

MENDELOVA UNIVERZITA V BRNĚ
AGRONOMICKÁ FAKULTA

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BRNO 2016

NELA JANDEKOVÁ

Mendelova univerzita v Brně

Agronomická fakulta

Ústav výživy zvířat a pícninářství



**Agronomická
fakulta**

**Mendelova
univerzita
v Brně**



Biogenní aminy v silážích

Bakalářská práce

Vedoucí práce:

Ing. Pavel Horký PhD.

Vypracovala:

Nela Jandeková

Brno 2016

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem
práci:.....

.....vypracoval/a
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 *Směrnicí o
zveřejňování vysokoškolských závěrečných prací*.

Jsem si vědom/a, 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

..

Mé poděkování patří Ing. Pavel Horký, Ph.D. za odborné vedení, trpělivost a ochotu, kterou mi v průběhu zpracování bakalářské práce věnoval.

Obsah

1 Úvod	8
2 Siláž	9
2.1 Charakteristika	9
2.2 Charakteristika vojtěškových a jetelových siláží	10
2.3 Klostridie	13
2.4 Technologie – vznik aminů a podmínky vzniku	14
3 Biogenní aminy	18
3.1 Histamin	18
3.2 Putrescin	19
3.3 Tyramin	20
3.4 Kadaverin	20
3.5 Spermidin	21
3.6 Spermin	21
3.7 Škodlivost biogenních aminů	22
3.7.1 Laminitida	23
3.8 Limity a měření	24
3.9 Přejít do živočišných produktů	25
4 Eliminace biogenních aminů	27
4.1 Konzervace – pH, inokulanty	27
4.2 Podíl sušina v silážované hmotě	29
4.3 Proteolýza – ztráta živin	30
4.4 Technologie odběru krmiva ze silážní jámy	31
5. Analýza	35
5.1 Chromatografie	35
5.2 Stanovení biogenních aminů	36
6 Závěr	38
Přílohy	39

ABSTRAKT

Biogenní aminy jsou nízkomolekulární dusíkaté látky, které vznikají působením mikroorganismů s dekarboxylázovou aktivitou. Takovéto mikroorganismy obsahují dekarboxylační enzymy, které katalyzují dekarboxylaci volných aminokyselin. Pro organismus jsou biogenní aminy nepostradatelné, protože zastávají mnoho důležitých funkcí např. růst buněk, regulace činnosti srdce atd. Ovšem při vyšších koncentracích ($\geq 100 \text{ mg/kg}^{-1}$) může docházet k bolestem hlavy, hypotenzi, nevolnosti, závratím a skotu může docházet k laminitidám což jsou záněty paznehtní škáry. Cílem této práce bylo vytvořit ucelený přehled o vzniku, eliminaci a stanovení biogenních aminů v bílkovinných silážích. Vznik biogenních aminů je zapříčiněn zejména špatnými podmínkami silážování a skladování. Zkrmování takto znehodnocené siláže je pro skot zdravotně závadné a může docházet k přechodu biogenních aminů do živočišných produktů a tak ohrozit i konzumenty. Vznik biogenních aminů můžeme eliminovat dodržováním správných podmínek silážování a skladování a přidáním správných inokulantů. Stanovení biogenních aminů je poté prováděn chromatografickými metodami.

Klíčová slova: Biogenní aminy, histamin, putrescin, tyramin, kadaverin, polyaminy, inokulanty, klostridie, siláže, proteolýza, chromatografie

ABSTRACT

Biogenic amines are low-molecular weight nitrogenic substances, which made by microorganisms with decarboxylic activity. These microorganisms contain decarboxylic enzymes, which catalyze decarboxylation of free amino acids. Biogenic amines are essential for organism, because they have their part in metabolism of cellular growth, regulativ of cardiac activity and so on. However, with higher concentrations (≥ 100 mg/kg-1) they cause headache, hypotensia, nauzea, dizziness, and laminitiss with cattle. Laminitis is an inflammation of hooves. Goal of this work was so create an overview of origin, elimination and detection of biogenic amines in protein silages. The creation of biogenic amines is mainly caused by bad condition of silage making and its storage. Feeding of this silage can cause serious health issues to cattle and biogenic amines can be transferred to the animal products that could be potentially harmful for customers. Creation of these substances could be eliminated by adhering to the correct terms of silage making and its storage and by adding a correct inoculants. Detection of biogenic amides could be achived by chromatography.

Keywords: Biogenic amines, histamine, putrescine, tyramine, cadaverine, polyamines, inoculants, clostridia, silages, proteolyses, chromatography

1 ÚVOD

Výroba kvalitní a zdravotně nezávadné siláže je hlavním kritériem pro dobrý zdravotní stav a užitkovost skotu, jelikož siláž tvoří podstatnou část celoroční krmné dávky v konvenčním zemědělství. Nesprávným výrobním postupem a nedodržením hygienických podmínek se může siláž kontaminovat nežádoucími mikroorganismy a vytvořit tak nežádoucí produkty a změnit živinové složení siláže. Při kontaminaci siláže mikroorganismy s dekarboxylázovou aktivitou, které katalyzují dekarboxylaci volných aminokyselin a vznikají biogenní aminy. Jejich vznik zapříčiňují hlavně bakterie rodu *Clostridia*, které se do siláže dostávají převážně z půdy. Tyto bakterie nejenže znehodnocují siláž, ale také jejich spory působí na zdraví zvířat a mohou přecházet do živočišných produktů stejně jako biogenní aminy, které tvoří.

Cílem této práce bylo podat ucelený pohled na vznik biogenních aminů v silážích, na jejich působení na zdravotní stav zvířat a na přechod do živočišných produktů. Zhodnotit možnosti jejich eliminace a jejich stanovení v silážích.

Součástí práce je také vliv skladovací teploty na vznik biogenních aminů v již hotové siláži. Tomuto tématu bych se chtěla věnovat i v dalších letech a to zejména z hlediska způsobu odběru siláže ze silážní stěny krmnými vozy.

Hlavním zdrojem informací pro tuto práci byly kromě doporučené literatury odborné články předních českých výživářských specialistů zabývajících se touto problematikou. Zdrojem některých informací byli také odborníci na technologie používané v procesu výroby a skladování siláže.

2 SILÁŽ

Krmivo určené pro zkrmování hospodářským zvířatům vzniklé fermentací čerstvé nebo částečně zavadlé píce s přidáním biologických a chemických látek pro udržení živin a stability siláže.

2.1 Charakteristika

Siláž řadíme mezi konzervovaná objemná krmiva, která se vyznačují nízkou hodnotou pH (3,6 – 5,0), na což mají vliv organické kyseliny, především kyselina mléčná. Výživná hodnota bývá zpravidla nižší než u původních plodin. Rozsah ztrát však závisí na celé řadě technicko-technologických postupů. Silážování je způsob, jak dlouhodobě udržet krmivo s nízkou sušinou. Silážování probíhá bez přístupu vzduchu, kdy bakterie mléčného kvašení fermentují ve vodě rozpustné cukry na organické kyseliny. Následkem toho je snížení pH a dlouhodobá konzervace silážované hmoty. (TYROLOVÁ 2013; ZEMAN 2006).

Silážování je velmi složitý biochemický proces, při kterém se řezanka píce uchovává v anaerobním kyselém prostředí. Po navezení řezanky do silážního žlabu musí být z hmoty vytlačen vzduch, čehož docílíme udusáním a vytvoříme tak podmínky potřebné pro množení bakterií mléčného kvašení. Tyto bakterie produkují ze sacharidů rozpustných ve vodě, které jsou v hmotě volně dostupné, kyselinu mléčnou, oxid uhličitý a vodu (TYROLOVÁ 2013).

Pro přípravu kvalitní siláže je také důležité délka řezanky silážované píce. V dnešní době se o tomto tématu vede spousta spekulací, ale obecně se doporučují následující hodnoty délky řezanky: U víceletých pícnin při obsahu sušiny do 30% by měla být délka řezanky 30 – 40 mm, při sušině do 35% pak 20 – 30mm a při obsahu sušiny nad 35 – 45% se doporučuje délka řezanky 10 – 20mm. Existují ovšem rozdíly v délce řezanky u použitých technologií. Samojízdné řezačky mají délku řezanky v podstatě danou, ale u sběracích vozů s řezacím ústrojím závisí délka řezanky zejména na rozteči nožů a jejich ostří. Teoretická délka při použití této technologie bývá zpravidla vyšší. U silážní kukuřice při sušině do 30% je doporučená délka řezanky v průměru 15 mm, při sušině 30 – 34% potom 10 – 15 mm a u silážní hmoty s obsahem sušiny nad 35% musí být hmota upracována na teoretickou délku pod 10 mm (zpravidla 6 – 8 mm), (DOLEŽAL, ZEMAN, 2011).

Kromě bakterií mléčného kvašení vznikají při nesprávném postupu silážování i bakterie nežádoucí, a to především bakterie máslového kvašení – produktem těchto bakterií je

kyselina máslová, která má nepříjemný zápach, zhoršuje kvalitu siláže a je zvířaty špatně přijímána; bakterie octového kvašení – vytvářejí kyselinu octovou za přístupu vzduchu, proto je důležité řádné udusání silážované hmoty; hnilobné bakterie – způsobují hnilobný rozklad bílkovin, těmto pochodům zabráníme okyselením siláže (KÁBRT 1963).

Podle obsahu živin pak dělíme siláže na bílkovinné, polobílkovinné a glycidové. Siláže představují zásadní část krmné dávky skotu 59 – 90% proto je její kvalita velmi důležitá, protože ovlivňuje nejen užitkovost, ale i zdravotní stav a reprodukci zvířat a také ekonomiku chovu. Podle obsahu sušiny v silážované píce a použité technologie dělíme siláže na:

- Siláž z čerstvé píce – obsah sušiny 22-26%
- Siláž z částečně zavadlé píce – obsah sušiny 26 – 35%
- Siláž ze zavadlé píce – obsah sušiny 35 – 50%

Plodiny s nižším obsahem sacharidů jsou hůře silážovatelné, a proto se silážují vždy po předchozím zavádání. Zavádání probíhá intenzivně ovšem ne déle než 24 – 36 hodin, při dlouhodobějším zavádání dochází k vyšším ztrátám živin což je pro kvalitu siláže nežádoucí. Siláže ze zavadlých píceňin mají nižší obsah kvasných kyselin a menší kyselost než siláže připravované z čerstvých píceňin. Tyto siláže jsou také náchylnější na tepelné poškození vlivem aerobních změn. Pro výrobu kvalitní siláže je potřeba dodržovat základní technologické požadavky:

- Optimální vegetační stádium sklizené píce
- Optimální délka řezanky a obsah sušiny
- Dodržování zásad technologických a hygienických postupů
- Vhodné silážní sklady
- Aplikace konzervačních prostředků (ZEMAN 2006).

2.2 Charakteristika vojtěškových a jetelových siláží

Vojtěškové a jetelové siláže patří mezi bílkovinná krmiva, která se vyznačují vysokou pufrací kapacitou a nízkým obsahem zkrasitelných sacharidů, a proto jsou velmi obtížně silážovatelná. Podíl dusíkatých látek v těchto silážích je více než 180 g/1 kg sušiny, ale mají nižší koncentrací energie, obvykle méně než 5,5 MJ NEL/kg sušiny. Také se

vyznačují poměrně úzkým poměrem živin NL:NEL. Jetel patří mezi středně silážovatelné píce, zatímco vojtěška se řadí mezi píce těžce silážovatelné. Pro úspěšnou konzervaci těchto plodin je důležitou intenzivní zavádání na vyšší obsah sušiny, a to 35 – 45% (VELECHOVSKÁ, 2008).

Velmi důležitým faktorem pro silážování je obsah vodorozpustných sacharidů (WSC = water soluble carbohydrate). Podle obsahu WSC určujeme vhodné druhy a kmeny bakterií do inokulantů. Silážovaná krmiva musí mít správný poměr WSC a pufrční kapacity (PK), která vyjadřuje schopnost udržovat stabilní pH i přidáním silné kyseliny či zásady do systému. Důležitá je také minimální sušina, kterou můžeme určit vzorcem:

$$DM_{\min} (\%) = 45 - 8 \text{ WSC} / \text{PK},$$

kde číslo 45 označuje fermentační koeficient. Pokud je koeficient nižší než 45 lze předpokládat vyšší obsah klostridií a kyseliny máselné v siláži. Silážovanou hmotu ovlivňuje také koncentrace dusičnanů. U přehnojených porostů, které mají téměř vždy vysoký obsah nitrátů, jsou obtížně silážovatelné. Na druhé straně pokud obsah nitrátů klesne pod dané minimum, je předpoklad, že se bude v silážovaném materiálu více dařit klostridiím a bude zde vyšší obsah kyseliny máselné. Proto, aby fermentační proces proběhl správně, musí bílkovinné a polobílkovinné píce obsahovat tzv. dusitanové minimum (LOUČKA, 2013).

