

Monitoring výskytu biogenních aminů v RAW potravinách

Petr Bartošek

Bakalářská práce
2018



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav technologie potravin

akademický rok: 2017/2018

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Petr Bartošek**

Osobní číslo: **T150036**

Studijní program: **B2901 Chemie a technologie potravin**

Studijní obor: **Chemie a technologie potravin**

Forma studia: **prezenční**

Téma práce: **Monitoring výskytu biogenních aminů v RAW potravinách**

Zásady pro vypracování:

I. Teoretická část

1. Charakteristika RAW potravin.
2. Charakteristika biogenních aminů.
3. Charakteristika mikroorganismů.

II. Praktická část

1. Metodika stanovení mikroorganismů a biogenních aminů v RAW potravinách.
2. Vyhodnocení výsledků počtu mikroorganismů a obsahu biogenních aminů v RAW potravinách.
3. Diskuse získaných výsledků a formulace závěrů práce.

Rozsah bakalářské práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

[1] BROŽKOVÁ, I., et al., 2017. Výskyt mikroorganismů v biopotravinách a sledování teplotního vlivu při výrobě "raw" potravin: seminář Potravinářské mikrobiologie. Univerzita Pardubice, 2017.

[2] ČERVENKA, L. et al., 2016. The quality of fruit crackers designated for the raw food vegan diet. Scientific paper of the University of Pardubice, Series A, 22, 2016, s. 5-13

[3] ŠILHÁNKOVÁ, L.. Mikrobiologie pro potravináře a biotechnologů. Vyd. 3., opr. a dopl., v nakl. Academia 1. vyd. Praha: Academia, 2002. ISBN 80-200-1024-6.

[4] KRÍŽEK, M., KALAC, P.: Biogenní aminy v potravinách a jejich role ve výživě. Czech. J. Food Sci., 16, 1998, s.151-159.

[5] SANTOS, S.: Biogenic amines: their importance in foods. International J. of Food Microbiology, 29, 1996, s. 213231.

Vedoucí bakalářské práce:

Ing. Pavel Pleva

Ústav inženýrství ochrany životního prostředí

Datum zadání bakalářské práce:

2. února 2018

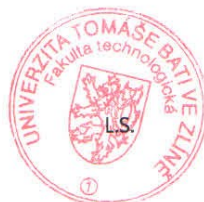
Termín odevzdání bakalářské práce:

3. května 2018

Ve Zlíně dne 2. února 2018



doc. Ing. František Buňka, Ph.D.
děkan



doc. Ing. František Buňka, Ph.D.
ředitel ústavu

Příjmení a jméno: Petr Bartošek

Obor: EMTP

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

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

Ve Zlíně 17.5.2018


.....

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ABSTRAKT

Cílem této práce bylo hodnocení mikrobiální kvality a přítomnosti biogenních aminů v raw tyčinkách. Tato práce byla zaměřena na mikrobiologický výzkum s cílem stanovit přítomnost vybraných indikátorových skupin mikroorganismů v závislosti na složení raw potravin. Rovněž byla provedena identifikace mikroorganismů metodou MALDI-TOF MS. Ve druhé části experimentu byly analyzovány biogenní aminy a polyaminy za použití vysokoúčinné kapalinové chromatografie s UV/VIS detekcí. Ve vzorcích byl zjištěn vysoký výskyt plísní, který je spojen s rizikem produkce mykotoxinů. Identifikací mikroorganismů bylo prokázáno nejčastější zastoupení rodů *Micrococcus*, *Bacillus* a *Staphylococcus*. Nejvyšší koncentrace biogenních aminů (tyramin $42,2 \pm 4,8 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$; putrescín $54,0 \pm 2,9 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) byla zjištěna ve vzorku s obsahem zeleninové složky. Průměrná koncentrace biogenních aminů v testovaných raw tyčinkách byly $<30 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, a proto nepředstavují vážnější zdravotní riziko pro spotřebitele.

Klíčová slova: raw potraviny, biogenní aminy, UHPLC, mikroorganismy

ABSTRACT

The aim of this work was to evaluate microbial quality and the presence of biogenic amines in raw bars. This study was focused on microbiological research in order to determine the presence of selected indicator groups of microorganisms depending on the composition of raw food. Identification of microorganisms was carried out by MALDI-TOF MS. In the second part of the experiment, biogenic amines and polyamines were analyzed using high performance liquid chromatography with UV/VIS detection. An increased incidence of mold has been reported in the samples, which is associated with a risk of mycotoxin production. It was found by identifying of microorganisms, that the most frequent genera represent *Micrococcus*, *Bacillus* and *Staphylococcus*. The highest concentration of biogenic amines (tyramine $42.2 \pm 4.8 \text{ mg.kg}^{-1}$; putrescine $54.0 \pm 2.9 \text{ mg.kg}^{-1}$) was found in a sample containing the vegetable component. The average concentration of biogenic amines in the tested raw bars was $<30 \text{ mg.kg}^{-1}$ and therefore do not pose a more serious health hazard to the consumer.

Keywords: raw food, biogenic amines, UHPLC, microorganisms

Poděkování:

Rád bych poděkoval svému vedoucímu bakalářské práce Ing. Pavlu Plevovi, Ph.D. za projevenou trpělivost, cenné rady a pomoc při vzniku této práce.

Dále bych chtěl poděkovat Ing. Ludmile Zálešákové, Ing. Olze Vlčkové a Bc. Veronice Kučabové za jejich ochotu a pomoc při práci v laboratoři. Chtěl bych rovněž poděkovat prof. Ing. Miroslavě Kačániové, Ph.D., ze Slovenské poľnohospodárskej univerzity v Nitre, za spolupráci při identifikaci mikroorganismů pomocí MALDI-TOF MS. V neposlední řadě bych chtěl poděkovat své rodině za podporu během celé doby mého studia.

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

OBSAH

ÚVOD	9
I TEORETICKÁ ČÁST	10
1 RAW POTRAVINY	11
1.1 CHARAKTERISTIKA RAW POTRAVIN.....	11
1.2 VLIV RAW POTRAVIN NA ZDRAVÍ.....	12
2 BIOGENNÍ AMINY	14
2.1 CHARAKTERISTIKA BIOGENNÍCH AMINŮ.....	14
2.2 VZNIK BIOGENNÍCH AMINŮ	14
2.3 VÝSKYT BIOGENNÍCH AMINŮ V NEFERMENTOVANÝCH POTRAVINÁCH ROSTLINNÉHO PŮVODU	16
2.4 FUNKCE A VÝZNAM BIOGENNÍCH AMINŮ	16
2.4.1 Toxický účinek biogenních aminů	17
2.4.2 Detoxikace biogenních aminů.....	18
3 MIKROBIOLOGIE RAW POTRAVIN	20
3.1 MIKROBIÁLNÍ KONTAMINACE OVOCE A ZELENINY	20
3.2 MIKROBIÁLNÍ KONTAMINACE OŘECHŮ A SEMEN ROSTLIN	21
II EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	23
4 CÍL PRÁCE	24
5 MATERIÁL A METODY	25
5.1 MIKROBIOLOGICKÝ EXPERIMENT	25
5.1.1 Izolace mikroorganismů.....	25
5.1.2 Identifikace mikroorganismů	26
5.2 ANALÝZA BIOGENNÍCH AMINŮ	26
5.2.1 Detekce biogenních aminů	27
5.3 CHARAKTERISTIKA POUŽITÉHO MATERIÁLU.....	27
5.4 STATISTICKÁ ANALÝZA	29
6 VÝSLEDKY A DISKUZE	30
6.1 MIKROBIOLOGICKÁ ANALÝZA.....	30
6.2 ANALÝZA BIOGENNÍCH AMINŮ	32
ZÁVĚR	35
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	36
SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	45
SEZNAM OBRÁZKŮ, TABULEK A PŘÍLOH	46

ÚVOD

Se zvyšujícím se zájmem obyvatel České Republiky o kvalitu potravin, roste i počet těch, kteří se zajímají o alternativní směry výživy. Jedním z nejpůvodnějších se jeví v poslední době trend konzumace tzv. raw potravin. Potravina je považována za raw, pokud nebyla podrobena tepelné úpravě přesahující 48 °C (Cunningham, 2004). Tento výživový trend je založen na konzumaci rostlinné stravy a to především ovoce, zeleniny, ořechů, semen, ale také obilovin a luštěnin, které se však nejprve máčí nebo nakličují (Cunningham, 2004). Omezením živočišných tuků v jídelníčku klesá příjem nasycených mastných kyselin a cholesterolu. Tyto aspekty následně vedou k nižšímu výskytu kardiovaskulárních onemocnění. Zároveň však dochází k deficitu vitamínu B₁₂ (Dawey *et al.*, 2003, Koebnick *et al.*, 2005). S konzumací syrové stravy je také spojena podváha (Koebnick *et al.*, 1999, Craig, 2009), či řídnutí kostí (Fontana *et al.*, 2005). V neposlední řadě je třeba zmínit zvýšené riziko alimentárních intoxikací, které pramení z nedostatečné tepelné úpravy potravin (Cunningham, 2004).

Mezi látky, které se významně podílejí na kvalitě potravin, patří mimo jiné biogenní aminy. Biogenní aminy jsou nízkomolekulární organické báze vyskytující se v živých organismech, kde plní řadu metabolických a fyziologických funkcí (Askar a Treptow, 1986, Silla-Santos, 1996, Košmerl *et al.*, 2013, Cunha *et al.*, 2016). Biogenní aminy jsou pro člověka nepostradatelné, ve vysokých koncentracích ovšem mohou u citlivých jedinců vyvolat zdravotní potíže. Mezi toxikologicky nejvýznamnější patří aromatické biogenní aminy histamin a tyramin (Shalaby, 1996, Buňková *et al.*, 2013). Výskyt nadměrného množství biogenních aminů v organismu se nejčastěji projevuje nevolností, dýchacími problémy, bušením srdce, nepravidelností tepu, zarudnutím kůže, otoky a bolestmi hlavy (Santos *et al.*, 2003, Dičáková a Dudriková, 2006, Li *et al.*, 2013). Evropskou legislativou je definován maximální povolený limit pouze pro histamin. Dle Nařízení Komise (ES) č. 2073/2005, ve znění pozdějších předpisů, je stanoven maximální obsah histaminu v rybách a produktech rybolovu v množství menším než 100 mg.kg⁻¹. Množství biogenních aminů v potravinách rostlinného původu bylo popsáno některými autory (Halász *et al.*, 1994, Nishibori *et al.*, 2005, Pleva *et al.*, 2018), stanovení těchto látek v raw potravinách ovšem nebylo, dle dostupné literatury, doposud provedeno. Monitorování výskytu biogenních aminů a stanovení limitů i v ostatních potravinách by mělo být jednou z priorit, vedoucí k zajištění bezpečnosti potravin pro spotřebitele. Cílem této práce bylo hodnocení mikrobiologické kvality a stanovení množství biogenních aminů v raw potravinách.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 RAW POTRAVINY

1.1 Charakteristika raw potravin

Raw potraviny jsou složeny převážně či zcela ze syrové nevařené stravy. V České Republice se také můžeme setkat s názvem "živá strava" a příznivci tohoto trendu se nazývají "vitariáni" (Cunningham, 2004, Červenka *et al.*, 2015). Potravina je považována za raw, pokud nebyla podrobena tepelné úpravě přesahující 48 °C. Obecně není v literatuře uváděna jediná konkrétní hodnota teploty, nýbrž její rozpětí, které se pohybuje mezi 38-48 °C (Cunningham, 2004, Červenka *et al.*, 2015). Potravina splňuje parametry raw stravy, pokud není rafinována, pasterována, ošetřena pesticidy či jakkoli jinak průmyslově zpracována. Namísto toho, tento trend stravování schvaluje řadu různých úprav potravin, jako jsou odšťavňování, mixování, lyofilizace, máčení a klíčení (Hanušková *et al.*, 2017). Podobně jako u veganství, rovněž raw dieta je založena na konzumaci rostlinné stravy a to především ovoce, zeleniny, ořechů a semen. Obiloviny a luštěniny jsou také dovoleny, obvykle se však nejprve máčí nebo nakličují (Cunningham, 2004). Rovněž raw tyčinky jsou složeny z potravin rostlinného původu, které nebyly zahřáty nad 48°C. Jde o kombinaci sušeného ovoce, ořechů, semen rostlin, kakaa, kávy, ale také zeleniny a koření. Nejčastěji je základ tyčinky tvořen sušenými datli. Z ovoce se taktéž hojně vyskytují sušená jablka, meruňky, banány, fíky, brusinky a borůvky. Dále jsou raw tyčinky doplněny ořechy, nejčastěji pak mandlemi, kešu, para ořechy, kokosem, arašídami a lískovými ořechy. Semena rostlin jsou nejhojněji zastoupena především semínky slunečnicovými, chia, sezamovými a konopnými. V zeleninových raw tyčinkách můžeme nalézt rajčata, červenou řepu, cibuli a česnek. Některé raw tyčinky jsou, z důvodu navýšení obsahu bílkovin, rovněž doplněny o rýžový protein (Červenka *et al.*, 2015).

Příznivci tohoto stravovacího trendu odrazují od konzumace potravinových doplňků a vitaminů, jelikož tvrdí, že syrová strava poskytuje lidskému tělu vše potřebné. Zároveň tvrdí, že vařená strava neprospívá lidskému zdraví, jelikož ničí přirozené enzymy ve stravě, snižuje výživovou hodnotu potravin a ničí tzv. "živou sílu", která se, jak tito lidé věří, skrývá v syrové stravě. Tento názor ovšem vyvrací fakt, že tělo si vytváří enzymy potřebné pro trávení a vstřebávání živin, a enzymy obsažené v potravinách jsou inaktivovány kyselým prostředím žaludku (Cunningham, 2004). Vaření snižuje určité množství živin v potravinách. Jedná se především o vitaminy rozpustné ve vodě, jako jsou vitamin C a vitaminy skupiny B (Agte *et al.*, 2002, Igwemmar *et al.*, 2013). V menší míře dochází ke ztrátám některých minerálů a

vitaminu A. Vitaminy rozpustné v tucích D, E a K, jsou vařením prakticky neovlivněny. Varem se rozkládá vláknina a buněčné stěny rostlinné stravy, což vede k snadnějšímu trávení a vstřebávání živin (Khanum *et al.*, 2000). Vařením se rovněž zvyšuje dostupnost antioxidantů beta-karotenu, luteinu a lykopenu, které pozitivně působí na snižování rizika srdečních onemocnění (Tavani a La Vecchia, 1999, Rao a Agarwal, 2000, Palermo *et al.*, 2014). Konzumace raw potravin je nejčastěji spojena se změnou životních postojů a taktéž s přesvědčením o příznivých vlivech této stravy na lidské zdraví, jako jsou úbytek na váze, zlepšení vitality, zvýšení energie, zlepšení chronických onemocnění a celkového zdraví a rovněž snížení dopadu na životní prostředí.

