultur (např. *Lactococcus*).

Stanovení biogenních aminů v sýrech se nejčastěji provádí pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie. Vzorek by měl být homogenizován, následně se provádí extrakce, derivatizace, separace, detekce a vyhodnocení dat. Součástí bývají i mikrobiologické analýzy, kdy se zjišťují přítomné mikroorganismy a jejich dekarboxylázová aktivita.

Legislativní limity jsou odlišné v různých zemích. U nás je aktuální Nařízení Komise (ES) č. 2073/2005, o mikrobiologických kritériích, které udává limit histaminu pro ryby a produkty z rybolovu. Zatím není povinnost uvádět obsah biogenních aminů na obale. Tuto povinnost by uvítaly rizikové skupiny konzumentů, ale jejich stanovování je obtížné a proto se vyvíjejí jednoduché, rychlé a levné metody stanovení.

5 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

BOVER-CID, S., SCHOPPEN, S., IZQUIERDO-PULIDO, M., VIDAL-CAROU, M. C. Relationship between biogenic amine contents and the size of dry fermented sausages. *Meat Science*, 1999, vol. 51, p. 305–311.

BOVER-CID, S., HOLZAPFEL, W. H. Improved screening procedure for biogenic amine production by lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 1999, vol. 53, p. 33–41.

BURDYCHOVÁ, R., KOMPRDA, T. Biogenic amine-forming microbial communities in cheese. *FEMS Microbiology Letters*, 2007, vol. 276, no. 2, p. 149–155. ISSN 0378-1097.

FLICK, G. J., ANKENMAN GRANATA, L. Biogenic amines in foods. In DABROWSKI, W. M., SIKORSKI, Z. E. (ed.). *Toxins in Food*. USA: CRC Press LLC, 2005, p. 121–154. ISBN 0-8493-1904-8.

GOREN, T., ADAR, L., SASSON, N., WEISS, Y. M. Clinical pharmacology tyramine challenge study to determine the selectivity of the monoamine oxidase type B (MAO-B) inhibitor Rasagiline. *Journal of Clinical Pharmacology*, 2010, vol. 50, no. 12, p. 1420–1428.

GREIF, G., GREIFOVÁ, M., DRDÁK, M. Stanovenie biogénnych amínov v potravinách živočíšneho pôvodu metódou HPLC. *Potravinárske vedy*, 1997, vol. 15, no. 2, p. 119–129.

KALAČ, P., KRÍŽEK, M. Biogenní aminy a polyaminy v potravinách a jejich vliv na lidské zdraví. *Potravinárská revue*, 2005, no. 2, p. 40–42.

KAROVIČOVÁ, J., KOHAJDOVÁ, Z. Biogenic amines in food. *Chemical Papers*, 2005, vol. 59, no. 1, p. 70–79.

KOMPRDA, T. Biogenní aminy a polyaminy ve fermentovaných potravinách živočišného původu. *Veterinářství*, 2005, vol. 55, no. 10, p. 646–650. ISSN 0506-8231.

KOMPRDA, T. *Obecná hygiena potravin*. 1st ed. Brno: MZLU, 2004. 148 p. ISBN 978-80-7157-757-7.

KOMPRDA, T., DOHNAL, V. Amines. In NOLLET, L. M. L., TOLDRÁ, F. (ed.). *Handbook of Dairy Foods Analysis*. 2010, p. 861–878. ISBN 978-1-4200-4631-1.

KOMPRDA, T., DOHNAL, V., CWIKOVÁ, O. Chromatografické stanovení biogenních aminů a polyaminů ve zrajících sýrech. *Chemické listy*, 2014, vol. 108, p. 1140–1144.

KŘÍŽEK, M., KALÁČ, P. Biogenní aminy v potravinách a jejich role ve výživě. *Czech Journal of Food Science*, 1998, vol. 16, no. 4, p. 151–159.

KŘÍŽEK, M., PELIKÁNOVÁ, T. Determination of seven biogenic amines in foods by micellar electrokinetic capillary chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1998, vol. 815, p. 243–250.

MOY, G. G. Regulatory toxicology. In CAMPBELL-PLATT, G. (ed.). *Food Science and Technology*. UK: Blackwell Publishing Ltd., 2009, p. 399–410. ISBN 978-0-632-06421-2.

NAŘÍZENÍ KOMISE (ES) č. 2073/2005, o mikrobiologických kritériích.

PARK, K. Y., KYUNG KIM, B. Lactic acid bacteria in vegetable fermentations. In LAHTINEN, S. (ed.). *Lactic acid bacteria: Microbiological and Functional Aspects*. 4th ed. CRC Press LLC, 2012, p. 187–212. ISBN 978-1-4398-3677-4.