Bílkovinné siláže představují hlavní a nejlevnější zdroj rostlinných bílkovin v krmné dávce hospodářských zvířat. Výsledná kvalita a výživná hodnota krmiva je závislá na vegetačním stádiu, botanickém složení pícnin a technologickém postupu při sklizni a následném konzervování. U vojtěšky a jetele je nejvhodnější stádium sklizně v období tvoření pupat, tzv. butonizace, ale ani na začátku kvetení není příliš pozdě. Při sklizni v ranějším období vývoje lze získat siláž s lepší stravitelností a produkční účinností (vyšší obsah NL a nižší obsah vlákniny), takto sklizená siláž je ovšem podmíněna vyšší náročností na dodržení technologických podmínek při sklizni i skladování a je důležité podpořit fermentační proces přidávkou vhodných konzervačních přípravků. Zvýšením sušiny na 35 – 45% zajistíme lepší podmínky pro fermentaci, ale zvýšíme také příjem sušiny zvířaty, a tím i zvýšení užitkovosti. Ovšem u hmoty s vyšším obsahem sušiny je potřeba s ní zacházet velmi šetrně, o to víc u jetelovin, které mají lístečky a dochází zde k velkým odrolům a ztrátám. Při obracení, postupujeme pomaleji s nižšími otáčkami a šikmo natočenými

pérovými hrabicemi. Dalším požadavkem je shrnovat bez zbytků zavadlé hmoty na louce (ZEMAN, 2006).

Musíme dbát na množství sušiny v silážované hmotě, protože správný podíl sušiny je přirozeným konzervantem. Čím déle necháváme hmotu na poli, tím více dochází k aktivitě nežádoucích mikroorganismů a je tím ohrožován celý fermentační proces. Pokud je hmota přeschlá zvyšuje se riziko ztrát na poli i při fermentačním procesu a může dojít k zaplísnění. Pokud píce přesušíme tak, že začnou odpadat z rostlin lístečky, přicházíme tak o nejcennější části, které jsme pro sklizeň vypěstovali. Pro nejefektivnější silážování používáme zavadlou píce o sušině 32 – 36% s využitím vhodným biologických inokulantů (DOLEŽAL a ZEMAN, 2011).

Dalším důležitým faktorem pro kvalitu bílkovinných siláží je délka řezanky. Obecně platí, že čím je vyšší sušina, tím je potřeba kratší řezanka, aby se rostlina co nejvíce porušila a došlo tak k rychlejšímu zavadání a tím k eliminaci ztrát na louce. Je však potřeba brát v úvahu druh píce, protože na její druh mechanického narušení platí jiné požadavky. Řezanka vojtěšky by mohla být při sušině 32% o 10 – 20 mm kratší než u trav, což znamená, že ideální délka řezanky u vojtěšky je asi 25 – 30 mm při již zmíněné sušině (LOUČKA, 2012).

Snížený příjem silážovaných bílkovinných krmiv je často znakem vzniku nežádoucích kvasných produktů rozkladem bílkovin až na amoniak nebo biogenní aminy. Kvalitní siláže musí být vyráběny z mladé zavadlé píce s vysokou stravitelností organických živin a nízkým obsahem vlákniny. Kvalitní siláž by měla být zkrmována zpravidla v dávce 2-3 kg/100 kg živé hmotnosti zvířete. Problémovými složkami mohou také být přirozené antinutriční látky s fytoestrogenní aktivitou, které snižují kvalitu vyráběné siláže. Mohou to být například: kumestrol, lucernol a estradiol, ale také výskyt plísní, klostridií a jejich metabolitů. Jejich druhy a počet na rostlinách i jejich množení, během zavadání, fermentačního procesu a v silážované píce, je závislé na vývoji počasí, stanovišti a způsobu používané technologie. V dnešní době je poměr vhodných epifytních mikroorganismů podstatně nižší než tomu bylo dříve, to je také důvod, proč se dnes do silážované hmoty přidává více biologických přípravků než dříve (JEŽKOVÁ, 2010).

2.3 Klostridie

Klostridie patří mezi bakterie máselného kvašení a jsou největšími producenty kyseliny máselné v silážích a jsou zdrojem půdního znečištění. Jsou rezistentní vůči záření, relativně pH, teplotě, trávícím šťávám, dezinfekci a kyslíku. Vedle kyseliny máselné dále vznikají i kyselina octová, propionová, acetony a alkohol. Jejich specifickou vlastností je také tvorba laktózy a plynů. Jsou to sporulující, G pozitivní a přísně anaerobní půdní mikroorganismy, proto se vyskytují i v dobře uzavřených silážích. Jsou velmi citlivé na nízké hodnoty pH a při hodnotách pod 4,2 včetně, dochází k jejich inhibici. Přítomnost kyselin máselné ve větším množství v siláži je průvodním znakem hlubokého rozkladu bílkovin, při kterém vznikají nežádoucí a zdravotně závadné produkty např. biogenní aminy (DOLEŽAL a kol., 2009).

Také dochází v průběhu fermentace k vysokým ztrátám živin, zvyšuje se pH a siláž se stává nestabilní a velmi často dochází k jejímu znehodnocení. Proto je důležité dbát na čistotu sklizené hmoty, optimální sušinu a rychlé okyselení hmoty. Rychlost okyselení silážované hmoty na hodnotu pH, kdy je silážované krmivo stabilní je jedním z nejvýznamnějších kritérií pro přípravu kvalitního krmiva. Pro svůj růst a rozmnožování potřebují klostridie určitou vlhkost. Uvádí se, že výskyt klostridií v silážích s obsahem sušiny nad 35% je velmi ojedinělý (JAMBOR, 2010).

Klostridie rozlišujeme na dva druhy:

Sacharolytické – rozkládají sacharidy, ale i již vytvořenou kyselinu mléčnou čímž způsobují odkyselování siláží.

Proteolytické – rozkládají bílkoviny a aminokyseliny, činností těchto enzymů mohou v napadených silážích vznikat již zmíněné zdravotně závadné biogenní aminy a také amoniak, který se poté v silážích vyskytuje ve větším množství. Spory těchto klostridií pronikají do trávicího traktu zvířat, kde mohou přes mléčnou žlázu, vzduchem nebo přímo krmivem infikovat mléko, které není poté vhodné pro sýrařské zpracování (MLEJNKOVÁ a kol., 2012).

Vliv činnosti klostridií na zdraví zvířat a lidí je ovšem méně patrný než vliv na kvalitu a složení krmiv. Ve fermentačním procesu poznamenaným klostridiální činností můžeme indikovat výrazné ztráty sušiny až 50%, energie až 18,5% a změny kvality a složení krmiva. Relativně velký efekt je na ztráty stravitelné energie během druhotné fermentace

kyseliny mléčné na kyselinu máselnou, který je ještě doprovázen velkou redukcí příjmu krmiva zvířaty, popř. se může u vysokoprodukčních dojnic vyskytnout acetonemie (přítomnost acetonu v krvi) na počátku laktace. U takto napadených siláží poukazujeme na zvýšenou hladinu amoniaku v krvi což je výsledek absorpce amoniaku z bacheru, ten pochází ze siláží s vysokým obsahem dusíku a amoniaku nebo mohou být oba faktory příčinou zvýšení detoxikační schopnosti jater pro amoniak (HORKÝ a kol., 2014).

Obsah sušiny u bílkovinných siláží je velmi důležitý, protože nízký obsah sušiny klesající pod 30% předpovídá proteolytický rozklad, vyvolaný klostridiami, kdy se tvoří těkavé mastné kyseliny a aminokyseliny se přeměňují na toxické mono a diaminy. Degradace bílkovin má také vliv na tvorbu amoniaku, který atakuje jaterní parenchym pokud nemá zvíře dostatečný podíl pohotovostní energie na jeho odbourání. Zvýšení amoniaku v těle dojnice má za následek zvyšující se podíl amoniaku v mléce včetně možného zvýšení obsahu somatických buněk. Riziko výskytu klostridií se také zvyšuje s narůstajícím podílem obsahu popelovin v silážované hmotě (nad 10%). U dojnic klostridie negativně ovlivňují tvorbu imunoglobulinů v mlezivu což má za následek zvýšenou úmrtnost telat a zvýšení virových a bakteriálních infekcí zažívacího traktu, respiračních onemocnění apod. Ale i samotná hlína, započítávána do popelovin, je pro dojnice negativním faktorem, protože se usazuje ve spodní části bacheru a snižuje jeho aktivitu (PŘIKRYL, 2014).

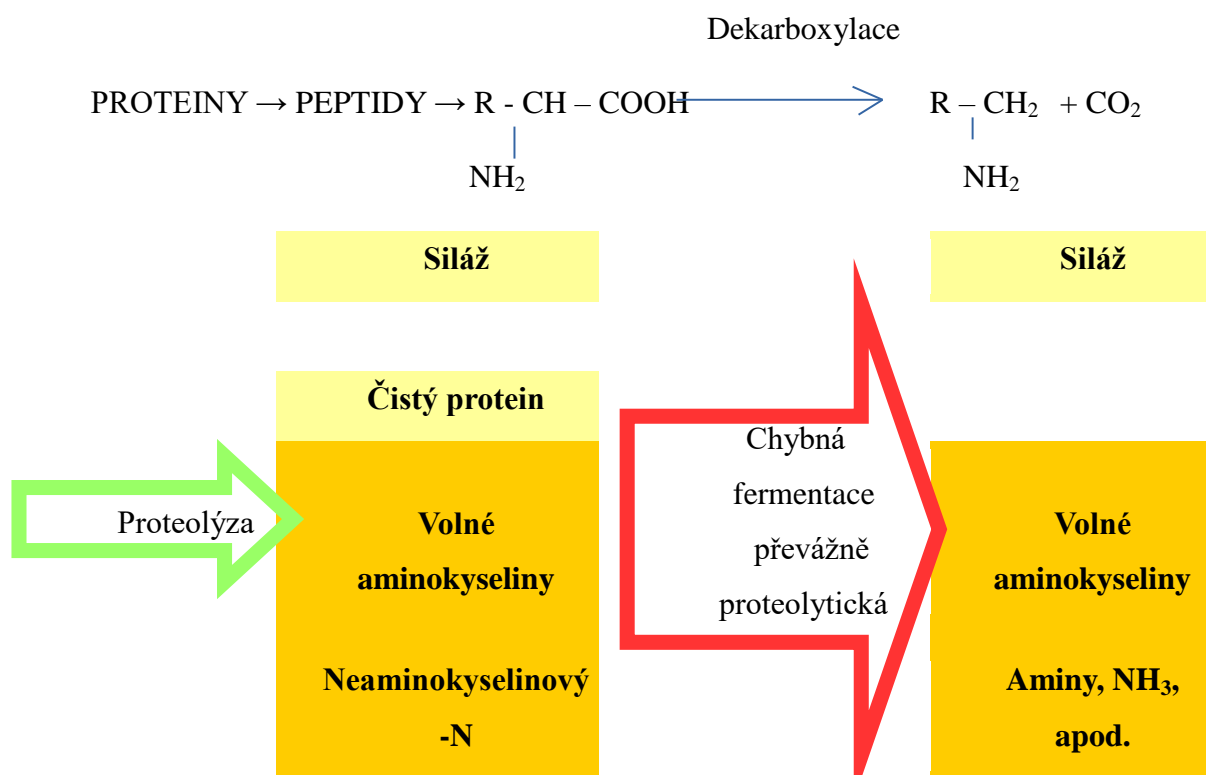
V siláží se nejčastěji setkáváme s těmito druhy: *C. butyricum*, *C. sporogenes* a *C. tyrobutyricum*. Poslední zmíněný druh má zpravidla nízký podíl z celé populace klostridií v siláží, ale má vliv na kvalitu zrajícího sýru pokud se dostane přes trávicí trakt do mléka. V takto napadených sýrech v během dlouhé doby zrání dojde k vyklíčení spor a rozvoji plynotvorných bakterií, které způsobují tzv. pozdní plynatost sýru a jeho čichové a chuťové vady. Většinou prochází klostridie trávicím traktem bez újmy a jsou vyloučeny výkaly, ale za určitých podmínek může dojít ke zmnožení spor v trávicím traktu a potom se spory dostávají do mléka (WEISSBACH, 2006).