1.2 Vliv raw potravin na zdraví

Mezi pozitivní účinky konzumace syrové stravy patří zejména vysoký přísun vlákniny, minerálních látek a vitaminů rozpustných ve vodě (Craig, 2009). Mezi velmi kontroverzní účinky konzumace syrové stravy se v dostupné literatuře uvádí snižování rizika výskytu rakovin, především žensky specifických (Lanou a Svenson, 2011, Tantamango-Bartley *et al.*, 2013), kdy dochází k poklesu úmrtnosti ve srovnání s lidmi konzumujícími rovněž živočišnou stravu (Orlich *et al.*, 2014). Raw strava má pozitivní vliv na složení střevní mikrobioty, která vykazuje ochranný účinek (Glick-Bauer a Yeh, 2014). (Ling a Hänninen, 1992) popisují významné snížení aktivity některých prekarcinogenních enzymů tvořených střevní mikrobiotou při týdenní konzumaci raw potravin. Konzumace syrové stravy se rovněž jeví užitečnou z hlediska příjmu ochranných živin a fotochemikálií a také pro minimalizaci příjmu látek, které se podílejí na mnoha chronických chorobách (Dewell *et al.*, 2008).

Omezením živočišných tuků v jídelníčku klesá příjem nasycených mastných kyselin a cholesterolu. Tyto aspekty následně vedou k nižšímu výskytu kardiovaskulárních onemocnění. Zároveň však dochází ke snížení obsahu HDL cholesterolu a také nedostatečnému příjmu vitaminu B₁₂ (Dawey *et al.*, 2003, Koebnick *et al.*, 2005). Dlouhodobý, neadekvátní příjem vitaminu B₁₂, železa, zinku, esenciálních mastných kyselin a esenciálních aminokyselin, se považuje za největší nedostatky tohoto výživového směru. Největší přírodní zdroje vitaminu B₁₂ jsou maso, vnitřnosti, mořské plody, vejce, mléko a mléčné výrobky (Watanabe, 2016). Dojde-li k bakteriální fermentaci, mohou být také potraviny rostlinného původu zdrojem kobalaminu. Bakterie však nejsou schopny vytvořit dostatečné množství kobalaminu k pokrytí jeho denní potřeby (Mahan a Raymond, 2017). Z tohoto důvodu jsou "vitariáni" odkázaní na suplementaci tohoto vitaminu ve formě tablet či fortifikovaných potravin. Deficit

kobalaminu může vyústit v megaloblastovou anémii, tedy makrocytární typ anémie, jež má za následek přerušení procesu dělení buněk. Klinickými projevy jsou následně únava, slabost, bledost a pokles svalové aktivity (Aslinia *et al.*, 2006). Dalším typem anémie, která je spjata s raw dietou, je anémie sideropenická, která je způsobena sníženou hladinou železa v krvi. (Sahovic *et al.*, 2012). Mezi nejkvalitnější zdroje železa v raw stravě se řadí především ořechy (kešu, mandle, lískové ořechy) a luštěniny (čočka, fazole, hrách), které se však doporučují nejdříve namočit nebo naklíčit. Dlouhodobým příjmem raw potravin dochází k úbytku tělesné hmotnosti, v mnohých případech však také k podvaze. Zvýšená konzumace syrové stravy tedy obvykle souvisí s nízkými hodnotami BMI (Koebnick *et al.*, 1999, Craig, 2009). V důsledku nízké tělesné hmotnosti dochází u žen v produktivním věku k výkyvům v menstruačním cyklu a rovněž ke zvýšenému riziku amenorey, tedy vynechání menstruačního krvácení (Koebnick *et al.*, 1999). Konzumace syrové stravy má za následek nízký příjem bílkovin, vápníku a vitamínu D. U těchto osob se často projevuje nízká hustota kostní tkáně a zvýšené riziko osteoporózy (Fontana *et al.*, 2005). (Ganss *et al.*, 1999) uvádí zvýšený výskyt eroze zubní skloviny. Její rozpad je spojený s nadměrnou konzumací ovoce, které obsahuje jednoduché, lehce zkvasitelné cukry. Stravování raw potravinami vede k nedostatečnému příjmu polynenasycených mastných kyselin nutných pro normální funkci a další vývoj mozku, zvláště pak u dětí a mladistvých, u kterých stále probíhá růst. Neobsahuje-li strava dostatek ořechů a sóji, může docházet k deficitu kyseliny α -linolenové (Svačina, 2008, Fonseca-Azavedo a Herculano-Houzel, 2012). S konzumací syrové stravy je taktéž spojena horší stravitelnost rostlinných bílkovin, se kterou koreluje snížená využitelnost živin, jež je způsobena přítomností antinutričních látek. Antinutriční látky působí na aktivitu některých enzymů, vitaminů a minerálních látek. V luštěninách a obilovinách se vyskytují především lektiny, inhibitory proteáz, saponiny a kyselina fytová, které lze destruovat pouze tepelnou úpravou potravin (Soetan a Oyewole, 2009). Inhibitory proteáz, vyskytující se v sóje a arašidech, brání proteolýze a následnému využití bílkovin. Organismus reaguje na vzniklý deficit aminokyselin produkcí pankreatických proteáz. U dospívajících jedinců pak mohou tyto látky způsobovat blokaci růstu a dalšího vývoje. Antinutriční látky obsažené v kapustě či zelí jsou zdrojem strumigenních látek, zodpovědných za tvorbu strumy u dětí (Kvasničková, 1998).

V neposlední řadě je třeba zmínit zvýšené riziko alimentárních intoxikací, které pramení z nedostatečné tepelné úpravy potravin (Cunningham, 2004).

2 BIOGENNÍ AMINY

2.1 Charakteristika biogenních aminů

Biogenní aminy jsou nízkomolekulární bazické dusíkaté sloučeniny vznikající dekarboxylací aminokyselin nebo aminací a transaminací aldehydů a ketonů. Přirozeně se vyskytují v mikrobiálních, rostlinných i živočišných buňkách, kde plní řadu metabolických a fyziologických funkcí (Askar a Treptow, 1986, Silla-Santos, 1996, Košmerl *et al.*, 2013, Cunha *et al.*, 2016).

Na základě jejich chemické struktury je dělíme na:

- alifatické (putrescin, kadaverin),
- aromatické (tyramin, 2-fenylethylamin),
- heterocyklické (histamin, tryptamin).

Někteří autoři řadí spermidin, spermin, putrescin a kadaverin mezi polyaminy. Polyaminy mají vliv na regulaci funkce nukleových kyselin, syntézu proteinů či stabilizaci membrán (Bardot *et al.*, 1993, Halász *et al.*, 1994, Silla-Santos, 1996, Teti *et al.*, 2002, Juneja a Sofos, 2010).

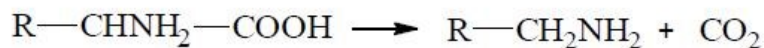
Podle počtu arylových a alkylových skupin navázaných na atom dusíku poté rozlišujeme biogenní aminy primární, sekundární a terciární (Křížek a Kalač, 1998).

2.2 Vznik biogenních aminů

Biogenní aminy vznikají dekarboxylací volných aminokyselin, ke které dochází několika způsoby. Jednou z možností je vznik biogenních aminů aktivitou enzymů dekarboxyláz, které se přirozeně vyskytují v potravinách. Nejčastěji však vznikají mikrobiální dekarboxylací příslušných aminokyselin v cytoplazmě. Aminokyseliny se do cytoplazmy dostávají antiportem s aminy, kdy je aminokyselina přenesena do buňky výměnou za biogenní amin, který je uvolněn do prostředí (Buňková *et al.*, 2013, Li *et al.*, 2013, Benkerroum, 2016).

Během dekarboxylace dochází pomocí enzymů dekarboxyláz, které jako kofaktor obsahují pyridoxalfosfát, k odbourání karboxylové skupiny za vzniku odpovídajícího aminu a oxidu uhličitého. Tímto mechanismem vzniká například histamin z aminokyseliny histidinu působením histidindekarboxylázy. Obdobným způsobem vznikají i další biogenní aminy. Těkvé

aminy, kromě fenyethylaminu, vznikají transaminací aldehydů nebo ketonů (Lonvaud-Funel, 2001, Nowak a Czyzowska, 2011, Košmerl *et al.*, 2013).



Obrázek 1: Schéma dekarboxylace aminokyselin (Kohajdová *et al.*, 2008).

Tabulka 1: Prekurzory biogenních aminů a jejich struktura (Cunha *et al.*, 2016).

Aminokyselina	Odvozený amin	Struktura
Arginin	Agmatin	Alifatická
Lyzin	Kadaverin	
Ornithin	Putrescin	
Histidin	Histamin	Heterocyklická
Tryptofan	Tryptamin	
Tyrozín	Tyramin	Aromatická
Fenylalanin	Fenylethylamin	

Mezi faktory ovlivňující produkci biogenních aminů patří:

- dostupnost volných aminokyselin v substrátu,
- přítomnost mikroorganismů schopných aminokyseliny v substrátu dekarboxylovat,
- vzájemné vztahy mezi přítomnými mikroorganismy,
- přítomnost pyridoxalfosfátu jako kofaktoru v metabolismu aminokyselin,
- fyzikálně-chemické vlivy, jako jsou teplota, pH a přístup kyslíku (Shalaby, 1996, Barbuzzi *et al.*, 2009, Naila *et al.*, 2010).

2.3 Výskyt biogenních aminů v nefermentovaných potravinách rostlinného původu

Výskyt biogenních aminů lze očekávat v potravinách obsahující bílkoviny nebo volné aminokyseliny, zvláště pokud poskytují vhodné podmínky pro biochemickou aktivitu přítomných mikroorganismů (Buňková *et al.*, 2009).

Produkce biogenních aminů je v potravinách, převážně fermentovaných, podporována produkcí dekarboxyláz přítomnými mikroorganismy (Halász *et al.*, 1994). Nejčastěji se vyskytujícími biogenními aminy v potravinách jsou histamin, tyramin, kadaverin, spermidin, spermin, putrescin, β -fenylethylamin a tryptamin (Naila *et al.*, 2010, Bedia Erim, 2013). Biogenní aminy se vyskytují také jako přirozená součást potravin rostlinného původu (Velíšek, 1999).

V ovocných šťávách, nektarech, a limonádách z pomerančů, malin, citronů, grapefruitů, mandarinek, rybízu, jahod a hroznů se nacházejí různé biogenní aminy. Nejčastěji se jedná o putrescin, v jahodovém džusu byla zjištěna rovněž vysoká koncentrace tyraminu (Shalaby, 1996, Dabrowski a Sikorski, 2005). Vysoká koncentrace aminů byla také zjištěna v přírodní pomerančové šťávě (noradrenalin, tryptamin), rajčeti (histamin, tryptamin, tyramin), švestkách (noradrenalin, tyramin), banánech (noradrenalin, serotonin, tyramin, tryptamin) a listovém špenátu (histamin). V kakaových bobech se vyskytuje jako přirozená složka 2-fenylethylamin. Ten vzniká rovněž fermentačními procesy během zpracování kakaových bobů a zvýšené koncentrace 2-fenylethylaminu pak můžeme nalézt v čokoládě, čokoládových výrobcích a cukrovinkách obsahujících čokoládu (Halász *et al.*, 1994, Silla-Santos, 1996). Biogenní aminy můžeme také nalézt v ořeších, houbách z čeledi *Boletaceae* a také sóji (Dadáková *et al.*, 2009, Landete *et al.*, 2007, Toro-Funes *et al.*, 2015).

Koncentrace biogenních aminů v ovoci a zelenině je závislá na stupni zralosti. V případě skladování mohou biogenní aminy také sloužit jako ukazatel jakosti vstupní suroviny a úrovně hygieny během výrobního procesu (Kalač a Křížek, 2005).

2.4 Funkce a význam biogenních aminů

Biogenní aminy a polyaminy se v buňkách mikroorganismů, rostlin a živočichů podílejí na řadě metabolických a fyziologických procesů jako jsou regulace tělesné teploty, příjem živin či růst nebo pokles krevního tlaku (Greif *et al.*, 1997). Biogenní aminy jsou zdrojem dusíku

a taktéž prekurzory pro biosyntézu hormonů, alkaloidů, nukleových kyselin a proteinů či přímo plnit funkci hormonu (Silla-Santos, 1996).

Polyaminy hrají důležitou roli při regulaci buněčného růstu, diferenciaci buněk a také mají vliv na metabolickou aktivitu a střevo a vývoj střevní tkáně (Silla-Santos, 1996, Nuñez *et al.*, 2016). V eukaryotických buňkách jsou polyaminy lokalizovány především v cytoplazmě, vakuolách, mitochondriích a chloroplastech. V rostlinách se polyaminy putrescin, spermidin a spermin podílejí na řadě fyziologických dějů, mezi něž můžeme zařadit buněčné dělení, kvetení, vývoj plodu či odpověď na stres a stárnutí (Halász *et al.*, 1994).

Významná je role polyaminů také při léčbě nádorových onemocnění, kdy jedním z hlavních cílů je potlačení biosyntézy putrescinu, spermidinu a sperminu (Bardócz, 1995).

Biogenní aminy jsou také možnými prekurzory pro vznik N-nitroso sloučenin (Křížek a Kalač, 1998). Reakcí spermidinu a sperminu s kyselinou dusitou mohou vznikat N-nitrosaminy, které jsou považovány za karcinogenní, mutagenní a teratogenní (Nuñez *et al.*, 2016, Tofalo *et al.*, 2016). V tučných pokrmech se může při vysokých teplotách a v přítomnosti vody z putrescinu nebo spermidinu tvořit N-nitrosopyrolidin (Lovaas, 1991).

Některé polyaminy, konkrétně putrescin, kadaverin a spermidin, mohou působit jako volné radikály (Ogawa *et al.*, 1996). Rovněž biogenní amin tyramin má značnou antioxidační aktivitu, která se s jeho obsahem zvyšuje. Lze tedy říci, že inhibiční efekt závisí na aminoskupinách a hydroxyskupinách (Halász *et al.*, 1994). Spermin má tu vlastnost, že je schopen regenerovat tokoferol z tokoferoxylového radikálu přes donor vodíků z aminoskupiny. Sperminový radikál následně váže lipidové nebo peroxidové radikály do lipidového komplexu (Karovičová a Kohajdová, 2005). Některé biogenní aminy mají rovněž tu vlastnost, že přispívají k chuti a vůni jídla (Halász *et al.*, 1994).