PETRIDIS, K. D., STEINHART, H. Biogene Amine in der Hartkäseproduktion: I. Einfluß verschiedener Parameter auf den Amingehalt im Endprodukt am Beispiel von Emmentaler Käse. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau*, 1996a, vol. 92, p. 114–120.

PETRIDIS, K. D., STEINHART, H. Biogene Amine in der Hartkäseproduktion: II. Stufenkontroll-Studie einer standardisierten Emmentalerkäse-Produktion. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau*, 1996b, vol. 92, p. 142–146.

SMĚLÁ, D., PECHOVÁ, P., KOMPRDA, T., KLEJDUS, B., KUBÁŇ, V. Chromatografické stanovení biogenních aminů v trvanlivých salámech během fermentace a skladování. *Chemické listy*, 2004, vol. 98, p. 432–437.

TOLDRÁ, F. Fermented meat production. In HUI, Y. H. (ed.). *Handbook of Food Products Manufacturing*. USA: John Wiley and Son, Inc., 2007, p. 265–279. ISBN 978-0-470-04964-8.

VELÍŠEK, J., HAJŠLOVÁ, J. *Chemie potravin I.* 3rd ed. Tábor: OSSIS, 2009a. 602 p. ISBN 978-80-86659-15-2.

VELÍŠEK, J., HAJŠLOVÁ, J. *Chemie potravin II.* 3rd ed. Tábor: OSSIS, 2009b. 644 p. ISBN 978-80-86659-16-9.

VELÍŠEK, J., CEJPEK, K. *Biosynthesis of Food Components*. 1st ed. Tábor: OSSIS, 2008. 512 p. ISBN 978-80-86659-12-1.

VYHLÁŠKA MZd. č. 305/2004, kterou se stanoví druhy kontaminujících a toxikologicky významných látek a jejich přípustné množství v potravinách.

WALSTRA, P., GEURTS, T. J., NOOMEN, A., JELLEMA, A., VAN BOEKEL, M. A. J. S. *Dairy technology*. USA: Marcel Dekker, Inc., 1999. 727 p. ISBN 0-8247-0228-X.

6 SEZNAM ZKRATEK

- AGM – agmatin
BA – biogenní amin
BAI – index biogenních aminů
CAD – kadaverin
CZE – kapilární zónová elektroforéza
DAO – diaminooxidáza
DCI – dansylchlorid
DOPA – 3,4-dihydroxyalanin
dSAM – S-adenosyl-L-methioninamid
FMOC – 9-fluorenylmethyloxykarbonylchlorid
hDC – histidindekarboxylázový gen
HIS – histamin
HPLC – vysokoúčinná kapalinová chromatografie
LC – kapalinová chromatografie
MAO – monoaminooxidáza
MIC – micelární kapalinová chromatografie
MRS – de Man, Rogosa, Sharpe agar
MS – mass spektrometry – hmotnostní spektrometr
MTA – S-methyl-5'-thioadenosin
OPA – o-ftaldialdehyd
PA – polyamin
PAO – polyaminooxidáza
PCR – polymerase chain reaction – polymerázová řetězová reakce
PEA – fenylethylamin
PUT – putrescin
SAM – S-adenosyl-L-methionin
SPD – spermidin
SPM – spermin
TLC – tenkovrstvá kapalinová chromatografie
TRY – tryptamin
TYR – tyramin

tyrDC – tyrosindekarboxylázový gen

UV – ultrafialové záření

7 SEZNAM TABULEK

Tabulka č. 1: Obsah BA v mg/kg (upraveno dle Velíšek a Hajšlová, 2009b)

Tabulka č. 2: Obsah BA v mg/kg (upraveno dle Flick et al., 2005)

Tabulka č. 3: Vliv způsobu úpravy, doby a teploty skladování zrajícího sýru ementálského typu na obsah celkových BA (upraveno dle Petridis a Steinhart, 1996b)

Tabulka č. 4: Identifikace bakteriálních izolátů na tyrDC a hDC (upraveno dle Burdychová a Komprda, 2007)

8 SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek č. 1: Dekarboxylace aminokyselin (upraveno dle Velíšek a Hajšlová, 2009a)

Obrázek č. 2: Chemická struktura BA (upraveno dle Velíšek a Hajšlová, 2009b)

Obrázek č. 3: Biosyntéza SPD a SPM (upraveno dle Velíšek a Hajšlová, 2009b)

Obrázek č. 4: Biosyntéza katecholaminů (upraveno dle Velíšek a Hajšlová, 2009b)