2.4 Technologie – vznik aminů a podmínky vzniku

Biogenní aminy jsou nízkomolekulární bazické dusíkaté látky, které vykazují biologickou aktivitu. Jsou to toxicky významné látky, které vznikají z aminokyselin při hlubokém rozkladu bílkovin. Významným předpokladem pro vznik biogenních aminů je tedy proteolýza, ať už bakteriální nebo autolytická. Proteolýza může probíhat působením bakteriálních enzymů obsahující kofaktor pyridoxal-5-fosfát a mají dekarboxylační

aktivitu. Touto aktivitou se vyznačují především bakterie rodu *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Bacillus*, *Pediococcus*, *Pseudomonas*, *Citrobacter*, *Clostridium*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, *Shigella*. Dále mohou vznikat působením nativních enzymů nebo aminací a transaminací aldehydů a ketonů. Hlavními předpoklady pro vznik biogenních aminů mikroorganismy jsou: dostupnost volných aminokyselin, přítomnost mikroorganismů s dekarboxylační aktivitou a vhodné podmínky pro růst bakterií a produkci jejich enzymů (MATOUŠ a kol, 2010).

V dnešní době jsou nejvýznamnějšími producenty biogenních aminů klostridie, které se do silážované hmoty dostávají hlínou, při špatných technologických postupech při sklizni. Důležitými faktory je výška strniště a úprava luk před sečením – rozhrnování krtinců, hnojení apod. Při dekarboxylaci aminokyselin vzniká samotný amin a oxid uhličitý.



Obrázek č. 1 Vznik biogenních aminů

Zdroj: Richardt a Steinhöfel, 2008

Biogenní aminy dělíme na alifatické – putrescin, kadaverin, spermidin, spermin, agmatin; aromatické – tyramin, fenyletylamin; heterocyklické – histamin a tryptamin.

Tabulka č. 1 – Rozdělení biogenních aminů

AMINOKYSELINY	BIOGENNÍ AMINY	KLASIFIKACE
	ALIFATICKÉ	
Arginin	Putrescin	Diamin/Polyamin
Lysin	Cadaverin	Diamin/Polyamin
Arginin	Spermidin	Polyamin
Arginin	Spermin	Polyamin
	AROMATICKÉ	
Tyrosin	Tyramin	Monoamin
Fenylalanin	Fenylethylamin	Monoamin
	HETEROCYKLICKÉ	
Tryptofan	Tryptamin	Monoamin
Histidin	Histamin	Monoamin

Biogenní aminy jsou však látky, které jsou pro organismus nepostradatelné. Jsou nezbytnou součástí živých buněk, kde plní různé biologické funkce. Jsou významným zdrojem dusíku potřebným pro syntézu hormonů, alkaloidů, nukleových kyselin a proteinů. Nebezpečnými se začínají stávat až v momentě kdy, se nadměrné množství dostává do krevního oběhu. Tehdy se začínají stávat zdraví škodlivé, protože jsou to prekurzory potenciálně karcinogenních N-nitroso sloučenin. Dále mohou způsobit otravy organismu jednotlivými BA. Mezi nejtoxičtější patří histamin (ZORNÍKOVÁ, 2002).

Kromě toxických biogenních aminů se v organismu vyskytují i biogenní aminy, které jsou prekurzory pro tvorbu různých hormonů. Mezi tyto BA řadíme například Dopamin, který řadíme mezi katecholaminy a vzniká z tyrosinu nebo fenylalaninu. Dopamin je prekurzorem adrenalinu a noradrenalinu, které jsou nepostradatelné pro řízení celého organismu. Dalším takovým to BA je kyselina gama-aminomáselná neboli GABA, která vzniká s kyseliny glutamové a je inhibičním neurotransmiterem v nervové soustavě savců. Dekarboxylací serinu vzniká ethanolamin, který se řadí mezi fosfolipidy a je součástí buněčných membrán. Jako doplněk stravy pro růst svalů se využívá β -alanin, který se řadí

mezi β -aminokyseliny a vzniká dekarboxylací kyseliny asparagové (STRAKOVÁ a kol., 2006).

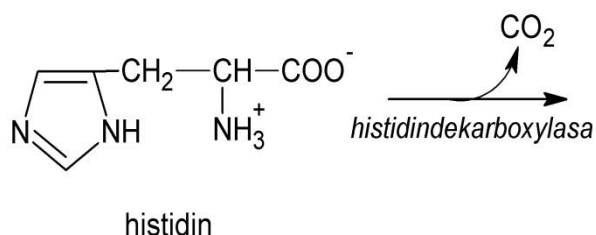
Predispozičním faktorem pro tvorbu biogenních aminů jsou, kromě siláží narušených klostridiemi, také acidózy. Vlivem nízkého pH dochází k odumření bakterií a tvorbě endoxinů (POŠTULKA, 2011).

3 BIOGENNÍ AMINY

Biogenní aminy jsou nízkomolekulární dusíkaté látky, které mají značnou biologickou aktivitu. Uplatňují se v metabolismu zvířat, lidí a rostlin. Ve fermentovaných potravinách jsou přirozenou součástí, ale naopak u nefermentovaných jsou ukazatelem nežádoucí mikrobiální aktivity (STANDAROVÁ, 2008).

3.1 Histamin

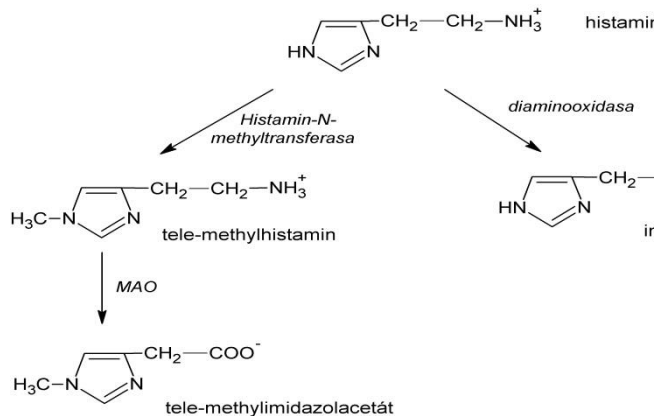
Histamin je amin bazického charakteru, který vzniká dekarboxylací aminokyseliny histidinu za pomoci histidindekarboxylázy. Patří mezi heterocyklické monoaminy a je hlavním mediátorem zánětu. V těle se nejčastěji vyskytuje v granulech žírných buněk a bazofilů, ale také v plicích, kůži nebo gastrointestinálním traktu. Při vysoké koncentraci histaminu v těle může vznikat alergická reakce a intolerance histaminu. (MARTÍNKOVÁ, 2007; MALONE a METCALFE, 1986).



Obrázek č. 2 Dekarboxylace histidinu na histamin

Zdroj: Anonym 1

V těle dochází k přirozené degradaci histaminu což může probíhat dvěma způsoby a to buď methylovací pomocí histamin-N-methyltransferasy a kofaktoru S-adenosinmethioninu nebo oxidací pomocí diaminoxidázy (DAO), (MARTÍNKOVÁ, 2007).

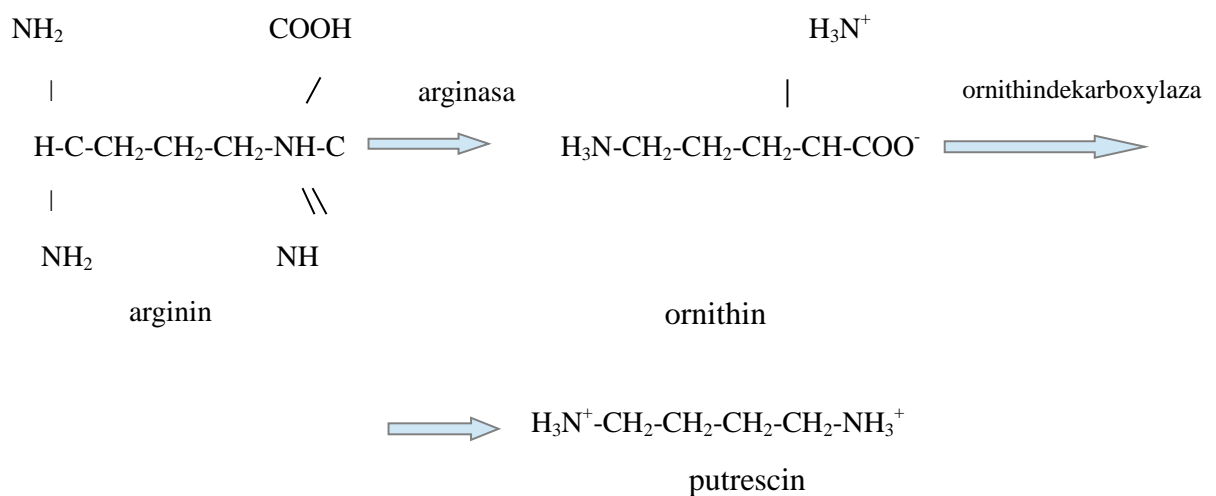


Obrázek č.3 Degradace histaminu

Zdroj: Anonym 2

3.2 Putrescin

Putrescin neboli butan-1,4-diamin se řadí mezi alifatické polyaminy a jeho prekurzorem je aminokyselina Arginin. Následně je putrescin prekurzorem dalších polyaminů, a to sperminu a spermidinu. Vysoké koncentrace polyaminů mohou být pro organismus toxické. Pro biosyntézu putrescinu jsou popsány dvě alternativní cesty, a to přes ornithin, který je produkován z argininu pomocí enzymu arginasa a ornithin je následně dekarboxylován za pomoci ornithindekarboxylazi na putrescin. Druhá cesta je syntéza putrescinu z agmatinu, který vzniká z argininu pomocí enzymu arginindekarboxylaza. Agmatin je následně hydrolyzován za pomoci enzymu agmatiniminohydrolasa na N-karbamoylputrescin a následně pomocí N-karbamoylputrescin-amidohydrolasa přeměněn na putrescin (ADÁMKOVÁ a PETŘIVALSKÝ, 2012).

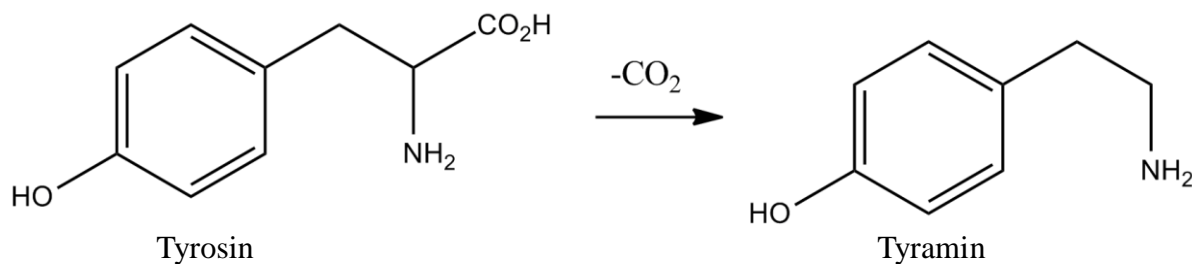


Obrázek č.4 Syntéza putrescinu

Zdroj: Anonym 3

3.3 Tyramin

Tyramin neboli p-hydroxyfenylethylamin se řadí mezi aromatické biogenní monoaminy. Ve výživě je důležitým zdrojem dusíku a prekurzorem pro syntézu hormonů, nukleových kyselin a bílkovin. Tyramin je dekarboxylován z tyrosinu za pomoci mikrobiálního enzymu tyrosindekarboxylasa a následně může být degradován methylací na alkaloidy (BURDYCHOVÁ a DOHNAL, 2007).

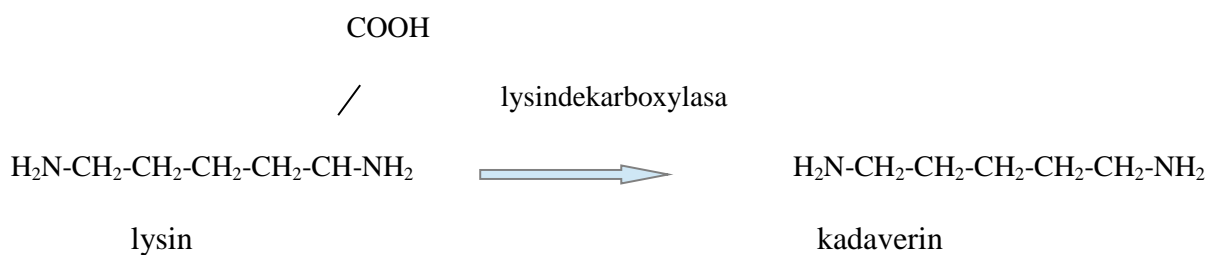


Obrázek č. 5 Syntéza tyraminu

Zdroj: Anonym 4

3.4 Kadaverin

Kadaverin neboli pentan-1,4-diamin se řadí mezi alifatické diaminy. Je však zařazován do skupiny polyaminů současně s putrescinem, sperminem a spermidinem. Bývá označován za mrtvolný jed a jeho toxické účinky lze přiřadit účinkům amoniaku. Kadaverin je syntetizován z lysinu a enzymatické reakce se zde účastní lysindekarboxylasa (ADÁMKOVÁ a PETŘIVALSKÝ, 2012).