2.4.1 Toxický účinek biogenních aminů

Obecně lze říci, že přítomnost biogenních aminů a polyaminů v nízkých koncentracích v potravinách nepředstavuje pro zdravé osoby vážnější problém. U citlivých jedinců ovšem mohou vysoké koncentrace biogenních aminů a polyaminů vyvolat alimentární intoxikaci. Mezi toxikologicky nejvýznamnější patří aromatické biogenní aminy histamin a tyramin (Shalaby, 1996, Buňková *et al.*, 2013).

Výskyt nadměrného množství biogenních aminů v organismu se nejčastěji projevuje nevolností, dýchacími problémy, bušením srdce, nepravidelností tepu, zarudnutím kůže, otoky a bolestmi hlavy (Santos *et al.*, 2003, Dičáková a Dudriková, 2006, Li *et al.*, 2013).

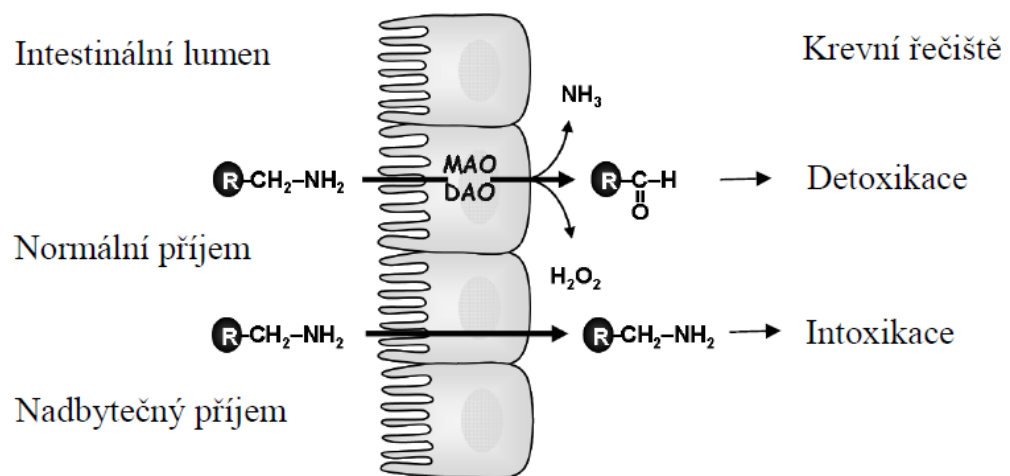
K otravám způsobeným histaminem nejčastěji dochází konzumací ryb z čeledi *Scombridae* (makrely, tuňák, sardinky) a sýrů typu Gouda a Čedar (Shalaby, 1996). Toxické účinky histaminu nastávají tehdy, pokud dojde k interakci s receptory na buněčných membránách, které se nacházejí v kardiovaskulárním systému a sekrečních žlázách. Tím histamin způsobí dilataci periferních krevních cév, kapilár a tepen. Dochází k hypotenzi, která následně vede k bolestem hlavy či závratím. Histamin vyskytující se v hladkém svalstvu střev způsobuje křeče, průjem a zvracení (Zaman, 2009). Pomocí receptorů umístěných na buněčných stěnách reguluje histamin vylučování žaludečních šťáv. Histamin bývá v lidském těle rovněž příčinou alergické a zánětlivé reakce, kdy histamin zastává funkci antigenu, který síťuje molekuly protilátek. Uvolněním histaminu do kůže dochází k zarudnutí a tvorbě podlitin (Zaman, 2009, Sagratini *et al.*, 2012). Otrava tyraminem je označována jako tzv. "cheese reaction". Projevuje se hypertenzí, bolestí hlavy a migrénami, poruchami dýchání či zvracením (Şanlı a Şenel, 2015, Del Rio *et al.*, 2017). Histamin a tyramin vykazují synergický efekt, kdy působí cytotoxicky. Tímto vzájemným působením dochází ke změně morfologie a počtu buněk (Del Rio *et al.*, 2017).

Stanovení toxické dávky biogenních aminů je obtížné, jelikož je toxická dávka ovlivněna účinností detoxikačních mechanismů každého jedince (Önal, 2007).

2.4.2 Detoxikace biogenních aminů

Hlavní cestou detoxikace nebo biotransformace biogenních aminů v lidském těle je oxidace, v menší míře pak metylace a acetylce (Taylor a Speckhard, 1983, Lehane a Olley, 2000).

Biogenní aminy přijaté z potravy jsou rovněž metabolizovány konjugací, nebo pomocí aminooxidáz. Biogenní aminy jsou absorbovány ve střevech, odkud se pomocí vrátnicové žíly dostávají do jater. Nejvíce se uplatňují enzymy monoaminoxidáza (MAO), diaminoxidáza (DAO) a histidinmethyltransferáza (HMT). Tyto enzymy způsobují deaminaci biogenních aminů za vzniku aldehydů, kyselin, amoniaku a peroxidu vodíku (Taylor a Speckhard, 1983, Lehane a Olley, 2000, Önal, 2007).



Obrázek 2: Cesta přijatých biogenních aminů v intestinálním traktu člověka (Pleva, 2017).

Aktivita aminooxidáz je nižší u osob s chorobami trávicího traktu a je rovněž ovlivněna užíváním léčiv, alkoholem a genetickou dispozicí jedince (Kohajdová *et al.*, 2008).

3 MIKROBIOLOGIE RAW POTRAVIN

3.1 Mikrobiální kontaminace ovoce a zeleniny

Velké množství bakterií, kvasinek a plísní je na povrchu zeleniny a také v půdě, která ulpívá na hlízách a kořenech. Vnitřní tkáň zeleniny jsou chráněny různými obrannými mechanismy a faktory, jako jsou povrchová pletiva či antimikrobiální látky. Bakterie obvykle působí kažení produktů, u kterých došlo k poškození povrchových pletiv. Typickým příkladem je tzv. bílá hniloba zeleniny postihující např. mrkev, celer, brambory nebo cibuli. V půdě se nejčastěji vyskytují sporulující bakterie *Bacillus cereus* a *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens*, které se řadí mezi toxikogenní. Rovněž zde můžeme nalézt listerie včetně *Listeria monocytogenes* a také plísně produkující mykotoxiny (Veverka, 2003, Görner a Valík, 2004).

Zelenina dopravená přímo od pěstitele je silně mikrobiologicky a mechanicky znečištěná.

Složení mikroflóry je značně rozdílné a kolísá podle původu suroviny. Zelenina má poměrně vysoké hodnoty pH, které se pohybují v rozmezí od 4,0-4,4 u rajčat až po 6,5 u kukuřičných zrn. Z tohoto důvodu tvoří dominantní mikroflórou zeleniny bakterie, časté a hojné jsou i kvasinky, méně časté jsou poté plísně. Významnou složkou přírodní mikroflóry zeleniny jsou bakterie mléčného kvašení. Na zdravé zelenině jsou to především zástupci čeledi *Streptococcaceae* (*Leuconostoc*) a druhy rodu *Lactobacillus*. Dále se můžeme setkat s rody *Micrococcus*, *Pseudomonas* a *Erwinia*. Koliformní bakterie nikdy nechybějí. Počet mikroorganismů na povrchu zeleniny dosahuje hodnot 10^7 CFU.g⁻¹ i více. Množství závisí na způsobu a době sklizně, dopravě a skladování (Veverka, 2003, Görner a Valík, 2004).

Druhová rozmanitost půdních bakterií je zvýšena hnojením organickými hnojivy živočišného původu. Takto mohou být plodiny kontaminovány střevními bakteriemi, např. salmonelami, patogenními kmeny *Escherichia coli* či *Campylobacter jejuni*. Tyto patogeny mohou v půdě přežívat měsíce, někdy i roky. Zdrojem patogenních mikroorganismů mohou být i výkaly divoče žijících zvířat či hmyz. Významným zdrojem kontaminace koliformními bakteriemi je také voda, která se používá k zavlažování. Obvykle se zelenina kontaminuje při zavlažování vodou z kontaminovaných zdrojů nebo povrchovou vodou obsahující splašky (Veverka, 2003, Görner a Valík, 2004).

Mikrobiální kažení ovoce probíhá obvykle od povrchu. Ovoce obsahuje mnoho vody a cukrů, a je proto velmi dobrým médiem pro mikroorganismy. Mezi přirozené obranné me-

chanismy bránící průniku a rozvoji mikroorganismů u ovoce patří povrchová pletiva a přítomnost organických kyselin, které mohou ve významné míře zabránit mikrobiální infekci a jejímu šíření. Kyselina jablečná a citronová snižují pH ovocných plodů a mohou působit mikrobistaticky. Další látky, jakými jsou kyselina benzoová v brusinkách, kyselina salicylová v hroznovém víně, éterické oleje v citrusech či třísloviny v nezralých plodech, mají přímý mikrobicidní účinek. Vysoký obsah organických kyselin snižuje pH natolik, že brání růstu většiny bakterií. Typická mikroflóra ovoce je tvořena zejména kvasinkami. Významnou roli při znehodnocení ovoce mají plísňe, a to především plísňe rodu *Penicillium*, ale i další, jako jsou rody *Rhizopus*, *Fusarium*, *Botrytis*, či *Mucor*. Spory a hyfy plísni pronikají do ovoce nejčastěji na místech poškození povrchových pletiv, ale také přes dýchací buňky či přímo přes povrchové pletivo. K tomuto plísňe využívají například penetrační hyfy (Görner a Valík, 2004). V ovoci může být obsažen mykotoxin patulin, produkovaný parazitickými mikroskopickými houbami rodů *Penicillium* a *Aspergillus*. Nejčastějším producentem patulinu je *Penicillium expansum*, parazitická houba, která kontaminuje jablka a další ovoce. Spory této houby se běžně vyskytují i na povrchu zdravého ovoce, ale teprve při mechanickém poškození povrchu nebo nakousání hmyzem začne houba růst a produkovat patulin. Tento mykotoxin se vyskytuje na ovoci i po vykrojení nahnilé části, přičemž se následně dostává do mnoha výrobků, jako jsou ovocné mošty či dětská výživa. Patulin má teratogenní vlastnosti, může tedy způsobovat vrozené vývojové vady. Patulin je rovněž mutagenní, kdy poškozuje DNA a způsobuje chromozomální odchylky. Koliformní bakterie bývají u ovoce přítomny jen v malých množstvích. Složení i množství mikroflóry kolísá značně podle druhu ovoce (Veverka, 2003, Görner a Valík, 2004, Puel *et al.*, 2010).

3.2 Mikrobiální kontaminace ořechů a semen rostlin

Správný průběh sušení je pro kvalitu ořechů velmi významný. Při vyšším obsahu vody dochází pod skořápkou ořechů k rozvoji některých druhů plísni. Za nejnebezpečnější je považována plíseň *Aspergillus flavus*, která produkuje aflatoxin, který v případě kumulace může v lidském organismu poškozovat játra (cirhózy, fibrózy). Nebezpečí nespočívá jen v konzumaci plesnivých potravin, ale i ve vdechnutí kontaminovaného prachu. Významnější než přímá toxicita aflatoxinů je jejich teratogenita, kdy může dojít až k odumření plodu, a také jejich karcinogenita (Görner a Valík, 2004). *Aspergillus flavus* je dominantní plíseň na skořápce podzemnice olejné. Aflatoxiny se tak často vyskytují v arašidech či v arašidovém

máslu. Podobně rizikové jsou rovněž para ořechy a pistácie. Ořechy vlašské, lískové a kokosové jsou méně rizikové (Görner a Valík, 2004).

Semena rostlin mohou být kontaminována střevními bakteriemi, např. salmonelami či *Escherichia coli* (včetně patogenních sérotypů). Zdrojem kontaminujících mikroorganismů může být kontaminovaná voda použitá k zavlažování rostlin během růstu, kontaminované hnojivo organického původu, trus volně žijících zvířat a v neposlední řadě nedodržování hygienických zásad během sklizně a při posklizňových úpravách produktů. Jsou evidovány případy onemocnění salmonelózou po konzumaci naklíčených semen a výhonků rostlin, např. naklíčených semen vojtěšky, fazolových výhonků či výhonků fazolek mungo (Veverka, 2003, Görner a Valík, 2004).

Semena kakaovníku (*Theobroma cacao*) jsou po sklizni zpracována fermentací, která probíhá působením kvasinek a bakterií mléčného kvašení. Nejprve se uplatňují kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida rugosa* a *Kluyveromyces marxianus*. Následně dochází k množení laktobacilů a streptokoků a v konečné fázi poté bakterií rodu *Acetobacter* a *Gluconobacter*. Fermentace se používá k dosažení požadovaného aroma kakaových bobů. Špatným průběhem fermentace však může docházet k tvorbě sensorických vad, a to především působením bakterií rodu *Bacillus*, *Pseudomonas* či *Escherichia* nebo případným nárůstem plísní rodu *Aspergillus*, *Penicillium* a *Mucor* (Schwan a Wheals, 2004).

Taktéž semena kávovníku (*Coffea spp.*) jsou po sklizni vystavena fermentaci. Kávová zrna jsou fermentována pomocí pektinolytických mikroorganismů a bakterií mléčného kvašení.

Nejčastěji se využívají rody *Saccharomyces apiculatus*, *Hanseniaspora uvarum*, *Pseudomonas fluorescens* a *Erwinia carotovora*. Případné sensorické vady způsobují bakterie *Bacillus brevis* (Waters *et al.*, 2015).

Nejčastějšími kontaminanty kakaa a kávy jsou plísně, především zástupci rodu *Aspergillus*. *Aspergillus ochraceus* produkuje ochratoxin A, jehož vznik je spojený se špatným uskladněním. Účinek tohoto mykotoxinu je především nefrotoxický. Zplesnivělými potravinami se dostává do masa prasat a skotu, a může takto nepřímo ohrozit lidské zdraví. Ve větších dávkách způsobuje u zvířat enteritidy, nekrózy a vyvolává taktéž teratogenní účinky (Görner a Valík, 2004, Bui-Klimke a Wu, 2013).

II. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4 CÍL PRÁCE

Cílem této bakalářské práce bylo sledovat mikrobiologickou jakost raw tyčinek a množství biogenních aminů v těchto potravinách. Bakterie obsažené v raw potravinách mohou být zdraví škodlivé, zároveň však mohou mít potenciál pro pozitivní využití v potravinářské technologii.

Dílčí cíle práce byly postaveny následovně.

V teoretické části:

- charakterizovat raw potraviny,
- charakterizovat biogenní aminy,
- charakterizovat mikroorganismy v raw potravinách.

V experimentální části:

- provést mikrobiologickou analýzu raw potravin,
- u všech vzorků provést analýzu biogenních aminů,
- použít vhodné statistické metody pro vyhodnocení získaných výsledků,
- z výsledků vyvodit doporučení a navrhnout další směr výzkumu v oblasti raw tyčinek.

5 MATERIÁL A METODY

Pro experiment bylo v běžných obchodních řetězcích zakoupeno 15 vzorků raw tyčinek. V těchto raw potravinách byl následně proveden screening mikrobiologické diverzity a rovněž stanoven obsah biogenních aminů.

V mikrobiologické části experimentu byla provedena charakterizace mikroorganismů za využití kultivace na selektivně diagnostických půdách. Druhová identifikace mikroorganismů byla provedena pomocí hmotnostní spektrometrie s laserovou desorcí a ionizací za účasti matrice s průletovým analyzátozem (MALDI-TOF MS). V analytické části experimentu bylo provedeno stanovení biogenních aminů za použití ultra vysoce účinné kapalinové chromatografie (UHPLC).



Obrázek 3: Testované vzorky (vlevo nahoře-raw tyčinka sezamová, vpravo nahoře-raw tyčinka s kešu, vlevo dole-raw marokánka čokoládová, vpravo dole-raw kulička jablková)

5.1 Mikrobiologický experiment

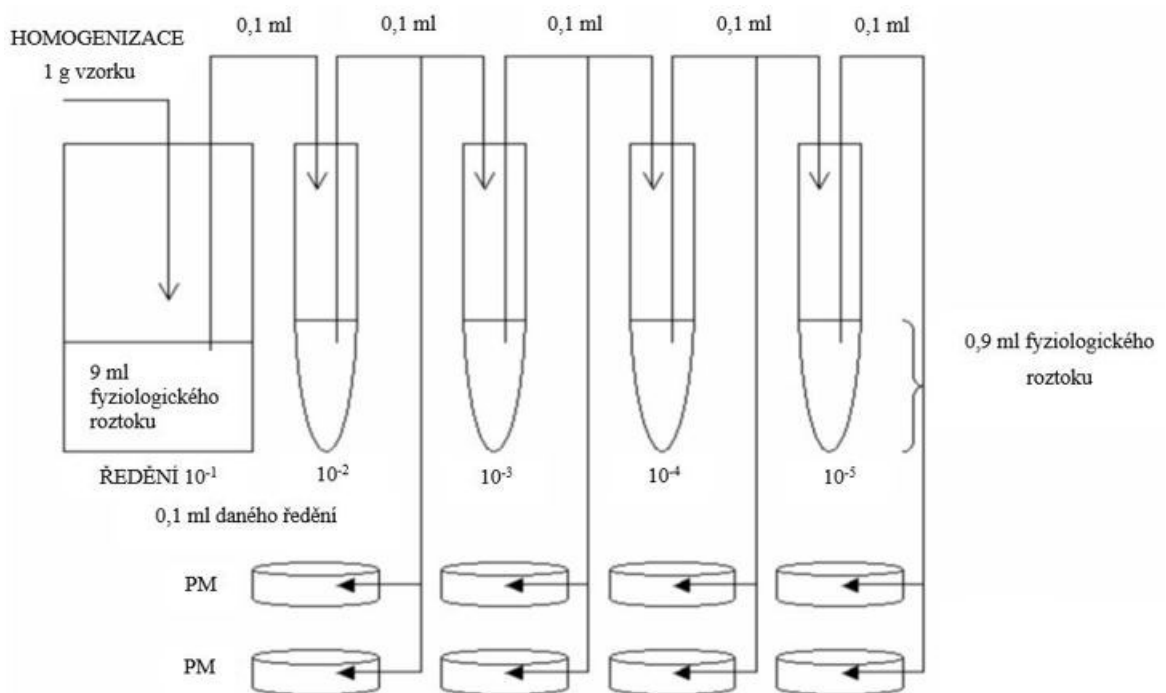
5.1.1 Izolace mikroorganismů

Bylo odváženo 10 gramů z každého vzorku raw tyčinky (obrázek 4) a asepticky přeneseno do 90 ml sterilního fyziologického roztoku, který byl následně homogenizován po dobu 10 minut (za použití stomacheru). Raw tyčinky byly poté podrobeny rutinní mikrobiologické analýze za použití desítkového ředění (obrázek 3) a následně kultivaci na selektivně diagnostických půdách (HiMedia Laboratories Pvt. Ltd., Mumbai, India). Celkový počet mikroorganismů byl hodnocen podle normy ISO č. 4833-1 (2013), bakterií čeledi *Enterobacteriaceae* podle normy ISO č. 21528-2 (2017), kvasinek a plísní podle normy ISO č. 6611 (2004) a halotolerantních mikroorganismů (stafylokoky) dle Chapmana (1945) kultivací na agaru s manitolem, chloridem sodným a fenolovou červení (MSA) při 37 °C po

dobu dvou dnů. Izolované bakterie byly přeneseny na bujón s mozkosrdcovou infuzí (BHI) a kultivovány 24-48 hodin při 25 °C (kvasinky a plísně), 37 °C (*Enterobacteriaceae*, *Staphylococcus*) nebo 30 °C (ostatní mikroorganismy). Výsledky byly vyjádřeny jako log CFU.g⁻¹.

5.1.2 Identifikace mikroorganismů

Každý z patnácti vzorků byl kultivován na osmi selektivně diagnostických půdách, ze kterých bylo následně vyizolováno 68 bakterií a kvasinek. Identifikace mikroorganismů byla provedena metodou MALDI-TOF MS za použití přístroje Bruker Autoflex Speed (Bruker Daltonics, Brémy, Německo) a databáze Biotyper 3.1 (Bruker Daltonics) po předchozí klasifikaci izolátů do jednotlivých skupin mikroorganismů. Vizualizace proteinových píků byla provedena pomocí programu mMass 5 (Strohalm *et al.*, 2010).



Obrázek 4: Schéma desítkového ředění vzorků

5.2 Analýza biogenních aminů

Pro analýzu biogenních aminů (BA) a polyaminů (PA) byly použity lyofilizované vzorky raw tyčinky. U každého ze vzorků byla provedena trojnásobná extrakce roztokem kyseliny chloristé o koncentraci 0,6 mol.l⁻¹ a následná filtrace. Zfiltrovaný extrakt byl poté použit pro derivatizaci a stanovení BA a PA dle Dadáková *et al.*, 2009 a Buňková *et al.*, 2013.

5.2.1 Detekce biogenních aminů

Koncentrace přítomných BA, konkrétně fenylethylaminu (PEA), histaminu (HIM) a tyraminu (TYM) a rovněž přítomných PA, jmenovitě kadaverinu (CAD), putrescinu (PUT), spermidinu (SPD) a sperminu (SPM), byly analyzovány pomocí UHPLC s UV/VIS detekcí. Separace byly provedeny gradientovou elucí (voda/acetonitril) na koloně Agilent Zorbax RRHD Eclipse Plus C18 s rozměry 50 x 3,0 mm a pórovitostí 1,8 μm (Agilent, Paolo Alto, USA) při teplotě 30 °C a průtoku kolonou nastaveném na 0,453 ml/min. Chromatografický systém Dionex HPLC UltiMate 3000 byl tvořen odplyňovací jednotkou (degaserem), binární pumpou, autosamplerem, termostatem kolon a UV/VIS detektorem (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA). Detekce byla provedena UV/VIS detektorem při vlnové délce 254 nm. Chromatogramy byly následně vyhodnoceny pomocí softwaru Chromeleon™ 6.8.

Program gradientové eluce, kterým probíhala separace dansylderivátů biogenních aminů, je znázorněn v tabulce 2.

Tabulka 2: Program gradientové eluce pro HPLC

Čas (min)	10% Acetonitril (%)	100% Acetonitril (%)
0,1	36	64
1,4	28	72
3,5	15	85
4,0	0	100
9,0	0	100
11,5	36	64
15,5	36	64

5.3 Charakteristika použitého materiálu

Celkem bylo analyzováno 15 vzorků tyčinek o různém složení, u kterých výrobci deklarovali raw kvalitu. Výrobky byly vyrobeny podle nařízení Rady (ES) č. 834/2007 o ekologické produkci a označování organických produktů, sušeny vzduchem do 42 °C a uchovávány v obalech s modifikovanou atmosférou. Ke každému vzorku byl přiřazen kód (Tabulka 3), pod kterým jsou v dalším textu označeny.

Tabulka 3: Charakteristika použitých vzorků

Výrobek	Kód	Složení
Raw kuličky tropický mix	B1	datle, mandle, mango sušené, ananas sušený, mandlová pasta, nepražené kakaové boby, raw sirup z agáve, pomerančová kůra, éterický pomerančový olej
Raw kuličky kokosové	B2	kokos strouhaný, rozinky Sultana, datle, slunečnicové semínko
Raw kuličky Jamaica	B3	datle, nepražené kakaové boby, mandle, mletá vanilka, koření
Raw tyčinka fíková	B4	datle, fíky, raw kešu, mandle
Raw marokánka čokoládová	B5	kakaové máslo, kakaový prášek, sirup z agáve, pomerančová kůra, mandle, vlašské ořechy, datle, rozinky, pekanové ořechy, slunečnicová semínka, dýňová semínka, kokos, jablka, mletá skořice, mletý kardamon, himalájská sůl růžová
Raw tyčinka s kešu	B6	kešu, rozinky, slunečnicová semínka
Raw tyčinka sezamová	B7	datle, sezam
Raw tyčinka zeleninová	B8	para ořechy, sušená rajčata s mořskou solí, česnek, cibule, rozinky Sultana, konopné semínko loupané, kumin (římský kmín) mletý, majoránka, chilli mleté
Raw kuličky jablečné	B9	rozinky, slunečnicová semínka jádra, jablečná vláknina prášek, skořice mletá
Raw tyčinka s červenou řepou	B10	datle, rozinky Sultana, slunečnicové semínko, prášek z červené řepy, extra panenský olivový olej, citronový esenciální olej
Raw kuličky kakaové	B11	rozinky, datle, kakao, kokos, chia semínka, slunečnice
Raw proteinová tyčinka banánová	B12	datle, banán, rýžový protein, kokos
Raw proteinová tyčinka lískooříšková	B13	datle, lískové oříšky, rýžový protein (tepelně nezpracovaná bílkovina z celozrnné hnědé rýže, rýžový oligodextrin, stévie, xantanová guma, mořská sůl, pektin), slunečnicová semínka, raw kakaová hmota, chia semínka
Raw tyčinka jablečná	B14	datle, aktivované slunečnicové semínko, jablka sušená, rozinky Sultana, skořice mletá
Raw tyčinka švestková	B15	datle, kešu, červená řepa, švestky, kakaové boby, mák

5.4 Statistická analýza

Získaná experimentální data byla analyzována za použití programu Microsoft Office Excel 2013 (Microsoft, Redmont, Washington, USA). Výsledky všech statistických testů byly zpracovány na hladině významnosti $p = 0,05$. K vyhodnocení získaných dat byl použit Kruskal-Wallisův test.

6 VÝSLEDKY A DISKUZE

6.1 Mikrobiologická analýza

Raw tyčinky, zejména díky vodní aktivitě, dostatku živin a pH, vytváří příhodné prostředí pro růst a přežití řady plísní, kvasinek, ale také bakterií. Výsledky mikrobiologické analýzy jsou uvedeny v příloze I (Příloha I, Tabulka 1). Množství mikroorganismů kultivovaných na půdě BHI se pohybovalo v rozmezí od 2,9 do 9,2 log CFU.g⁻¹. Ačkoli v současné legislativě neexistuje hygienický limit pro tento typ výrobků, je za bezpečnou považována hranice log 6,0 CFU.g⁻¹ (Červenka *et al.*, 2015). Až na dvě výjimky, konkrétně vzorky B3 (9,2 log CFU.g⁻¹) a B7 (7,5 log CFU.g⁻¹), testované raw tyčinky tuto hranici splnily. Počet kvasinek a plísní (CHYGA) se pohyboval v rozmezí od 2,3 do 4,0 log CFU.g⁻¹. Podobných výsledků dosáhl Červenka *et al.*, 2015, který uvádí množství plísní v raw potravinách pohybující se intervalu od 1,8 log CFU.g⁻¹ do 3,7 log CFU.g⁻¹. Kvasinky a plísně se vyskytovaly téměř na všech vzorcích a to i přes to, že ke vzorkům B9, B10, B12, B14 a B15 bylo aplikováno antimykotikum hexamidine v koncentraci 50 mg.l⁻¹. Zvýšený počet plísní může být způsoben kontaminací vstupních surovin či použitou technologií zpracování. Zvýšenou pozornost je třeba věnovat vzorkům B9, B12 a B15, u kterých byl zaznamenán nárůst plísní i po aplikaci zmíněného antimykotika. Z izolovaných plísní byly následně mikroskopicky určeny rody *Aspergillus* a *Penicillium* (Obrázek 1-3, Příloha III), které jsou zodpovědné za produkci mykotoxinů. Mnohými autory byl popsán zvýšený výskyt mykotoxinů, především ochratoxinu A a aflatoxinů, v datlích (Ragab *et al.*, 2001, Iamanaha *et al.*, 2005, Azaiez *et al.*, 2015) či rozinkách (Iamanaha *et al.*, 2007, Azaiez *et al.*, 2015), které tvoří podstatnou část raw tyčinek. Mykotoxiny byly nalezeny i v dalších surovinách, z nichž jsou raw tyčinky vyrobeny. Jedná se především o fíky (Drush a Aumann, 2005, Azaiez *et al.*, 2015), sušené švestky (Engel, 2000, Iamanaha *et al.*, 2005, Azaiez *et al.*, 2015), ale také arašidy (Hoeltz *et al.*, 2012, Schwartzbord a Brown, 2015), kešu (Milhome *et al.*, 2014), mandle (Rodriguez *et al.*, 2012), kokos (Saxena a Mehrotra, 1990) a slunečnicová semena (Jiménez *et al.*, 1991).