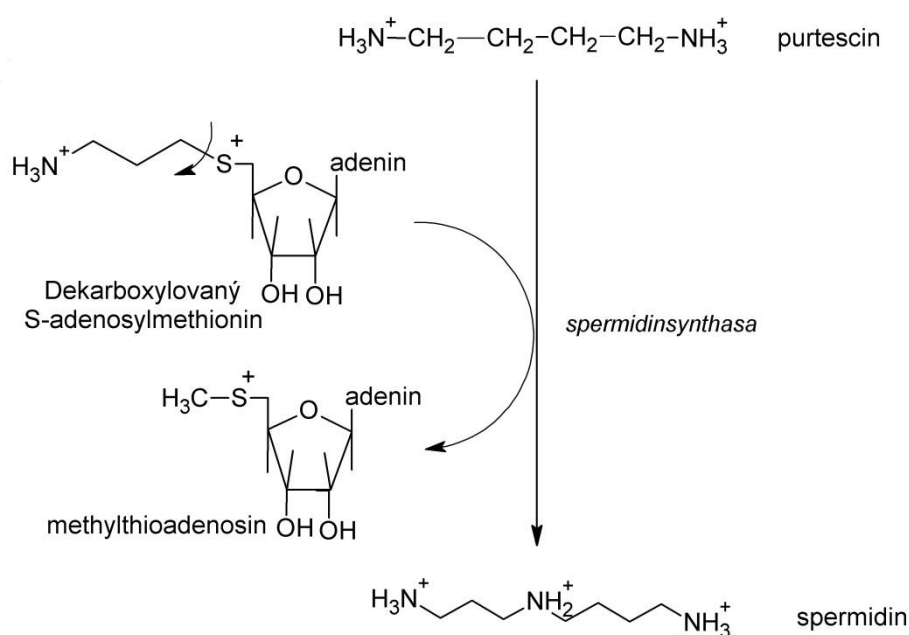


Obrázek č. 6 Syntéza kadaverinu

Zdroj: Anonym 5

3.5 Spermidin

Spermidin neboli [N-(3-aminopropyl)butan-1,4-diamin] řadíme mezi alifatické polyaminy. Nachází se v rybozomech a živých tkáních a podílí se na různých metabolických funkcích. Podílí se na růstu buněk a váže se na DNA a RNA. Spermidin je prekurzorem pro vznik sperminu. Sám vzniká syntézou z putrescinu za pomoci enzymu spermidinsyntáza, kdy putrescin reaguje s dekarboxylovaným S-adenosylmethioninem za vzniku spermidinu a methylthioadenosinu. Polyaminu jsou obecně oxidovány polyaminoxidázou až na CO_2 a NH_4^+ (ADÁMKOVÁ a PETŘIVALSKÝ, 2012).

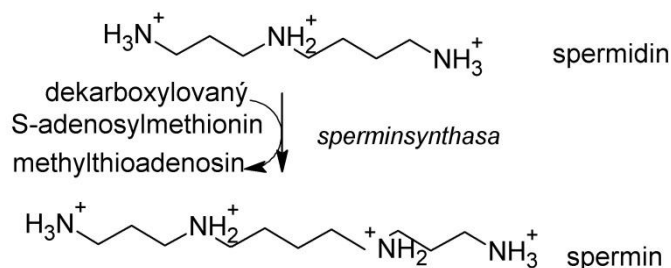


Obrázek č. 7 Syntéza spermidinu

Zdroj: Anonym 6

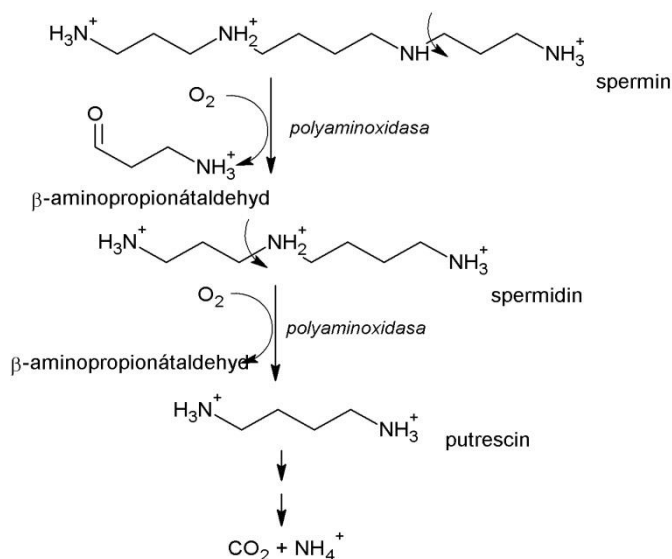
3.6 Spermin

Spermin neboli [N,N'-bis(3-aminopropyl)butan-1,4-diamin] se řadí stejně jako spermidin mezi alifatické polyaminy. Nachází se v eukaryotických buňkách a účastní se buněčného metabolismu. Je spojen s nukleovými kyselinami a je hlavním faktorem růstu některých bakterií. Tvoří především charakteristickou vůni spermatu. Je syntetizován ze spermidinu pomocí sperminsyntázy, kdy spermidin reaguje s dekarboxylovaným S-adenosylmethioninem za vzniku methylthioadenosinu a sperminu. Spermin je oxidován polyaminoxidázou až na CO_2 a NH_4^+ (ADÁMKOVÁ a PETŘIVALSKÝ, 2012).



Obrázek č. 8 Syntéza sperminu

Zdroj: Anonym 7



Obrázek č.9 Oxidace polyaminů

Zdroj: Anonym 8

3.7 Škodlivost biogenních aminů

Jak již bylo uvedeno výše biogenní aminy (BA) jsou pro organismu nepostradatelné a zastávají mnoho významných metabolických a biologických funkcí v organismu, ale při konzumaci nadměrného množství těchto látek se může u citlivých jedinců projevit alimentární intoxikace. Obsah biogenních aminů již v desetínách procent potlačuje bachorovou faunu a podílí se na tvorbě predispozic vzniku zánětu paznehtů a může dojít k ohrožení fyziologického vývoje plodu v posledním trimestru gravidity (MRÁZ, 2010)

Jako metabolicky velmi účinné látky mohou biogenní aminy negativně ovlivňovat činnost ledvin, jater, pohlavního aparátu, střevní sliznice a končetin (POŠTULKA, 2011).

V důsledku příjmu narušené siláže dochází k jednoduché indigesci v předžaludku, která má za následek sníženou aktivitu bachorové mikroflóry. V některých případech může dojít až k subklinické alkalóze bachorového obsahu, což má za následek sníženou produkci mléka a vznik syndromu snížené koncentrace bílkovin v mléce, a také bývá v mléce zvýšený obsah somatických buněk což má za následek zvýšenou predispozici pro vznik mastitid. Biogenní aminy mají vazomotorní a prozánětlivé účinky a podporují vznik laminitidy, což je zánět na škáře paznehtní a tím se zhoršuje zdravotní stav paznehtů (ILLEK, 2008).

Normální příjem biogenních aminů je metabolizován v trávicím traktu velmi výkonných detoxikačním systémem za pomoci aktivity enzymů monoaminoxidázy (MAO), diaminoxidázy (DAO) a histidinmethyltransferázy (HMT). Avšak při nadměrném příjmu BA nemusí detoxikační kapacita systému stačit a tyto látky se stávají pro organismus toxické. BA mohou být prekurzory karcinogenních N-nitroso sloučenin.

Tyramin je nejvýznamnějším vazomotorním biogenním aminem, jeho nadměrný příjem může způsobovat zvýšení krevního tlaku s možným důsledkem hypertenzní krize, migrény a v krajních případech až krvácení do mozku popřípadě selhání srdce.

Histamin a jeho negativní účinek na organismus je poměrně různorodý. Jeho vazba na receptory cévní stěny vyvolává dilataci hladké svaloviny periferních krevních cév důsledkem toho, dochází k poklesu tlaku. Na druhé straně v interakci s receptory střevní stěny dochází ke kontrakci hladké svaloviny střeva, což se projevuje křečemi v břiše, průjemy popřípadě zvracení. Na histamin však může také vzniknout intolerance a k typickým projevům patří kopřivka, zrudnutí očí, dechové potíže a svalový třes. Toxický účinek histaminu závisí na přijatém množství ostatních biogenních aminů a na aktivitě aminooxidáz.

Polyaminy jsou velmi fyziologicky významné při růstu a diferenciaci buněk, jak již bylo uvedeno. Na jedné straně se toho dá využít k urychlení hojení ran, ale na druhé straně jsou v posledním desetiletí polyaminy intenzivně studovány z hlediska karcinogeneze (KOMPRDA, 2005; STANDAROVÁ a kol., 2008).

3.7.1 Laminitida

Laminitida neboli zánět škáry paznehtní můžeme rozdělit do dvou velkých skupin a to: infekční záněty kůže prstenu, a nebo onemocnění rohového pouzdra. Laminitida byla popsána u mnoha živočišných druhů, ale nejčastěji se vyskytuje u skotu a koní. Ačkoliv se

nejčastěji popisuje u dojnic, byla zaznamenána u všech věkových kategorií u samčího a samičího pohlaví. Za nejčastější příčinu laminitidy je dnes považována bachorová acidóza (může vznikat při zkrmování nekvalitní siláže). Za příčinu se, ale také považuje histamin, který se uvolňuje z proteinů krmné dávky. Na tomto se podílí také bakterie *E. coli*, která je schopná dekarboxylovat aminokyselinu histidin na histamin (NOVÁK, 2010).

3.8 Limity a měření

Limity pro toxické dávky biogenních aminů je obtížné stanovit. Velice závisí na individuálních rozdílech mezi jedinci, zastoupení jednotlivých biogenních aminů v dané potravíně, zkonsumované množství a přítomnost jiných potencionálních složek, jako je například alkohol. Pro histamin by měla být toxická dávka asi 70 – 100 mg/kg potravy, pro tyramin asi 20 – 80mg/kg. Uvádí se, že celkový obsah tyraminu + histaminu + putrescinu + kadaverinu v dané potravíně by neměl překročit 900 mg/kg. S touto hodnotou souvisí i legislativní omezení nejvyššího přípustného množství. V současné době je ovšem vyvíjen tlak na Evropskou komisu, aby byly limity pro biogenní aminy zavedeny rovněž pro krmiva určená ke krmení hospodářských zvířat.

Do roku 2004 obsahovala Česká legislativa limity pro vybrané biogenní aminy v rybách, sýrech, pivu a vínu, ale dnes již toto nařízení neplatí a je v České Republice platný jen hygienický limit pro histamin v rybách a výrobcích z nich uváděný v nařízení Komise (ES) č. 2073/2005 ve výši 100 mg/kg. Tyto legislativní limity nejsou stejné pro všechny země (KOMPRDA, 2005; STANDAROVÁ a kol., 2008).

Legislativa také ukládá provozovatelům krmivářských podniků vyrábět bezpečná krmiva, to jsou taková, která po zkrmení zvířatům neškodí zejména zvířatům ani lidem (přes produkty zvířat). Státní veterinární správa nedisponuje žádnou limitní hodnotou pro hodnocení fermentačního procesu siláží. Takže pokud by se jednalo o podezření na vadnou siláž, je dle veterinárního zákona kompetentní příslušný veterinární orgán posoudit nezávadnost siláže například odebráním vzorku, sensorickým posouzením nebo na základě výsledků laboratorního vyšetření, ale není žádný závazný interní předpis na hodnocení zdravotní závadnosti siláží (ZEMAN a kol., 2010).