Počet koliformních bakterií (VRBA) se pohyboval v rozmezí od 2,7 do 7,3 log CFU.g⁻¹. Zvýšený počet koliformních bakterií byl pozorován u vzorků B3 (7,3 log CFU.g⁻¹) a B7 (6,7 log CFU.g⁻¹). Přítomnost koliformních bakterií může být způsobena hnojením biopotravin fekáliemi, přenosem hmyzím vektorem či kontaminovanou vodou. Červenka *et al.*, 2015 uvádí obsah koliformních bakterií u vzorků raw potravin v intervalu od 1,9 do 4,4 log CFU.g⁻¹.

¹, přičemž u dvou vzorků, vzhledem k antimikrobiálnímu působení mladého ječmene, neznamenal nárůst koliformních bakterií. Brožková *et al.*, 2016 uvádí obsah koliformních bakterií ve vstupních surovinách pro výrobu raw tyčinek, jakými jsou lískové ořechy (2,9 log CFU.g⁻¹), goji (2,8 log CFU.g⁻¹), kešu (< 1 log CFU.g⁻¹), chia semínka (< 1 log CFU.g⁻¹) a lněná semínka (5,9 log CFU.g⁻¹). Ačkoli byl popsán mikrobicidní účinek esenciálních olejů v citrusech, neměly tyto látky ve vzorcích B1 a B10 výraznější vliv na omezení počtu koliformních bakterií (Oikeh *et al.*, 2015). Počet stafylokoků (MSA) byl zjištěn v intervalu od 2,9 do 7,5 log CFU.g⁻¹, přičemž nejvyšší obsah vykazovaly vzorky B3 (7,5 log CFU.g⁻¹), B10 (5,3 log CFU.g⁻¹) a B2 (5,2 log CFU.g⁻¹). Enterokoky (SB) byly zaznamenány u 8 testovaných vzorků, přičemž se jejich počet pohyboval v intervalu od 3,0 log CFU.g⁻¹ do 4,13 log CFU.g⁻¹. Mléčné streptokoky (M17) byly pozorovány u všech vzorků. Jejich počet se pohyboval v rozmezí od 2,6 do 6,4 log CFU.g⁻¹. Laktobacily (MRS) byly přítomny ve vzorcích v intervalu od 2,7 log CFU.g⁻¹ do 6,7 log CFU.g⁻¹. Počet anaerobních bakterií (RCA) byl zaznamenán u 10 testovaných vzorků, kdy se jejich množství pohybovalo v intervalu od 2,3 do 6,1 log CFU.g⁻¹.

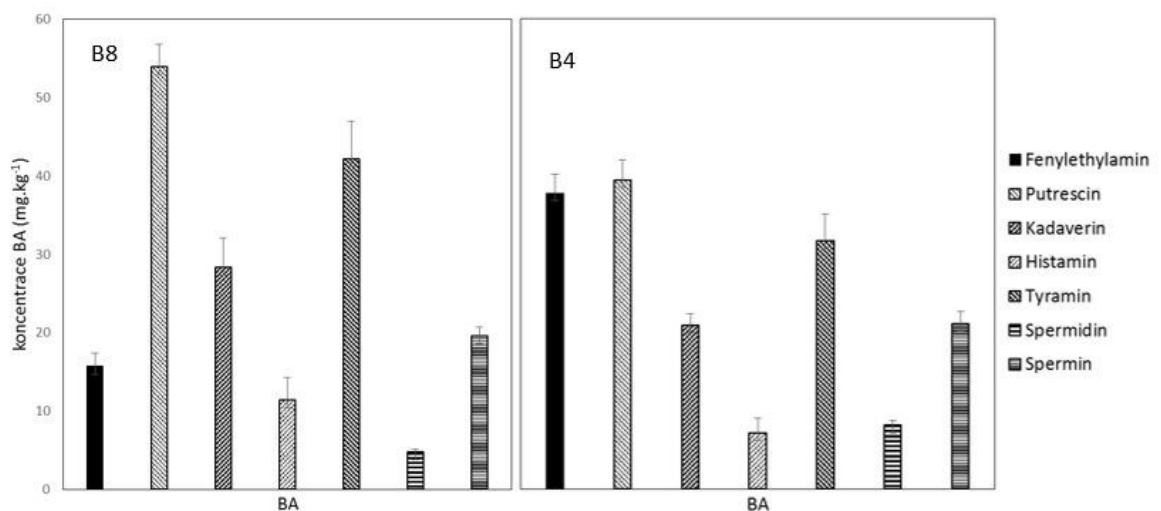
Z 15 vzorků, kultivovaných na 8 selektivně diagnostických půdách, bylo vyizolováno 68 bakterií a kvasinek, které byly dále identifikovány metodou MALDI-TOF MS. Identifikovány byly tyto mikroorganismy: *Acinetobacter pittii* (B6, B10), *Bacillus cereus* (B4, B10, B12, B15), *Bacillus safensis* (B9, B14, B15), *Bacillus thuringiensis* (B4), *Cronobacter sakazakii* (B6), *Enterococcus casseliflavus* (B15), *Micrococcus luteus* (B1, B5, B6, B7, B8, B10, B11, B12, B13), *Pseudomonas oryzae* (B6, B10), *Rhodotorula mucilaginosa* (B12), *Serratia fonticola* (B3), *Serratia marcescens* (B1, B3), *Staphylococcus aureus* (B3), *Staphylococcus hominis* (B1, B13), *Staphylococcus pasteurii* (B9), *Staphylococcus warneri* (B2, B4, B7).

6.2 Analýza biogenních aminů

Analýzu obsahu BA v raw tyčinkách graficky vyjadřují grafy uvedeny v Příloze II (Obrázek 1-15, Příloha II). Celkový obsah biogenních aminů se pohyboval v rozmezí u PEA od 8,14 mg.kg⁻¹ do 37,78 mg.kg⁻¹, u HIM od 2,14 mg.kg⁻¹ do 18,92 mg.kg⁻¹ a u TYM od 1,98 mg.kg⁻¹ do 42,23 mg.kg⁻¹.

Nejvyšší výskyt PEA byl zaznamenán u vzorků B4 (37,8 ± 2,4) mg.kg⁻¹ a B9 (35,0 ± 2,3) mg.kg⁻¹, nejnižší obsah PEA naopak vykazovaly vzorky B13 (8,1 ± 0,8) mg.kg⁻¹ a B3 (8,2 ± 1,6) mg.kg⁻¹. Nejvíce HIM obsahovaly vzorky B1 (18,9 ± 1,2) mg.kg⁻¹ a B13 (11,9 ± 2,0) mg.kg⁻¹, nejmenší koncentrace HIM byla zaznamenána u vzorků B3 (2,1 ± 0,8) mg.kg⁻¹ a B2 (2,9 ± 1,1) mg.kg⁻¹. Nejvyšší výskyt TYM byl zaznamenán u vzorků B8 (42,2 ± 4,8) mg.kg⁻¹ a B4 (31,7 ± 3,4) mg.kg⁻¹, nejnižší obsah TYM naopak vykazovaly vzorky B6 (2,0 ± 0,5) mg.kg⁻¹ a B14 (3,3 ± 1,6) mg.kg⁻¹. Na základě provedené statistické analýzy byly zjištěny statisticky významné rozdíly ($P \leq 0,05$) v obsahu BA u jednotlivých raw tyčinek.

PEA byl popsán jako přirozená složka kakaových bobů (Halász *et al.*, 1994, Santos, 1996). V nepražených kakaových bobech byl popsán výskyt PEA <20 mg.kg⁻¹, vyšší koncentrace souvisí až s dekarboxylací přítomného fenylalaninu na PEA v důsledku pražení (Halász *et al.*, 1994). Ve vzorcích, které obsahovaly kakaové boby či kakaový prášek nebyly zaznamenány zvýšené koncentrace PEA. Koncentrace histaminu nepřekročily hranici 20 mg.kg⁻¹. V porovnání s obsahem HIM v kysaném zelí (42-52 mg.kg⁻¹), v láku dokonce 143-174 mg.kg⁻¹ či sýrem Parmesan (272 mg.kg⁻¹), jsou tyto hodnoty zanedbatelné (Halász *et al.*, 1994). Zvýšený výskyt TYM byl popsán v rajčeti, švestkách a banánech (Halász *et al.*, 1994). Nejvyšší obsah TYM byl zaznamenán ve vzorku B8, který obsahuje sušená rajčata. Rovněž ve vzorku B12 (banánová) a B15 (švestková) byly zaznamenány zvýšené koncentrace TYM.



Obrázek 5: Koncentrace biogenních aminů ve vzorcích B8 (zeleninová raw tyčinka) a B4 (fíková raw tyčinka)

Celkový obsah polyaminů se pohyboval u CAD v rozmezí od $6,88 \text{ mg.kg}^{-1}$ do $28,32 \text{ mg.kg}^{-1}$, PUT od $8,31 \text{ mg.kg}^{-1}$ do $53,95 \text{ mg.kg}^{-1}$, SPD od $0,76 \text{ mg.kg}^{-1}$ do $11,23 \text{ mg.kg}^{-1}$ a SPM od $9,24 \text{ mg.kg}^{-1}$ do $30,73 \text{ mg.kg}^{-1}$.

Nejvyšší výskyt CAD byl zaznamenán u vzorků B8 ($28,3 \pm 3,8 \text{ mg.kg}^{-1}$) a B7 ($25,7 \pm 2,4 \text{ mg.kg}^{-1}$), nejnižší obsah CAD vykazovaly vzorky B6 ($6,9 \pm 1,1 \text{ mg.kg}^{-1}$) a B2 ($10,1 \pm 0,8 \text{ mg.kg}^{-1}$). Nejvíce PUT obsahovaly vzorky B8 ($54,0 \pm 2,9 \text{ mg.kg}^{-1}$) a B4 ($39,4 \pm 2,6 \text{ mg.kg}^{-1}$), nejmenší koncentrace PUT byla zaznamenána u vzorků B3 ($8,3 \pm 0,6 \text{ mg.kg}^{-1}$) a B14 ($10,1 \pm 1,7 \text{ mg.kg}^{-1}$). Nejvyšší výskyt SPD byl zaznamenán u vzorků B6 ($11,2 \pm 0,9 \text{ mg.kg}^{-1}$) a B7 ($10,3 \pm 0,9 \text{ mg.kg}^{-1}$), nejnižší obsah SPD naopak vykazovaly vzorky B12 ($0,8 \pm 0,3 \text{ mg.kg}^{-1}$) a B10 ($2,8 \pm 0,2 \text{ mg.kg}^{-1}$). Nejvyšší výskyt SPM byl zaznamenán u vzorků B3 ($30,7 \pm 2,4 \text{ mg.kg}^{-1}$) a B6 ($26,3 \pm 1,8 \text{ mg.kg}^{-1}$), nejnižší obsah SPM naopak vykazovaly vzorky B10 ($9,2 \pm 0,4 \text{ mg.kg}^{-1}$) a B9 ($10,8 \pm 0,7 \text{ mg.kg}^{-1}$).

Nishibori *et al.*, 2005, uvádí množství polyaminu SPM v mandlích ($13,6 \text{ mg.kg}^{-1}$) a kešu ($24,1 \text{ mg.kg}^{-1}$). S tímto tvrzením koresponduje fakt, že nejvyšší koncentrace SPM v raw tyčinkách obsahovaly vzorky B3 (mandle) a B6 (kešu). Celkový obsah SPD ($<15 \text{ mg.kg}^{-1}$), lze považovat za velmi nízký. Nejvyšší obsah PUT byl zaznamenán ve vzorku B8 ($54,0 \pm 2,9 \text{ mg.kg}^{-1}$), obsahujícím zeleninovou složku. Tento údaj nekoresponduje s hodnotami, které uvádí Nishibori *et al.*, 2005, kteří popsali výskyt PUT v rajčeti ($5,9 \text{ mg.kg}^{-1}$), rozinkách ($0,1 \text{ mg.kg}^{-1}$), česneku a cibuli (shodně $2,3 \text{ mg.kg}^{-1}$), tedy v koncentracích řádově desetkrát nižších.

Mikroorganismy mohou vykazovat schopnost produkovat nebo degradovat biogenní aminy *in vitro* a mohou být použity jako mikrobiologické indikátory k prevenci akumulace BA v potravinách (Butor *et al.*, 2017). Halász *et al.*, popsali korelaci mezi čeledí *Enterobacteriaceae* a produkcí PUT a CAD a rovněž produkci PUT bakteriemi rodu *Pseudomonas*. Byun a Mah, 2012 zmiňují zvýšenou produkci TYM a SPD rodu *Bacillus*. Pachlová *et al.*, 2017, uvádí obsah biogenních aminů (TYM, PUT, HIM a PEA) během skladování sýra. Ve všech vzorcích sýra se s postupujícím časem navyšovala koncentrace biogenních aminů. V závislosti na tomto zjištění by bylo proto zajímavé porovnat testované vzorky se vzorky raw tyčinek před končící dobou expirace.

ZÁVĚR

V první části se tato práce zabývala charakteristikou raw potravin, mikrobiální jakostí raw potravin a problematikou biogenních aminů. K experimentu bylo vybráno 15 raw tyčinek o různém složení. Tyto potraviny byly podrobeny mikrobiologické analýze, jejímž cílem bylo nalezení indikátorových skupin mikroorganismů (fakultativně anaerobní mezofilní mikroorganismy, enterobakterie, stafylokoky, kvasinky, plísně a bakterie mléčného kvašení). Rovněž byla provedena identifikace mikroorganismů pomocí MALDI-TOF MS. Zároveň byly tyto potraviny analyzovány UHPLC s UV/VIS detekcí za účelem vyhodnocení a identifikace obsahu biogenních aminů. Nejvyšší koncentrace biogenních aminů byla zaznamenána ve vzorku B8. Jednalo se raw tyčinku obsahující zeleninovou složku, kdy tento výrobek, mimo jiných, obsahoval biogenní amin tyramin v koncentraci $42,23 \text{ mg.kg}^{-1}$ a polyamin putrescin v koncentraci $53,95 \text{ mg.kg}^{-1}$. Více než polovina vzorků nepřekročila hranici koncentrace biogenních aminů 15 mg.kg^{-1} , dvě třetiny vzorků poté nepřesáhly hranici 20 mg.kg^{-1} . Identifikací přítomných mikroorganismů bylo prokázáno nejčastější zastoupení rodů *Micrococcus*, *Staphylococcus* a *Bacillus*, u kterých byla popsána dekarboxylázová činnost. S ohledem na tento fakt, je třeba brát v úvahu i obsah jednotlivých biogenních aminů v testovaných vzorcích. Dosažené výsledky této práce ukazují, že raw tyčinky obsahují různé mikrobiální zastoupení v závislosti na jejich složení. Je důležité věnovat pozornost obsahu jednotlivých typů potravin a jejich mikroflóře, zejména ve vztahu k lidskému zdraví. Ačkoli nebylo primárním cílem této práce studium obsahu plísní, výskyt mykotoxikogenních rodů *Aspergillus* a *Penicillium* ve studovaných vzorcích je alarmující. Přítomnost mykotoxinů je v těchto výrobcích velmi pravděpodobná, a proto by bylo vhodné zacílit výzkum raw tyčinek tímto směrem. Obsah biogenních aminů v testovaných vzorcích nebyl vysoký. Je však třeba brát zřetel na koktejlový efekt těchto látek, a proto i raw tyčinky konzumovat v přiměřeném množství.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

AGTE, V., TARWADI, K., MENGALE, S., HINGE, A., CHIPLONKAR, S.. Vitamin profile of cooked foods: how healthy is the practice of ready-to-eat foods?. *Inetrnational Journal of Food Sciences and Nutrition*. 2002, **53**(3), 197-208.

ASKAR, A., TREPTOW H. Biogene Amine in Lebensmitteln: Vorkommen, Bedeutung und Bestimmung. *Stuttgart: E. Ulmer*, 1986. ISBN 3800121328.

ASLINIA, F., MAZZA, J., J., YALE, S., H. Megaloblastic Anemia and Other Causes of Macrocytosis. *Clinical Medicine and Research*. 2006, **4**(3), 236-241.

AZAIIEZ, I., FONT, G., MAÑES, J., FERNÁNDEZ-FRANZÓN, M. Survey of mycotoxins in dates and dried fruits from Tunisian and Spanish markets. *Food Control*. 2015, **51**, 340-346. ISSN 09567135

BARBUZZI, G., GRIMALDI, F., DEL NOBILE, M. A. Quality decay of fresh processed fish stored under refrigerated conditions. *Journal of Food Safety*. 2009, **29**(2), 271-286. ISSN 01496085.

BARDÓCZ, S. Polyamines in food and their consequences for food quality and human health. 1995, **6**(10), 341-346. ISSN 09242244.

BARDOT, O., ALDRIDGE, T., C., LATRUFFE, N., GREEN, S. PPAR-RXR Heterodimer Activates a Peroxisome Proliferator Response Element Upstream of the Bifunctional Enzyme Gene. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1993, **192**(1), 37-45. ISSN 0006291X.

BEDIA ERIM, F. Recent analytical approaches to the analysis of biogenic amines in food samples. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2013, **52**, 239-247. ISSN 01659936.

BENKERROUM, N. Biogenic Amines in Dairy Products: Origin, Incidence, and Control Means. ISBN 10.1111/1541-4337.12212.

BROŽKOVÁ, I., ČERVENKA, L., MICHÁLKOVÁ, K., VELICHOVÁ, H. The effect of processing temperature on microbial safety and antioxidant activity of minimally processed “raw food”. *Journal of Food and Nutrition Research*. 2016, **55**(4), 352–360. ISSN 1336-8672.

BUI-KLIMKE, T., R., WU, F. Ochratoxin A and Human Health Risk: A Review of the Evidence. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2013, **55**(13), 1860-1869. ISSN 1040-8398.

BUŇKOVÁ, L., ADAMCOVÁ, G., HUDCOVÁ, K., VELICHOVÁ, H., PACHLOVÁ, V., LORENCOVÁ, E., BUŇKA, F. Monitoring of biogenic amines in cheeses manufactured at small-scale farms and in fermented dairy products in the Czech Republic. *Food Chemistry*. 2013, **141**(1), 548-551. ISSN 03088146.

BUŇKOVÁ, L., BUŇKA, F., LUKEŠOVÁ, P., MRKVIČKA, V., DOLEŽALOVÁ, M., KRÁČMAR, S. Produkce biogenních aminů bakteriemi izolovanými z povrchu drůbeže. *Potravinářstvo*. 2009, **3**, 7-11. ISSN 1337-0960.

BUTOR, I., PIŠTĚKOVÁ, H., PUREVDORJ, K., JANČOVÁ, P., BUŇKA, F., BUŇKOVÁ, L. *Biogenic amines degradation by microorganisms isolated from cheese*. ISBN 10.5219/736.

BYUN, B., Y., MAH, J., H. Occurrence of Biogenic Amines in Miso, Japanese Traditional Fermented Soybean Paste. *Journal of Food Science*. 2012, **77**(12), 216-223. ISSN 00221147.

CRAIG, W., J. Health effects of vegan diets. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2009, **89**(5), 1627S-1633S. ISSN 0002-9165

CUNHA, S., C., LOPES, R., FERNANDES, J., O. Biogenic amines in liqueurs: Influence of processing and composition. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2016, **56**, 147-155. ISBN 10.1016/j.jfca.2016.11.016.

CUNNINGHAM, E. What is a raw foods diet and are there any risks or benefits associated with it?. *Journal of the American Dietetic Association*. 2004, **104**(10), 1623. ISSN 00028223.

ČERVENKA, L., BROŽKOVÁ, I., FIŠEROVÁ, T. The quality of fruit bars and crackers designated for the raw food vegan diet. *Scientific Papers of the University of Pardubice, Series A. Faculty of Chemical Technology*, 2016, **22**, 5-13.

DĄBROWSKI, W. M., SIKORSKI, Z. E. *Toxins in food*. Boca Raton, FL: CRC Press, 2005. ISBN 0849319048.

DADÁKOVÁ, E., KRÍŽEK, M., PELIKÁNOVÁ, T. Determination of biogenic amines in foods using ultra-performance liquid chromatography (UPLC). *Food Chemistry*, 2009, **116**(1), 365-370. ISSN 0308-8146.

DAVEY, G., K., SPENCER, E., A., APPLEBY, P., N., ALLEN, N., E., KNOX, K., H.,

- KEY, T., J. EPIC-Oxford: lifestyle characteristics and nutrient intakes in a cohort of 33 883 meat-eaters and 31 546 non meat-eaters in the UK. *Public Health Nutrition*. 2003, **6**(3), 259-269. ISSN 1368-9800.
- DEL RIO, B., REDRUELLO, B., LINARES, D., M., LADERO, V., FERNANDEZ, M., MARTIN, M., C., RUAS-MADIEDO, P., ALVAREZ, M., A. The dietary biogenic amines tyramine and histamine show synergistic toxicity towards intestinal cells in culture. *Food Chemistry*, 2017, **218**, 249-255. ISSN 03088146.
- DEWELL, A., WEIDNER, G., SUMNER, M., D., CHI, C., S., ORNISH, D. A Very-Low-Fat Vegan Diet Increases Intake of Protective Dietary Factors and Decreases Intake of Pathogenic Dietary Factors. *Journal of the American Dietetic Association*. 2008, **108**(2), 347-356. ISSN 00028223.
- DIČÁKOVÁ, Z., DUDRIKOVÁ, E. Biogénne amíny ako chemické nebezpečenstvo. In *Rizikové faktory potravinového reťazca*. Nitra: Slovenská poľnohospodárska univerzita, 2006. ISBN 80-8069-760-4.
- DRUSCH, S., AUMANN, J. *Mycotoxins in Fruits: Microbiology, Occurrence, and Changes during Fruit Processing*. Elsevier, 2005, 2005, (50), 33-78. Advances in Food and Nutrition Research. ISBN 9780120164509.
- ENGEL, G. Ochratoxin A in sweets, oil seeds and dairy products. *Archiv für Lebensmittelhygiene*. 2000, **51**, 98-101. ISSN 0003-925X.
- FONSECA-AZEVEDO, K., HERCULANO-HOUZEL, S. Metabolic constraint imposes tradeoff between body size and number of brain neurons in human evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2012, **109**(45), 18571-18576. ISSN 0027-8424.
- FONTANA, L., SHEW, J., L., HOLLOSZY, J., O., VILLAREAL, D., T. Low Bone Mass in Subjects on a Long-term Raw Vegetarian Diet. *Archives of Internal Medicine*. 2005, **165**(6), 684-689. ISSN 0003-9926.
- GANSS, C., SCHLECHTRIEMEN, M., KLIMEK, J. Dental Erosions in Subjects Living on a Raw Food Diet. *Caries Research*. 1999, **33**(1), 74-80. ISSN 0008-6568.
- GLICK-BAUER, M., YEH, M., C. The Health Advantage of a Vegan Diet: Exploring the Gut Microbiota Connection. *Nutrients*. 2014, **6**(11), 4822-4838. ISSN 2072-6643.
- GÖRNER, F., VALÍK, Ľ. *Aplikovaná mikrobiológia požívatin: princípy mikrobiológie požívatin, potravinársky významné mikroorganizmy a ich skupiny, mikrobiológia potravinárskych výrob, ochorenia mikrobiálneho povodu, ktorých zárodky sú prenášané požívatinami*. Bratislava: Malé centrum, 2004. ISBN 80-967-0649-7.

GREIF, G., GREIFOVÁ, M., DRDÁK, M. Stanovenie biogénnych amínov v potravinách živočíšneho pôvodu metódou HPLC. *Potravinárske vedy*, 1997, **15**(2), 119-129.

GREIF, G., KAROVIČOVÁ, J., KOHAJDOVÁ, Z. Biogénne amíny v potravinách. *Potravinárstvo*, 2008, **2**, 30-49. ISSN 1337-0960.

HALÁSZ, A., BARÁTH, Á., SIMON-SARKADI, L., HOLZAPFEL, W. Biogenic amines and their production by microorganisms in food. *Trends in Food Science and Technology*, 1994, **5**(2), 42-49. ISSN 09242244.

HANUŠKOVÁ, D., SPÁČILOVÁ, J., POHOŘALÁ, A., MATĚJOVÁ, H. Raw food versus cooked food aneb syrová strava versus vařená strava. *Výživa a potraviny*. Praha: Výživaser-vis, 2017, (2), 52-54. ISSN 1211-846X.

HOELTZ, M., EINLOFT, T., C., OLDONI, V., P., DOTTORI, H., A., NOLL, I., B. The occurrence of aflatoxin B1 contamination in peanuts and peanut products marketed in southern Brazil. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 2012, **55**(2), 313-317. ISSN 1516-8913.

CHAPMAN, G., H. The significance of sodium chloride in studies of staphylococci. *Journal of Bacteriology*. 1945, **50**(2), 201-203.

IAMANAKA, B., T., DE MENEZES, H., C., VICENTE, E., LEITE, R., S., F., TANIWAKI, M., H. Aflatoxigenic fungi and aflatoxins occurrence in sultanas and dried figs commercialized in Brazil. *Food Control*. 2007, **18**(5), 454-457.

IAMANAKA, B., T., TANIWAKI, M., H., DE MENEZES, H., C., VICENTE, E., FUNGARO, M., H., P. Incidence of toxigenic fungi and ochratoxin A in dried fruits sold in Brazil. *Food Additives and Contaminants*. 2005, (22), 1258–1263.

IGWEMMAR, N., C., KOLAWOLE, S., A., IMRAN, I., A. Effect Of Heating On Vitamin Content Of Some Selected Vegetables. *International Journal of Scientific and Technology Research*. 2013, **2**(11). ISSN 2277 - 8616.

ISO 4833-1: 2013. Microbiology of the Food Chain – Horizontal Method for the Enumeration of Microorganisms – Part 1: Colony Count at 30 Degrees C by the Pour Plate Technique.

ISO 6611: 2004. Milk and Dairy Products – Enumeration of Colony-forming Units of Yeasts and/or Moulds – Colony Count Technique at 25 °C.

ISO 21528-2: 2017. Microbiology of Food and Animal Feeding Stuffs – Horizontal Methods for the Detection and Enumeration of Enterobacteriaceae – Part 2: Colony Count Method.

JIMÉNEZ, M., MATEO, R., QUEROL, A., HUERTA, T., HERNÁNDEZ, E. Mycotoxins and mycotoxigenic moulds in nuts and sunflower seeds for human consumption. *Mycopathologia*. 1991, **115**(2), 121-127. ISSN 0301-486X.

JUNEJA, V., K., SOFOS, J., N. Pathogens and Toxic in foods: Challenges and Interventions. *Washington, DC: ASM Press*, 2010, 512 s. ISBN 9781555814595.

KALÁČ, P., KŘÍŽEK, M. Biogenní aminy a polyaminy v potravinách a jejich vliv na lidské zdraví. *Potravinářská revue*. 2005, (2), 40-42. ISSN 1801-9102.

KAROVIČOVÁ, J., KOHAJDOVÁ, Z. Biogenic Amines in Food. *ChemInform*. 2005, **36**(34), 70-79. ISSN 0931-7597.

KHANUM, F., SIDDALINGA SWAMY, M., SUDARSHANA KRISHNA, K., R., SANTHANAM, K., VISWANATHAN, K., R. Dietary fiber content of commonly fresh and cooked vegetables consumed in India. *Plant Foods for Human Nutrition*. 2000, **55**(3), 207-218.

KOEBNICK, C., GARCIA, A., L., DAGNELIE, P., C., STRASSNER, C., LINDEMANS, J., KATZ, N., LEITZMANN, C., HOFFMANN, I. Long-Term Consumption of a Raw Food Diet Is Associated with Favorable Serum LDL Cholesterol and Triglycerides but Also with Elevated Plasma Homocysteine and Low Serum HDL Cholesterol in Humans. *The Journal of Nutrition*. 2005, **135**(10), 2372-2378. ISSN 0022-3166.

KOEBNICK, C., STRASSNER, C., HOFFMANN, I., LEITZMANN, C. Consequences of a Long-Term Raw Food Diet on Body Weight and Menstruation: Results of a Questionnaire Survey. *Annals of Nutrition and Metabolism*. 1999, **43**(2), 69-79.

KOHAJDOVÁ, Z., KAROVIČOVÁ, J., GRIEF, G. Biogénne aminy v potravinách. *Potravinářstvo*, 2008, **2**, 30-49. ISSN 1337-0960.

KOŠMERL, T., ŠUČUR, S., PROSEN, H. Biogenic amines in red wine: The impact of technological processing of grape and wine. *Acta agriculturae Slovenica*. 2013, **101**(2). ISSN 1854-1941.

KŘÍŽEK, M., KALÁČ, P. Biogenní aminy v potravinách a jejich role ve výživě. *Czech Journal of Food Science*, 1998, **16**, 151-159.