Jako nelegislativní jsou limity pro hodnocení siláže uvedeny v ČSN 46 7092, ve které je uvedeno hodnocení jakosti fermentačního procesu siláže, kde se kromě smyslového posouzení hodnotí siláž podle poměrů obsahu silážních kyselin a také podle stupně

proteolýzy. Výsledná siláž je potom zařazena do pěti jakostních tříd, a to: výborná, zdařilá, méně zdařilá, nezdařilá a nevhodná ke krmení. V závěru nám vyplývá, že v současné době nejsou žádné závazné legislativní limity pro hodnocení fermentačního procesu siláží, ale mimo jiné lze doporučit bezpečnostní hodnocení siláží podle stupně proteolýzy, a to podle nařízení Komise č. 429/2008, kde jedním z povinně testovaných kritérií je koncentrace čpavku z celkového obsahu dusíku (ZEMAN a kol., 2010).

Měření biogenních aminů v siláži je velmi obtížný a nákladný proces, a proto se velmi často uvádí jako významný indikátor kvality siláže obsah amoniaků z obsahu celkového dusíku (NAVRÁTIL, 2010).

Je možné orientačně stanovit dekarboxylázovou aktivitu a tvorbu aminů za použití MDA bujónu a MDA agaru. Tato plotnová metoda ukazuje dobrou korelaci s chemickým rozbohem a díky její jednoduchosti je vhodná jako citlivá metoda pro zkoušení produkce biogenních aminů kmeny bakterií mléčného kvašení i dalšími mikroorganismy (ČERNÝ a kol., 2009).

3.9 Přejchod do živočišných produktů

Prekurzory pro vznik aminů jsou klostridie, ty vytváří spory, které snadno přechází do mléka. Jejich přímý vliv na zdraví zvířat a lidí je však méně patrný než kvalitativní změny a složení krmiv (DOLEŽAL a kol., 2009). Některé druhy klostridií jsou tedy významné i pro potravinářství zejména sýrařství. Během dlouhé doby zrání sýru se může vlivem klostridií projevit pozdní duření sýru, které je způsobeno vývojem a růstem spor a později také aktivitou vegetativních buněk klostridií. Vznikají plyny, které způsobují duření sýru, v extrémních případech může nastat puknutí sýru. Toto pozdní duření se projevuje především u sýrů s dlouhou dobou zrání. V sýrech s vadou pozdního duření se nejčastěji vyskytují *Clostridium butyricum* a *Clostridium tyrobutyricum* (RITTICH a kol., 2011).

Pozornost musí být také věnována tomu, že aminokyseliny (AMK) jsou prekurzory biogenních aminů, které jsou na rozdíl od AMK zdraví škodlivé a mohou být tvořeny také laktobacily. Takovéto laktobacily musí být ze skupiny obligátně i fakultativně heterofermentativních a musí být vybaveny dekarboxylázou. Biogenní aminy produkují za různých podmínek v různém množství. Uvádí se, že tvorba dekarboxyláz je indukována v prostředí bohatém na prekurzory biogenních aminů jako jsou AMK a jejich kofaktory. Takovým to vhodným prostředím je například zrající sýr (HAVLÍKOVÁ a kol., 2013).

Obsah biogenních aminů v syrovém mléce je velmi nízký, následné zvyšování je spojováno především se zrácím procesem při výrobě sýrů, v nichž se ze všech mléčných výrobků nacházejí nejčastěji. Uvádí se, že až 1g/kg sýra. Tvorba biogenních aminů v sýrech závisí na mnoha faktorech. Může to být například obsah aminokyselin a peptidů v mléce, na přítomnosti bakterií s dekarboxylázovou aktivitou, na pH, použité technologii, době zrání a skladování, množství mikroorganismů a přítomnosti kofaktorů (pyridoxalfosfát). Vznik toxického množství biogenních aminů je podmíněnou proteolýzou, která je považována za jeden z nejdůležitějších pochodů ovlivňujících kvalitu sýra při zrání. Na proteolýze mléčných bílkovin se podílejí nativní proteázy mléka, syřidlové enzymy, proteázy kyselých kultur a proteázy kontaminující mikroflóry. Vysoké hodnoty obsahu biogenních aminů mohou sloužit jako indikátor zhoršení procesu nebo nedodržení předepsaného procesu výroby (ČERNÝ a kol., 2009).

Bylo prokázáno, že obsah biogenních aminů je významně vyšší ve vnějších částech sýra, při zrání pod fólií než v jádru sýra. Byl prokázán vliv doby zrání na obsah biogenních aminů, po 18 týdnech zrání byl v sýrech holandského typu výrazně překročen stanovený toxikologický limit pro tyramin, proto jednotlivci trpící potravinovou intolerancí nebo užívají inhibitory monoaminoxidáz, by se měli vyhnout konzumaci takovýchto zrajících sýrů (KOMPRDA a kol., 2007).

4 ELIMINACE BIOGENNÍCH AMINŮ

Z ekonomického hlediska je v našem zájmu dodržovat správné technologické postupy při silážování, abychom docílili dobré kvality siláže. Při špatné kvalitě siláže dochází nejen ke ztrátám výživové hodnoty krmiva, ale i k poklesu produkce a zhoršení zdravotního stavu dojníc. Je tedy v našem zájmu dbát na celý proces silážování, včetně použití správných inokulantů a zásad skladování. A je potřeba zohlednit i technologii krmných vozů kvůli kvalitě silážní stěny.

4.1 Konzervace – pH, inokulanty

Vlastní proces konzervace je velmi složitý biochemicko-mikrobiální proces, který je ovlivňován celou řadou interakcí. Při kvasném procesu dochází k uvolnění cukernatého buněčného obsahu, který slouží jako zdroj výživy pro bakterie mléčného kvašení. Pro proces rychlého okyselení se předpokládá dostatečný obsah lehce rozpustných cukrů, z nich bakterie mléčného kvašení vytváří kyselinu mléčnou, která má hlavní konzervační účinky. Proces okyselení silážované hmoty by měl být velmi rychlý, aby neměly přítomné nežádoucí skupiny konkurenčních mikroorganismů mnoho času na štěpení živin a produkci nežádoucích produktů. Proto je hodnota pH hlavním ukazatelem stupně prokvašení, stability a kvality siláže. U zavadlých pícnin se sušinou 35 – 40% by se měla hodnota pH pohybovat pod 4,5. Pro siláže ze silně zavadlých pícnin, kde je sušina 45 – 50% je typická hodnota pH 5 (DOLEŽEL a kol., 2001).

Složení mikroflóry v silážované hmotě není nikdy naprosto stejné, a proto vznikl záměr aktivně ovlivňovat průběh fermentace a také aerobní stability. Od 80. let se rozvíjí postup řízení fermentačního procesu masivním přidavkem vhodných kultur mléčných bakterií. Což znamená podstatně zvýšit počet žádoucích mikroorganismů, kterých je v silážované hmotě nedostatek. Tento postup označujeme jako očkování neboli inokulace. Takto přidané bakterie mléčného kvašení by měli splňovat několik podmínek, a to například: rychlý růst a prosazení oproti konkurenci, stát se brzo dominantními, homofermentativnost, musí dobře snášet kyselé prostředí a co nejdříve dosáhnout pH 4,0, musí zkvašovat sacharid, ale nesmí zkvašovat organické kyseliny a musí být životaschopné v širokém rozsahu teplot, nesmí štěpit bílkoviny ani volné AMK. Do některých inokulantů jsou přidávány také bakterie propionového kvašení, které mají za úkol vytvořit určité množství kyseliny propionové pro potlačení kvasinek a plísní (KALACĚ, 2009).

Inokulanty neboli probiotika jsou biologické silážní konzervanty, které mohou být bakteriální nebo bakteriálně-enzymatické s přidavkem enzymů hydrolytických nebo oxidoredukčních. Mohou obsahovat i prebiotika, které mají za úkol podpořit rozvoj žádoucích mikroorganismů dodáním dobře dostupné startovací energie. Dále se mohou přidávat antioxidanty, které mají za úkol tvořit příznivé prostředí pro mikroorganismy v prvních minutách až hodinách silážního procesu. Také různé adsorbenty a lubrifikanty, které zlepšují rovnoměrnou aplikaci přípravku. Kvalita silážních přípravku se v České republice nestanovuje, hodnotí se jen výsledná výživná hodnota a kvalita fermentačního procesu (LOUČKA, 2010).

Bakterie mléčného kvašení rozdělujeme na homofermentativní a heterofermentativní, které mají za úkol připravit prostředí pro homofermentativní bakterie mléčného kvašení, které se déle množí a mají vyšší intenzitu množení, až při kyselosti pod 4,5 pH. Na rozdíl od chemických konzervantů jsou inokulanty levnější, neplatí pro ně tak přísné požadavky, do silážované hmoty přidáváme menší množství, nepodporují korozi strojů, siláže lze zkrmovat minimálně o dva týdny dříve než u chemických konzervantů (LOUČKA, 2010).

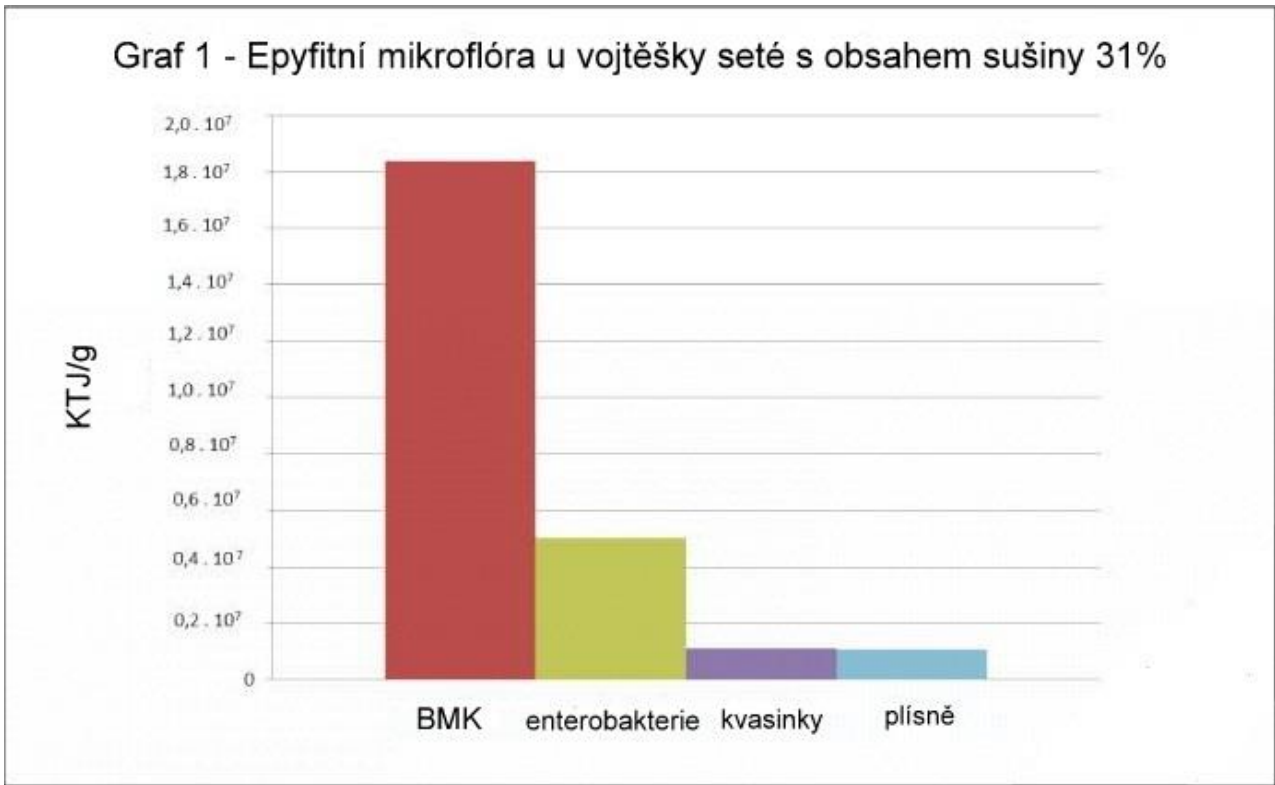
Pro dosažení kvalitní a rychlé fermentace je zásadní, aby měly bakterie mléčného kvašení dostatek fermentovatelných substrátů, což může být problém u středně a obtížně silážovatelných materiálů s vysokým obsahem dusíkatých látek a nízkým obsahem energetických složek. V tomto případě je možné použít inokulanty s příměsí celulolytických enzymů, které štěpí složité polysacharidy na jednodušší frakce, čímž zpřístupňují živiny pro činnost bakterií mléčného kvašení, a ty jsou pak schopny produkovat dostatečné množství kyseliny mléčné. Tyto enzymy by také měly zajišťovat zvýšený příjem sušiny a vysokou produkční účinnost takto konzervovaných krmiv. Abychom byli schopni silážovanou hmotu správně ošetřit sledujeme celkovou inokulační dávku bakterií na 1g hmoty, která se většinou uvádí v CFU/g (NOVOTNÝ a PLEYER, 2012).