KVASNIČKOVÁ, A. *Minerální látky a stopové prvky: Essenciální minerální prvky ve výživě*. Praha: Ústav zemědělských a potravinářských informací, 1998. ISBN 80-851-2094-1.

LANDETE, J. M., DE LAS RIVAS, B., MARCOBAL, A., MUÑOZ, R. Molecular methods for the detection of biogenic amine-producing bacteria on foods. *International Journal of Food Microbiology*, 2007, **117**(3), 258-269. ISSN 01681605.

- LANOU, A., J., SVENSON, B. Reduced cancer risk in vegetarians: an analysis of recent reports. *Cancer Management and Research*. 2011, **3**, 1-8. ISSN 1179-1322.
- LEHANE, L., OLLEY, J. Histamine fish poisoning revisited. *International Journal of Food Microbiology*. 2000, **58**(1-2), 1-37. ISSN 01681605.
- LI, Y., YANG, H., LIAO, H., FAN, H., LIANG, C., DENG, L., JIN, S. Simultaneous determination of ten biogenic amines in a thymopolypeptides injection using ultra-performance liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem quadrupole mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 2013, **929**, 33-39. ISSN 15700232.
- LING, W., H., HÄNNINEN, O. Shifting from a conventional diet to an uncooked vegan diet reversibly alters fecal hydrolytic activities in humans. *The Journal of Nutrition*. 1992, **122**(4), 924-930.
- LONVAUD-FUNEL, A. Biogenic amines in wines: role of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Letters*. 2001, **199**(1), 9-13. ISSN 03781097.
- LØVAAS, E. Antioxidative effects of polyamines. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 1991, **68**(6), 353-358. ISBN 10.1007/BF02663749.
- MAHAN, L., K., RAYMOND, J., L. *Krause's food & the nutrition care process*. Fourteenth edition. St. Louis, Missouri: Elsevier, 2017. ISBN 978-032-3340-755.
- MILHOME, M., A., L., LIMA, C., G., DE LIMA, L., K., LIMA, F., A., F., SOUSA, D., O., B., NASCIMENTO, R., F. Occurrence of aflatoxins in cashew nuts produced in northeastern brazil. *Food Control*. 2014, **42**, 34-37. ISSN 09567135.
- NAILA, A., FLINT, S., FLETCHER, G., BREMER, P., MEERDINK, G. Control of Biogenic Amines in Food-Existing and Emerging Approaches. *Journal of Food Science*, 2010, **75**(7), R139-R150. ISSN 00221147.
- NAŘÍZENÍ KOMISE (ES) č. 2073/2005 ze dne 15. listopadu 2005 o mikrobiologických kritériích pro potraviny. Dostupné na: <<http://eur-lex.europa.eu>>.
- NISHIBORI, N., FUJIHARA, S., AKATUKI, T. Amounts of polyamines in foods in Japan and intake by Japanese. *Food Chemistry*. 2007, **100**(2), 491-497. ISSN 03088146.
- NOWAK, A., CZYZOWSKA, A. In vitro synthesis of biogenic amines by *Brochothrix thermosphacta* isolates from meat and meat products and the influence of other microorganisms. *Meat Science*, 2011, **88**(3), 571-574. ISSN 03091740.
- NUÑEZ, M., DEL OLMO, A., CALZADA, J. Biogenic Amines. *Encyclopedia of Food and Health*. Elsevier, 2016, 416-423. ISBN 9780123849533.

OGAWA, H., TSUJI, H., SETO, A., HARA, S., TOTANI, Y. Synergistic Effect of Spermine on Antioxidation of Polyunsaturated Oil. *Journal of Japan Oil Chemists' Society*, 1996, **45**(12), 1327-1332. ISSN 1341-8327.

ÖNAL, A. A review: Current analytical methods for the determination of biogenic amines in foods. *Food Chemistry*, 2007, **103**(4), 1475-1486. ISSN 03088146.

ORLICH, M., J., JACELDO-SIEGL, K., SABATÉ, J., FAN, J., SINGH, P., N., FRASER., G., E. Patterns of food consumption among vegetarians and non-vegetarians. *British Journal of Nutrition*. 2014, **112**(10), 1644-1653. ISSN 0007-1145.

PACHLOVÁ, V., CHAROUSOVÁ, Z., ŠOPÍK, T. Effect of milk origin on proteolysis and accumulation of biogenic amine during ripening of Dutch-type cheese. *Potravinárstvo Slovak Journal of Food Sciences*. 2017, **11**(1), 363-367. ISBN 10.5219/741.

PALERMO, M., PELLEGRINI, N., FOGLIANO, V. The effect of cooking on the phytochemical content of vegetables. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2014, **94**(6), 1057-1070. ISSN 00225142.

PLEVA, P. Faktory ovlivňující produkci biogenních aminů u vybraných bakterií rodů *Enterococcus* a *Staphylococcus*. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2017, 152 s. ISBN 978-80-7454-689-1.

PUEL, O., GALTIER, P., OSWALD, I. Biosynthesis and Toxicological Effects of Patulin. *Toxins*. 2010, **2**(4), 613-631. ISSN 2072-6651.

RAGAB, W., S., M., RAMADAN, B., R., ABDEL-SATER, M., A. Mycoflora and aflatoxins associated with saidy date affected by technological processes. *The Second International Conference on Date Palms*. UAE University, Al Ain, UAE, 2001, 409–421.

RAO, A., V., AGARWAL, S. Role of antioxidant lycopene in cancer and heart disease. *Journal of the American College of Nutrition*. 2000, **19**(5), 563-569.

RODRIGUES, P., VENÂNCIO, A., LIMA, N. Incidence and diversity of the fungal genera *Aspergillus* and *Penicillium* in Portuguese almonds and chestnuts. *European Journal of Plant Pathology*. 2013, **137**(1), 197-209. ISSN 0929-1873.

SAGRATINI, G., FERNÁNDEZ-FRANZÓN, M., DE BERARDINIS, F., FONT, G., VITTORI, S., MAÑES, J. Simultaneous determination of eight underivatized biogenic amines in fish by solid phase extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Food Chemistry*, 2012, **132**(1), 537-543. ISSN 03088146.

SAHOVIC, S., VUKOBRAT-BIJEDIC, Z., SAHOVIC, V. Importance of Sideropenic Anemia in the Diagnosis of Gastrointestinal Tract Tumors. *Materia Socio-medica*. 2012, **24**(2), 81-83. ISBN 10.5455/msm.2012.24.81-83.

- ŞANLI, T., ŞENEL, E. Formation of Biogenic Amines in Cheese. *Processing and Impact on Active Components in Food*. Elsevier, 2015, 223-230. ISBN 9780124046993.
- SANTOS, W., C., SOUZA, M., R., CERQUEIRA, M., GLÓRIA, M., B. Bioactive amines formation in milk by *Lactococcus* in the presence or not of rennet and NaCl at 20 and 32 °C. *Food Chemistry*. 2003, **81**(4), 595-606. ISSN 03088146.
- SAXENA, J., MEHROTRA, B. S. The occurrence of mycotoxins in some dry fruits retail marketed in Nainital district of India. *Acta Alimentaria*. 1990, (19), 221–224.
- SHALABY, A., R. Significance of biogenic amines to food safety and human health. *Food Research International*, 1996, **29**, 675-690. ISSN 0963-9969.
- SCHWAN, R., F., WHEALS, A., E. The Microbiology of Cocoa Fermentation and its Role in Chocolate Quality. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2004, **44**(4), 205-221. ISSN 1040-8398.
- SCHWARTZBORD, J., R., BROWN, D., L. Aflatoxin contamination in Haitian peanut products and maize and the safety of oil processed from contaminated peanuts. *Food Control*. 2015, **56**, 114-118. ISSN 09567135.
- SILLA-SANTOS, M., H. Biogenic amines: their importance in foods. *International Journal of Food Microbiology*. 1996, **29**(2-3), 213-231. ISSN 01681605.
- SOETAN, K., O., OYEWOLE, O., E. The need for adequate processing to reduce the anti-nutritional factors in plants used as human foods and animal feeds: A review. *African Journal of Food Scienc*. 2009, **3**(9), 223-232. ISSN 1996-0794.
- STROHALM, M., KAVAN, D., NOVÁK, P., VOLNÝ, M., HAVLÍČEK, V. MMass 3: A Cross-Platform Software Environment for Precise Analysis of Mass Spectrometric Data. *Analytical Chemistry*. 2010, **82**(11), 4648-4651. ISSN 0003-2700.
- SVAČINA, Š. *Klinická dietologie*. Praha: Grada, 2008. ISBN 80-247-2256-9.
- TANTAMANGO-BARTLEY, Y., JACELDO-SIEGL, K., FAN, J., FRASER, G. *Vegetarian Diets and the Incidence of Cancer in a Low-risk Population*. 2013, **22**(2), 286-294. ISSN 1055-9965.
- TAVANI, A., LA VECCHIA, C. B-Carotene and risk of coronary heart disease. A review of observational and intervention studies. *Biomedicine and Pharmacotherapy*. 1999, **53**(9), 409-416. ISSN 07533322.
- TAYLOR, S., L., SPECKHARD, M., W. Isolation of histamine-producing bacteria from frozen tuna. *Marine Fisheries Review*, 1983, **45**(4-6).

TETI, D., VISALLI, M., MCNAIR, H. Analysis of polyamines as markers of (patho)physiological conditions. *Journal of Chromatography B*. 2002, **781**(1-2), 107-149. ISSN 15700232.

TOFALO, R., PERPETUINI, G., SCHIRONE, M., SUZZI, G. Biogenic Amines: Toxicology and Health Effect. *Encyclopedia of Food and Health*. Elsevier, 2016, 424-429. ISBN 9780123849533.

TORO-FUNES, N., BOSCH-FUSTE, J., LATORRE-MORATALLA, M., L., VECIANA-NOGUÉS M., T., VIDAL-CAROU, M., C. Biologically active amines in fermented and non-fermented commercial soybean products from the Spanish market. *Food Chemistry*. 2015, (173), 1119-1124. ISSN 03088146.

VELÍŠEK, J. *Chemie potravin*. Tábor: OSSIS, 1999. ISBN 8090239145.

VEVERKA, K. Mikrobiologická kvalita čerstvého ovoce a zeleniny. *Vědecký výbor fyto-sanitární a životního prostředí*. [online]. 2003 [cit. 2018-05-14]. Dostupné z: <http://www.phytosanitary.org/projekty/2003/vvf-18-03.pdf>

WATANABE, F. Vitamin B 12 Sources and Bioavailability. *Experimental Biology and Medicine*. 2016, **232**(10), 1266-1274. ISSN 1535-3702

WATERS, D., M., ARENDT, E., K., MORONI, A., V. Overview on the mechanisms of coffee germination and fermentation and their significance for coffee and coffee beverage quality. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2015, **57**(2), 259-274. ISSN 1040-8398.

ZAMAN, Z., M. A review: Microbiological, physicochemical and health impact of high level of biogenic amines in fish sauce. *American Journal of Applied Sciences*. 2009, **6**, 1199-1211. ISSN 1546-9239.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

BA	Biogenní aminy
BHI	Bojón s mozkosrdcovou infuzí
BMI	Index tělesné hmotnosti
CAD	Kadaverin
CFU	Kolonie tvořící jednotku
DAO	Diaminooxidáza
HIM	Histamin
HMT	Histidinmethyltransferáza
CHYGA	Agar s chloramfenikolem, glukózou a kvasničným extraktem
MALDI-TOF MS	Hmotnostní spektrometrie s laserovou desorpčí a ionizací za účasti matrice s průletovým analyzátozem
MAO	Monoaminooxidáza
MSA	Agar s manitolem, chloridem sodným a fenolovou červení
PA	Polyaminy
PEA	2-fenylethylamin
PUT	Putrescin
SPD	Spermidin
SPM	Spermin
TRM	Tryptamin
TYM	Tyramin
UHPLC	Ultra vysoce účinná kapalinová chromatografie
UV/VIS	Ultrafialová a viditelná oblast elektromagnetického spektra
VRBA	Agar s krystalovou violetí, neutrální červení a žlučí

SEZNAM OBRÁZKŮ, TABULEK A PŘÍLOH

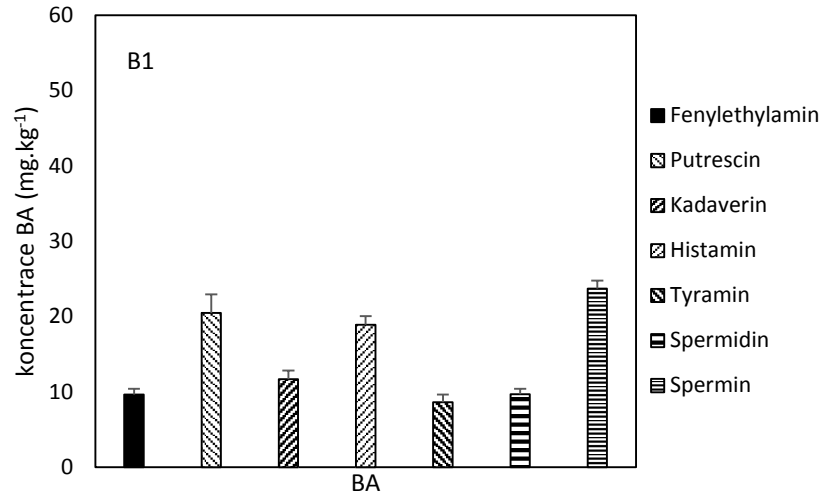
Obrázek 1: Schéma dekarboxylace aminokyselin (Kohajdová <i>et al.</i> , 2008).....	15
Obrázek 2: Cesta přijatých biogenních aminů v intestinálním traktu člověka (Pleva, 2017).....	19
Obrázek 4: Testované vzorky (vlevo nahoře-raw tyčinka sezamová, vpravo nahoře-raw tyčinka s kešu, vlevo dole-raw marokánka čokoládová, vpravo dole-raw kulička jablková)	25
Obrázek 3: Schéma desítkového ředění vzorků.....	26
Obrázek 5: Koncentrace biogenních aminů ve vzorcích B8 (zeleninová raw tyčinka) a B4 (fíková raw tyčinka).....	33
Tabulka 1: Prekurzory biogenních aminů a jejich struktura (Cunha <i>et al.</i> , 2016).....	15
Tabulka 2: Program gradientové eluce pro HPLC.....	27
Tabulka 3: Charakteristika použitých vzorků.....	28
Příloha I Životaschopné buňky ($\log \text{CFU.g}^{-1}$) hlavních mikrobiálních skupin v testovaných vzorcích raw tyčinek	
Příloha II Koncentrace biogenních aminů v testovaných vzorcích - raw tyčinek	
Příloha III Obrázky plísní vyskytujících se testovaných vzorcích	