Přidání inokulantů je důležité pro zajištění rychlé fermentace což vede ke snížení tvorby vedlejších produktů a ke snížení množství prokvašených cukrů, což má za následek snížení ztrát sušiny. Ve srovnání s neošetřenou siláží je možné snížit ztráty sušiny o 10 – 15 %. Neošetřené siláže umožňují proteolytickým bakteriím degradovat řetězce proteinů na aminokyseliny a dále na amoniak a biogenní aminy. Zajištěním rychlé fermentace zajišťujeme i snížení proteolýzy (BERKA, 2009).

4.2 Podíl sušina v silážované hmotě

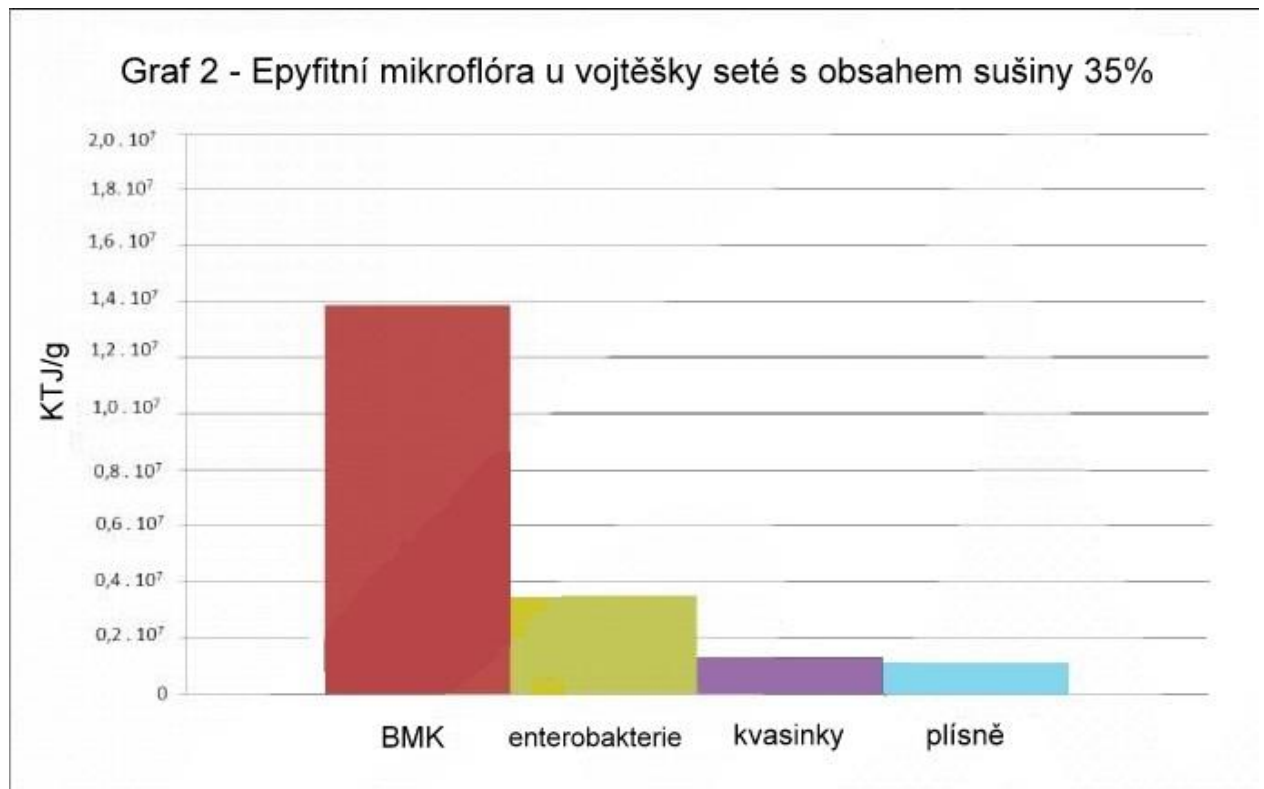
Výše uvedená hodnota pH je v relaci s obsahem sušiny, protože platí zásada, že s rostoucí sušinou klesá kyselost, a tudíž se zvyšuje i hodnota pH (DOLEŽAL a kol., 2001). Obsah sušiny v silážované hmotě je jedním z nejdůležitějších faktorů, kterými lze výrazně ovlivňovat průběh fermentace, ale i výslednou kvalitu siláže. U bílkovinných siláží je nezbytné rychlé zavádání na optimální obsah sušiny, kdy se redukuje činnost nežádoucí konkurenční mikroflóry. Pokud máme nízký obsah sušiny je třeba k hmotě přidávat biologická aditiva, která se ne vždy setkávají s požadovaným účinkem. Pícniny, které mají nízký obsah sušiny jsou většinou velmi těžce silážovatelné a průběh fermentace bývá většinou bouřlivý s vysokou koncentrací kvasných kyselin, včetně kyseliny máselné. Také dochází k velkým ztrátám sušiny, energie a živin v důsledku ztráty silážních šťáv. Naopak pícniny s extrémním obsahem sušiny vyšším než 50 – 60% bývají také velkým problémem. Takové siláže bývají nestabilní s vysokou hodnotou pH. Snadno se zahřívají a mají zpravidla nízkou koncentraci kyseliny mléčné a snadno podléhají plesnivění. Z těchto důvodů se za normálních podmínek doporučuje zavádání víceletých pícnin následovně: u vojtěšky nad 35% sušiny (může být v rozmezí 35 – 45%) a jetelovin nad 30% (taktéž se toleruje rozmezí do 45%). U trav by měl být obsah sušiny 30% (tolerance v rozmezí 28 – 40%), (DOLEŽAL a ZEMAN, 2011).

Obsah sušiny je významnější právě pro bílkovinná krmiva, která obsahují vysoký podíl dusíkatých látek a nízký obsah cukrů, proto je potřeba pro získání přijatelné kvality fermentačního procesu vyšší obsah sušiny, kde dochází ke zvýšení koncentrace sacharidů, potřebných pro správný rozvoj bakterií mléčného kvašení. V nedostatečně zaváděné hmotě nejsou vhodné podmínky pro aktivitu bakterií mléčného kvašení. Při zvýšení obsahu sušiny na 40 – 42% vznikali příznivější osmotické podmínky pro tyto bakterie. Proto zavádání vojtěšky na vyšší obsah sušiny, což je 35% je významnější z hlediska výskytu bakterií mléčného kvašení (MLEJNKOVÁ a kol., 2012).



Graf č. 1 Epifytní mikroflóra u vojtešky seté s obsahem sušiny 31%

Zdroj: Mlejnková a kol., 2012



Graf č. 2 Epifytní mikroflóra u vojtešky seté s obsahem sušiny 35%

Zdroj: Mlejnková a kol., 2012

4.3 Proteolýza – ztráta živin

Proteolýza je rozklad bílkovin přes aminokyseliny až na amoniak a biogenní aminy. Hlavními původci tohoto procesu jsou klostridie, které se vyskytují především v silážích s obsahem sušiny pod 30%. Při obsahu sušiny nad 35% je výskyt aktivních klostridií minimální (MIKYSKA, 2007).

Podle stupně proteolýzy se v dnešní době hodnotí kvalita fermentačního procesu převážně bílkovinných a polobílkovinných siláže. Stupeň proteolýzy se udává jako poměr mezi obsahem amoniakálního dusíku a celkového dusíku (LOUČKA, 2010).

Zvláštní pozornost by se měla věnovat jetelu červenému, který obsahuje enzym polyfenoloxydáza, který redukuje míru degradace bílkovin v průběhu silážního procesu. V tom má jetel v porovnání s vojtěškou a trávami při podobné úrovni výživy a fázi vegetačního vývoje, vyšší podíl nedegradovatelných bílkovin. A proto by se měl jetel zařazovat jako plodina při výrobě jetelových a jetelotravních siláží (MITRÍK a VAJDA, 2010).

Vyšší stupeň proteolýzy u bílkovinných siláží je zapříčiněn pomalejším okyselením a také pokud je pH vyšší než 4,5 jsou neustále dostatečné podmínky pro průběh proteolýzy. Pokud snížíme pH v siláži pod 4,5 proteolýza ustává. Pro zajištění rychlejšího okyselení používáme inokulanty, jak již bylo uvedeno výše. A pro zajištění stability siláže v silážním žlabu, bychom měli zajistit rychlý odběr materiálu, aby nedocházelo k aerobní degradaci siláže a nebo použít správnou technologii odběru hmoty ze silážní stěny. Pokud očekáváme pomalý odběr hmoty ze silážního žlabu, je možné použít chemický konzervant (DOUŠA, 2010).

Jak již bylo zmíněno stupeň proteolýzy je hodnotícím kritériem fermentačního procesu při silážování. Proto by neměl u vojtěškových siláží překročit hranici 8%. U siláží, kde překročil rozklad bílkovin 20%, je nutné na ně pohlížet jako na zdravotně závadné krmivo a nemělo by být zkrmováno žádným kategoriím skotu (POŠTULKA, 2011).

4.4 Technologie odběru krmiva ze silážní jámy

Další fází, kde může dojít k znehodnocení siláže rozkladem bílkovin je skladování v silážní jámě. Zde tvorbu biogenních aminů již nepodmiňují klostridie, jak tomu bylo v předchozí výrobní části, ale jsou to především mikroorganismy rodu *Enterobacter*, *Pseudomonas* a *Klebsiella* (SCHERER a kol., 2015).

Bylo zjištěno, že aktivita těchto mikroorganismů klesá se snižující se okolní teplotou (SANTOS, 1996). Toho lze dosáhnout správnou technologií odběru siláže ze silážní jámy. Momentálně nejrozšířenější technologií v rámci krmných vozů je systém vybírání frézou. Což má za následek vytrhávání materiálu ze silážní stěny. Poněkud viditelnější je to právě u bílkovinných siláží, které mají delší řezanku než u siláže kukuřičné. Fréza jednoznačně naruší silážní stěnu, která je poté méně stabilní, měkká a rozpadá se. Hlavním problémem je ovšem pronikání vzduchu do mezer, které vznikají vytržením materiálu a tím i zvyšování teploty v silážní stěně, kde dále mohou probíhat druhotné fermentační procesy a dochází tak k degradaci kvality siláže. K ještě markantnějšímu poškození silážní stěny dochází, pokud je použito vybírání hmoty z jámy nakladačem, kde dochází k nerovnoměrnému odebírání hmoty a narušení struktury stěny. Stěna je stejně jako u výběru frézou nesoudržná a rozpadající se.

Oproti tomu se na trhu objevuje krmný vůz od značky Trioliet, který má oproti ostatní konkurenci systém vybírání v podobě vyřezávacího ústrojí. Systém aktivním a pasivních nožů, je schopný seříznout stěnu od shora dolů a díky konstrukčnímu řešení vozu padá veškerý materiál dovnitř a nezůstávají tak nečistoty v jámě. Po seříznutí zůstává silážní stěna pevná a tvrdá, bez mezer a viditelných známek vytržení materiálu ze stěny. Což je patrné na první pohled. Dále je zde však velký rozdíl teplot v silážní stěně oproti vybírání frézou, což by mohlo vést k eliminaci vzniku biogenních aminů již u skladované hmoty. Je to ovšem pouze domněnka, protože rozdíly v těchto dvou systémech vybírání, nebyli dosud testovány.

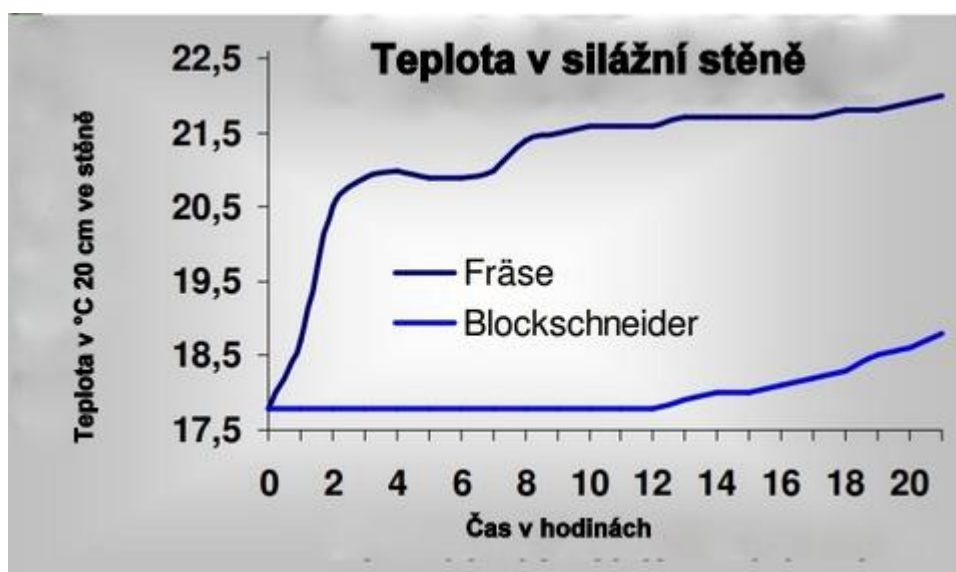
Z dostupných materiálů lze této úvaze přikládat váhu, i přesto že nejsou žádné laboratorní výstupy a zkušenosti jsou pouze teoretické. Přesto by se neměla tato skutečnost zanedbávat a měla by se jí věnovat větší pozornost, protože jak už bylo zmíněno výše biogenní aminy mohou být tvořeny i bakteriemi mléčného kvašení, které jsou v siláži žádoucí.



Obrázek č. 10 Silážní stěna vojtěškové siláže při vybírání frézou, Foto: Nela Jandeková
ZD Krásná Hora nad Vltavou, a.s.



Obrázek č. 11 Silážní stěna vojtěškové siláže při vybírání vykusovačem, Foto: Nela Jandeková
ZD Krásná Hora nad Vltavou, a.s.



Graf č. 3 Porovnání teplot 20 cm v silážní stěně v průběhu 20 hodin při vybírání frézou a vykusovačem

Zdroj: Dr. Olaf Steinhöfel, 2012

Tabulka č. 2 Produkce biogenních aminů v závislosti na teplotě okolí

Biogenní amin	Bakterie	Čas (h)	Teplota (°C)	Výsledek
Histamin	Klebsiella pneumoniae UH-2	0 - 24	37	Detekováno
Histamin	Klebsiella pneumoniae UH-2	0 - 24	25	Detekováno
Histamin	Klebsiella pneumoniae UH-2	12 - 72	10	Detekováno
Histamin	Klebsiella pneumoniae UH-2	24 - 144	2	Nedetekováno
Putrescin	Enterobacter cloacae	24	20	Detekováno
Putrescin	Enterobacter cloacae	24	10	Nedetekováno
Kadaverin	Klebsiella pneumoniae	24	20	Detekováno
Kadaverin	Klebsiella pneumoniae	24	10	Detekováno v menší míře
Histamin	Pseudomonas marginis	1 měsíc	1	Nedetekováno
Histamin	Pseudomonas vulgaris	1 měsíc	1	Nedetekováno
Histamin	Hafnia spp.	1 měsíc	1	Nedetekováno

Zdroj: Scherer a kol., 2015

5. ANALÝZA

Analýza biogenních aminů je velmi náročná což je dáno jejich složitou strukturou. Pro stanovení biogenních aminů se nejčastěji používají chromatografické metody jako je tenkovrstvá chromatografie (TLC), iontově-výměnná chromatografie, kapalinová chromatografie (HPLC) a plynová chromatografie (GC). Mohou být také použity metody na základě elektromigračních pochodů, jako je například kapilární elektroforéza a nebo metody imunoenzymatické (ZÍTKA a kol., 2015).

5.1 Chromatografie

Termín chromatografie vznikl složením dvou řeckých slov: chroma – barva a graphein – psaní. První zmínky o separační technice zvané chromatografie přinesl ruský botanik Michal Semjonovič Cvět. Jeho práce však zůstala po dlouhá léta bez povšimnutí. Teprve v 30. letech minulého století došlo ke znovuobjevení této metody. Zasloužili se o to Martin a Synge, kteří byli za svojí práci v roce 1952 odměněni Nobelovou cenou, a tím započala éra moderní plynové a kapalinové chromatografie (ŠVEC, 2009).

Účelem chromatografie je co nejdokonaleji rozdělit jednotlivé složky v určité směsi a v roce 1993 byla IUPACem definováno jako: „Chromatografie je fyzikální separační metoda, při níž jsou separované složky distribuovány mezi dvěma fázemi, z nichž jedna je stacionární, zatímco druhá se pohybuje v daném směru.“ Pomocí chromatografie lze tedy analyzovat nebo preparovat látky od nejjednoduchých plynů až po homologické polymery, buňky, biomolekuly, viry, a nebo částice, často i s přihlédnutím na isotopovou, isomerní, iontovou nebo chirální povahu, také i k velikosti a tvar. Objevení chromatografie vyvolalo i vznik průmyslové výroby nových vědeckých a měřicích strojů (JANÁK, 2011).

V roce 1952 došlo k prosazení plynové chromatografie, což otevřelo cestu k rozvoji teoretických postupů díky ideálnějšímu chování molekul v plynném stavu. Vývoj chromatografie, ale samozřejmě není izolovaný proces. Zároveň s ním probíhá současně i vývoj dalších separačních a spektrálních metod, mezi nejhlavnější patří elektroforéza a hmotnostní spektrometrie. Proces chromatografie v podstatě charakterizuje několik hlavních procesů a to: sorpce, distribuce alespoň mezi dvěma fázemi, difuze, přenos hmoty a tyto procesy jsou porušovány pohybem fáze nebo fází (JANÁK 2011).

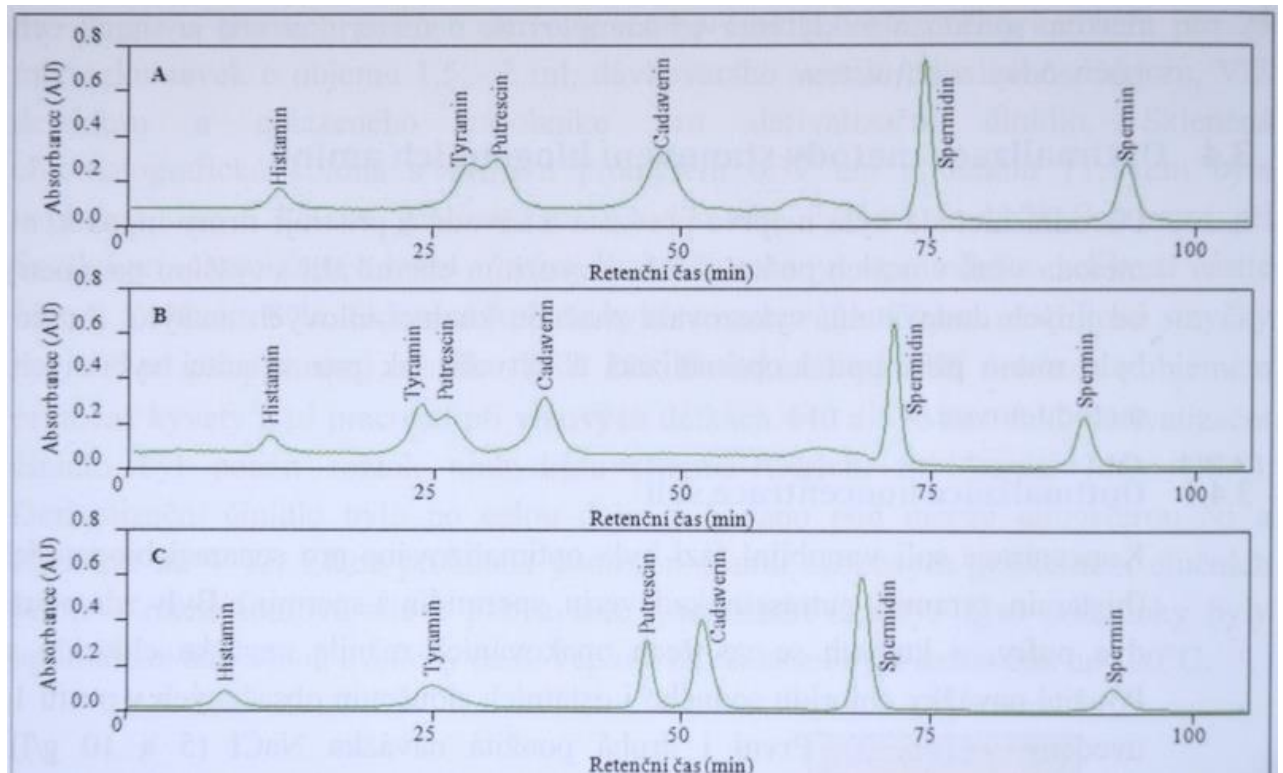
5.2 Stanovení biogenních aminů

Jak již bylo zmíněno výše stanovení biogenních aminů je velmi náročný proces, kvůli složité struktuře biogenních aminů. Jedním ze způsobu jak stanovit biogenní aminy ve fermentovaných výrobcích je metoda vysokotlaké kapalinové chromatografie, kdy bylo použita extrakce 0,1 M HCl a předkolonová derivatizace dansylchloridem, tato metoda se ukázala vhodná pro stanovení toxikologicky významných biogenních aminů. Derivatizace mohla být prováděna také ftalaldehydem (KOMPRDA a kol.,2014).

Pro stanovení může být použit kapalinový chromatograf HP 1100. Odebrané vzorky se homogenizují v mixeru a poté jsou 2 minuty extrahovány v 15 ml 5% kyseliny trichloroctové (TCA) ponorným mixérem při rychlosti 3. Suspenze se následně odstředí při 3000 rpm 10 min při 4°C v centrifuze. Supernatant je poté filtrován přes papírový filtr a tuhý zbytek znovu 2x extrahován stejným způsobem. Spojené extrakty doplníme 50 ml vody. A tento extrakt před derivatizací přefiltrujeme přes jednorázový nylonový membránový filtr. Poté jsou vzorky derivatizovány ftalaldehydem (OPA) nebo dansylchloridem (DCI). K identifikaci separovaných látek ve vzorcích použijeme porovnání retenčních časů standardů a látek ve vzorku. Během analýzy snímáme UV spektra látek eluovaných v maximu píku, které pak srovnáme se spektry standardních látek na základě tzv. faktoru shodnosti, byla potvrzena nebo vyvrácena identita látek. Ovšem spermin a spermidin nereagují s ftalaldehydem, a proto je jejich stanovení možné pouze po derivatizaci dansylchloridem. Na druhou stranu příprava vzorků pro derivatizaci ftalaldehydem je výrazně jednodušší, vyžaduje podstatně méně času a dovoluje plnou automatizaci při využití inteligentních automatických dávkovačů (SMĚLÁ a kol., 2004).

Další metoda, kterou můžeme použít pro stanovení biogenních aminů, je metoda iontově-výměnné chromatografie, která pracuje na principu výměny iontů mezi mobilní a stacionární fází na základě rozdílných nábojů. Vzorky rozdrtíme v třecí misce za pomoci působení tekutého dusíku a následně je homogenizujeme s 2 ml deionizované vody. Následně vzorky inkubujeme při 25°C po dobu 60 minut na termomixu. Po inkubaci vzorek centrifugujeme při 4°C po dobu 10 minut. Odebereme supernatant a takto připravený vzorek analyzujeme na iontově-kapalinové chromatografii s VIS detekcí. Metoda převzatá z návodu k přístroji není dostatečná a tak došlo k optimalizaci této metody a to optimalizací koncentrace soli. V této metodě se ukazuje jako nejvhodnější přídavek 15 g NaCl, kde dochází k dostatečné rozseparaci všech testovaných analytů.

Detekce biogenních aminů provádíme na Automatickém analyzátoru aminokyselin (ZÍTKA a kol., 2015).



Obrázek č.12 Chromatogramy znázorňující vliv přidavku NaCl
(A) 5g NaCl, (B) 7,5g NaCl, (C) 15g NaCl

Zdroj: Zítka a kol., 2015

6 ZÁVĚR

Vznik biogenních aminů v silážích je zapříčiněn převážně lidským faktorem. Celý koloběh je uzavřen a začíná a končí hnojením. Pokud hnojíme kejdou z vlastního podniku, dostávají se spory klostridií přítomné ve výkalech, na louku do půdy, která je domovským stanovištěm klostridií. Při nesprávném technologickém postupu sečení a shrnování píce dochází ke znečištění silážované hmoty kontaminovanou hlínou. Dále se hlína dostává na kola převozního prostředku, a tím i do silážního žlabu, kde dochází k dalšímu kontaktu silážované hmoty s hlínou. Při nezajištění dostatečně rychlého průběhu fermentace přidáním správných inokulantů dochází ke zmnožení klostridií, které zanechávají v siláži spory a tvoří již zmíněné biogenní aminy. Zkrmováním takto znehodnocené siláže dochází ke zhoršení zdravotního stavu zvířat a spory, které projdou trávicím traktem, odchází z těla ve výkalech, které jsou znovu aplikovány na louku, a koloběh se opakuje.

Proto by se při výrobě siláže mělo dbát zejména na dodržování správných technologických a hygienických postupů. Dnešním trendem je přidávat do siláží více biologických a chemických konzervantů, přitom v dřívějších dobách bylo množství přidávaných konzervantů nižší. V současnosti je udáván důraz zejména na ekonomiku, což znamená zkrmit vše i za cenu nižší výživové kvality. I přesto, že siláž obsahující biogenní aminy může působit různé zdravotní problémy včetně zánětů pažnehtů až po vznik různých nádorů.

Odvětví biologických a chemických konzervantů je dle mého názoru dostatečně prozkoumáno, ale právě možná eliminace vzniku biogenních aminů z pohledu různých technologií použitých při výrobě siláže není dostatečně zmapována. Stejně jako stanovování již vzniklých biogenních aminů v silážích.

PŘÍLOHY

Literární zdroje

ADÁMKOVÁ, Š. a M. PETŘIVALSKÝ. Vztah metabolismu a signálních funkcí oxidu dusnatého a polyaminů v rostlinách. *Chemické listy*. 2012, **106** (3), str. 166 - 173.

BERKA, T. Jak zvýšit utilizaci živin konzervovaných krmiv? *Náš Chov*. 2009, **LXIX** (03/2009), 80 - 81.

BURDYCHOVÁ, R. a V. DOHNAL. Využití HPLC ke stanovení produktu exprese genu pro mikrobiální tyrosindekarboxylasu. *Chemické listy*. 2007, **101** (11), str. 907 - 910.

ČERNÝ, V., E. KVASNIČKOVÁ, Š. HAVLÍKOVÁ a L. KALHOTKA. Výskyt mikroorganismů s dekarboxylázovou aktivitou v sýrech. *Mlékařské listy*. **2009** (116), 16 - 18.

DOLEŽAL, P., J. DVOŘÁČEK a L. ZEMAN. Problematika kvality siláží a silážních aditiv. In: *Úroda* [online]. Brno: Profi press, 2001 [cit. 2016-04-18]. Dostupné z: <http://uroda.cz/problematika-kvality-silazi-a-silaznich-aditiv/>

DOLEŽAL, P. a L. ZEMAN. Objemná krmiva a hlavní zásady pro zlepšení jejich kvality. *Krmivářství*. 2011, **XV** 02/2011), str. 25 - 27.

DOLEŽAL, P., L. ZEMAN, J. SKLÁDANKA, L. KALHOTKA, J. NEDĚLNÍK a J. DVOŘÁČEK. Nebezpečí v krmivech má hodně podob. *Krmivářství*. 2009, **XVII** (09/2009), str. 10 - 14.

DOUŠA, M. 7500 litrů mléka z objemu - sen, či skutečnost? *Farmář*. 2010, **16** (04/2010), 35 - 36.

HAVLÍKOVÁ, Š., E. KVASNIČKOVÁ a F. BUŇKA. Testování vlivu bakteriálního izolátu potlačujícího růst biogenních aminů při poloprovozních výrobách sýrů. *Mlékařské listy*. **2013**(137), 1-5.

HORKÝ, P., Š. HOŠKOVÁ a M. BALABÁNOVÁ. *Škodlivé mikroorganismy v zemědělství*. 1. vydání. V Brně: Mendelova univerzita, 2014. ISBN 978-80-7375-965-0.

- ILLEK, J. Zdravotní rizika zkrmování nekvalitních siláží. *Náš chov*. 2008, **LXVIII** (04/2008), 84-86.
- JAMBOR, V. Čtyři druhy ztrát vyrobených siláží. *Zemědělec*. 2010, **XVIII** (17/2010), 18 - 19.
- JANÁK, J. Zamyšlení nad chromatografií. *Chemické Listy*. 2011, **105** (4), 285 - 314.
- JEŽKOVÁ, A. Jak vyrábět siláže bez ztrát živin? *Zemědělec*. 2010, **XVIII** (10/2010), 26 - 27.
- KÁBRT, J. a J. LAZAR. *Výživa a dietetika hospodářských zvířat: vysokoškolská učebnice pro veterinární fakulty vysokých škol zemědělských*. 1. vyd. Praha: SZN, 1963. Živočišná výroba (Státní zemědělské nakladatelství).
- KALÁČ, P. Inokulanty v procesu silážování. *Zemědělec*. 2009, **XVII**(15/2009), 15 - 17.
- KOMPRDA, T. Biogenní aminy a polyaminy ve fermentovaných potravinách živočišného původu. *Veterinářství*. 2005, **55**(10/2005), str. 646-650.
- KOMPRDA, T., D. SMĚLÁ, K. NOVICKÁ, L. KALHOTKA, K. ŠUSTOVÁ a P. PECHOVÁ. Content and distribution of biogenic amines in Dutch-type hard cheese. *Food Chemistry*. 2007, **XL**(102), 129 - 137. ISSN 0308-8146.
- KOMPRDA, T., V. DOHNAL a O. CWIKOVÁ. Chromatografické stanovení biogenních aminů a polyaminů ve zrajících sýrech. *Chemické Listy*. 2014, **108**(12), 1140 - 1144.
- LOUČKA, R. Konzervace píče: o peněžích a kvalitě. *Zemědělec*. 2010, **XVIII**(15/2010), 15 - 18.
- LOUČKA, R. Odhady ztrát při procesu senážování. *Zemědělec*. 2010, **XVIII**(11/2010), 14 - 15.
- LOUČKA, R. Od řezanky po dokonalou izolaci hmoty. *Zemědělec*. 2012, **XX**(14/2012), 13 - 16.
- MALONE, M. H., METCALFE, D., D. Histamine in foods: Its Possible Role in Non-Allergic Adverse Reactions to Ingestants. *NER Allergy Proc*, 1986, Vol. 7, No. 3, p. 241-245.
- MARTÍNKOVÁ, J. *Farmakologie pro studenty zdravotnických oborů*. 1. vyd. Praha: Grada, 2007. ISBN 978-80-247-1356-4.

- MATOUŠ, B. *Základy lékařské chemie a biochemie*. 1. vyd. Praha: Galén, c2010. ISBN 978-80-7262-702-8.
- MIKYSKA, F. Správná konzervace objemných krmiv. In: *Zemědělec* [online]. Brno: Profi press, 2007 [cit. 2016-04-18]. Dostupné z: zemedelec.cz/spravna-konzervace-objemnych-krmiv-2/
- MITRÍK, T. a V. VAJDA. Objemové krmivá a ich kvalita - IX. *Náš Chov*. 2010, **LXX** (11/2010), 20 - 21.
- MLEJNKOVÁ, V., M. FRÖHDEOVÁ, L. KALHOTKA a P. DOLEŽAL. Vliv zavádění vojtěšky na složení epifytní mikroflóry. *Krmivářství*. 2012, **XVI**(02/2012), 16 - 18
- MRÁZ, S.. Vliv kvality konzervovaných objemných krmiv na zdravotní stav skotu. *Náš Chov*. 2010, **LXX**.(08/2010), 32-34.
- NAVRÁTIL, P. Hodnocení kvality proteinu v bílkovinných silážích aneb Není protein jako protein. *Náš Chov*. 2010, **LXX**(04/2010), 52-54.
- NOVÁK, M.. Vliv výživy na vznik laminitidy. *Zemědělec*. 2010, **XVIII**(32/2010), 14-15.
- NOVOTNÝ, D. a P. PLEYER. Tradičně se vyplatí spolehnout na osvědčené silážní inokulanty. *Náš Chov*. 2012, **LXXII**(03/2012), 64 - 66.
- POŠTULKA, R. Zdravotní nezávadnost objemných krmiv. *Zemědělec*. 2011, **XIX**(12/2011), 11-12.
- PŘIKRYL, J. Metabolické poruchy u skotu vliv objemných krmiv. *Krmivářství*. 2014, **XVIII** (06/2014), str. 12 - 13.
- RITTICH, B., M. CHROBOKOVÁ, B. GREGUŠOVÁ a A. ŠPANOVÁ. Identifikace kmenů bakterií rodu *Clostridium* izolovaných ze sýrů. *Mlékařské listy*. 2011, **2011**(129), 6-10.
- SANTOS, S. M. H., 1996. Biogenic amines: their importance in foods. *Int. J. Food Microbiol.* 29, 213–231.
- SCHERER, R., K. GERLACH a K. H. SÜDEKUM. Biogenic amines and gamma-amino butyric acid in silages: Formation, occurrence and influence on dry matter intake and ruminant production. *Animal Feed Science and Technology*. 2015, (210), 1-16.

SMĚLÁ, D., P. PECHOVÁ, T. KOMPRDA, B. KLEJDUS a V. KUBÁŇ. Chromatografické stanovení biogenních aminů v trvanlivých salámech během fermentace a skladování. *Chemické Listy*. 2004, **98** (7), 432 - 437.

STANDAROVÁ, E., I. BORKOVCOVÁ a L. VORLOVÁ. Obsah biogenních aminů v sýrech z české obchodní sítě. *Veterinářství*. 2008, **58**(11/2008), str. 735 - 738.

STRAKOVÁ, E., P. SUCHÝ a L. ZEMAN. Antinutriční látky vznikající v krmivech jako produkty fyzikálních, chemických a biologických procesů. *Krmivářství*. 2006, **X** (05/2006), str. 22 - 25

ŠVEC, F. Co dnes hýbe kapalinovou chromatografií? *Chemické listy*. 2009, **103** (4), 266 - 270.

TŘINÁCTÝ, J. *Hodnocení krmiv pro dojnice*. Vyd. 1. Pohořelice: AgroDigest, 2013. ISBN 978-80-260-2514-6.

VELECHOVSKÁ, J. Krmení skotu: Příprava směsné krmné dávky. *Farmář*. 2008, **14** (08/2008), 34 - 35.

WEISSBACH, F. Klostridie - zátěž konzervovaných krmiv. *Krmivářství*. 2006, **X** (06/2006), str. 29 - 31.

ZEMAN, L. *Výživa a krmení hospodářských zvířat*. 1. vyd. Praha: Profi Press, c2006. ISBN 80-86726-17-7.

ZEMAN, L., J. HARAŽIM a P. DOLEŽAL. Nejčastější dotazy z webu (II). *Krmivářství*. 2010, **XIV** (04/2010), 14-15.

ZÍTKA, O., M. KOMÍNKOVÁ, Z. LACKOVÁ, et al. *Metodika stanovení biogenních aminů v silážích*. Brno, 2015.

ZORNÍKOVÁ, G.. Biogenní aminy v potravinách. In: *Chempoint* [online]. Mendelova univerzita Brno: VUT Brno, fakulta chemická, 2012 [cit. 2016-03-20]. Dostupné z: <http://www.chempoint.cz/biogenni-aminy-v-potravinach>

Seznam obrázků

Obrázek č. 1: Vznik biogenních aminů.....15

Obrázek č. 2: Dekarboxylace histidinu na histamin.....17

Obrázek č. 3: Degradace histaminu.....18

Obrázek č. 4: Syntéza putrecinu.....	18
Obrázek č. 5: Syntéza tyraminu.....	19
Obrázek č. 6: Syntéza kadaverinu.....	19
Obrázek č. 7: Syntéza spermidinu.....	20
Obrázek č. 8: Syntéza sperminu.....	21
Obrázek č. 9: Oxidace polyaminů.....	21
Obrázek č. 10: Silážní stěna vojtěškové siláže při vybírání frézou, ZD Krásná Hora nad Vltavou a.s.....	32
Obrázek č. 11: Silážní stěna vojtěškové siláže při vybírání vykusovačem, ZD Krásná Hora nad Vltavou a.s.....	32
Obrázek č. 12: Chromatogramy znožňující vliv přídavku NaCl (A) 5g NaCl, (B) 7g NaCl, (C) 15g NaCl.....	36

Seznam tabulek

Tabulka č. 1: Rozdělení biogenních aminů.....	16
Tabulka č. 2: Produkce biogenních aminů v závislosti na teplotě okolí.....	33

Seznam grafů

Graf č. 1: Epyfitní mikroflóra u vojtěšky seté s obsahem sušiny 31%.....	29
Graf č. 2: Epyfitní mikroflóra u vojtěšky seté s obsahem sušiny 35%.....	29
Graf č. 3: Porovnání teplot 20 cm v silážní stěně v průběhu 20 hodin při vybírání frézou a vykusovačem.....	33