PŘÍLOHA I

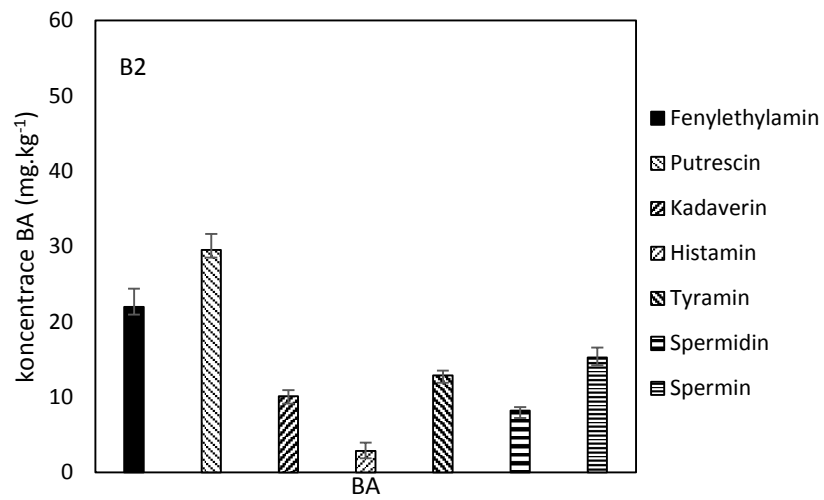
Tabulka 1: Životoschopné buňky (log CFU.g⁻¹) hlavních mikrobiálních skupin v testovaných vzorcích raw tyčinek

Vzorek	AGAR log CFU.g-1							
	VRBA	MSA	MRS	SB	M17	CHYGA	RCA	BHI
B1	3,9 ± 0,3	3,8 ± 0,2	3,2 ± 0,1	3,7 ± 0,4	2,8 ± 0,1	3,6 ± 0,1	2,6 ± 0,4	3,8 ± 0,3
B2	3,5 ± 0,3	5,2 ± 0,1	3,5 ± 0,2	-	3,9 ± 0,5	2,3 ± 0,1	5,0 ± 0,2	3,9 ± 0,3
B3	7,3 ± 0,4	7,6 ± 0,3	2,7 ± 0,1	4,1 ± 0,2	5,0 ± 0,2	3,5 ± 0,1	5,3 ± 0,1	9,2 ± 0,4
B4	3,6 ± 0,2	3,0 ± 0,1	3,0 ± 0,2	3,7 ± 0,2	3,5 ± 0,3	3,3 ± 0,1	6,1 ± 0,2	2,9 ± 0,2
B5	3,0 ± 0,3	2,9 ± 0,2	-	3,2 ± 0,3	6,4 ± 0,2	3,6 ± 0,3	3,3 ± 0,3	3,3 ± 0,1
B6	4,3 ± 0,5	3,6 ± 0,2	4,8 ± 0,3	-	5,1 ± 0,2	3,0 ± 0,1	3,4 ± 0,2	5,2 ± 0,2
B7	6,7 ± 0,4	3,2 ± 0,3	3,9 ± 0,3	3,2 ± 0,1	3,7 ± 0,4	3,6 ± 0,2	5,0 ± 0,2	7,5 ± 0,2
B8	3,7 ± 0,3	3,2 ± 0,2	4,6 ± 0,4	4,0 ± 0,3	2,6 ± 0,1	3,3 ± 0,2	5,7 ± 0,2	3,5 ± 0,1
B9	3,4 ± 0,3	3,4 ± 0,1	-	-	3,7 ± 0,2	2,4 ± 0,1	-	3,7 ± 0,2
B10	4,2 ± 0,5	5,3 ± 0,4	6,7 ± 0,2	-	4,4 ± 0,1	-	-	3,4 ± 0,4
B11	2,7 ± 0,3	4,0 ± 0,2	6,3 ± 0,3	3,0 ± 0,7	6,1 ± 0,4	3,2 ± 0,2	4,9 ± 0,3	3,6 ± 0,2
B12	2,9 ± 0,4	4,0 ± 0,2	-	-	3,4 ± 0,2	4,0 ± 0,1	-	4,2 ± 0,3
B13	3,6 ± 0,3	3,7 ± 0,3	3,8 ± 0,1	3,5 ± 0,2	3,7 ± 0,3	2,5 ± 0,1	2,3 ± 0,2	3,7 ± 0,1
B14	3,3 ± 0,2	4,7 ± 0,4	-	-	4,8 ± 0,1	-	-	4,6 ± 0,2
B15	3,0 ± 0,3	4,1 ± 0,1	-	-	4,1 ± 0,2	3,6 ± 0,2	-	4,4 ± 0,3

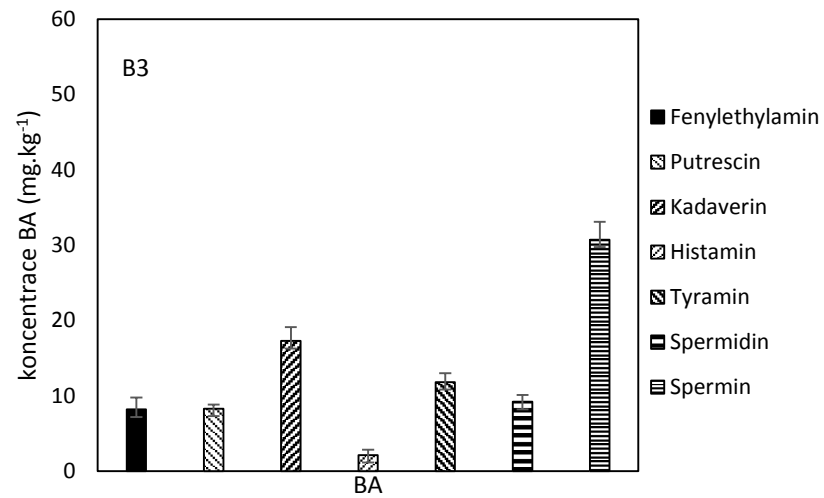
PŘÍLOHA II



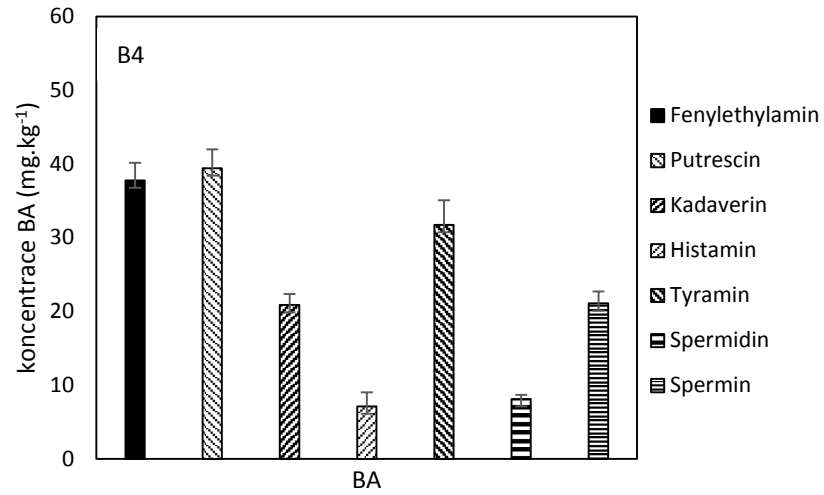
Obrázek 1: Koncentrace biogenních aminů ve vzorku B1



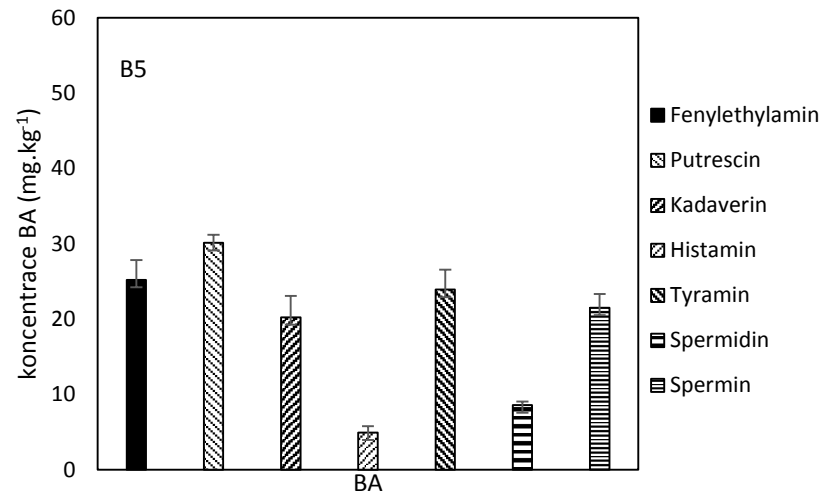
Obrázek 2: Koncentrace biogenních aminů ve vzorku B2



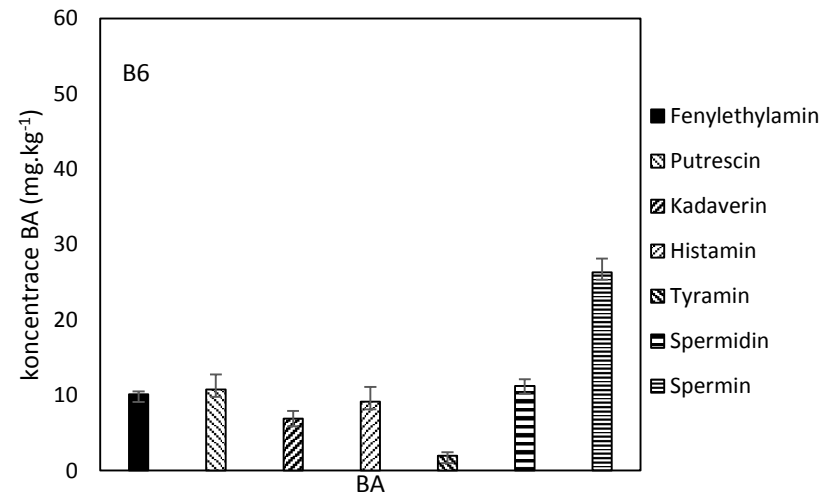
Obrázek 3: Koncentrace biogenních aminů ve vzorku B3



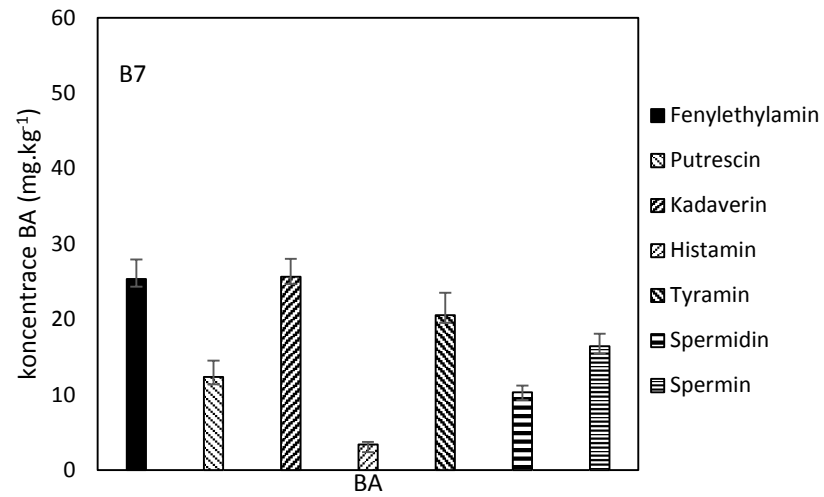
Obrázek 4: Koncentrace biogenních aminů ve vzorku B4



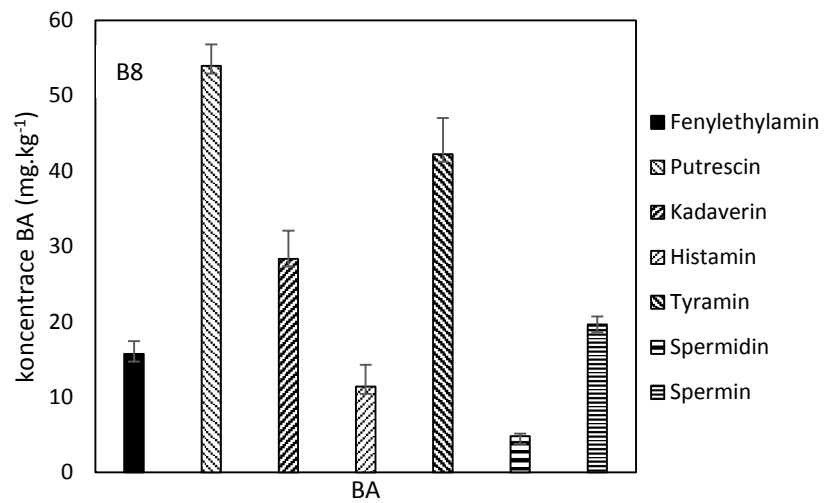
Obrázek 5: Koncentrace biogenních aminů ve vzorku B5



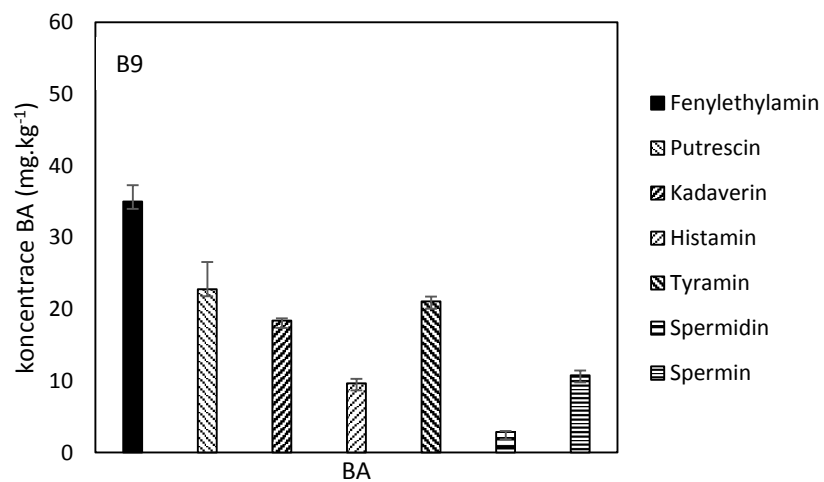
Obrázek 6: Koncentrace biogenních aminů ve vzorku B6



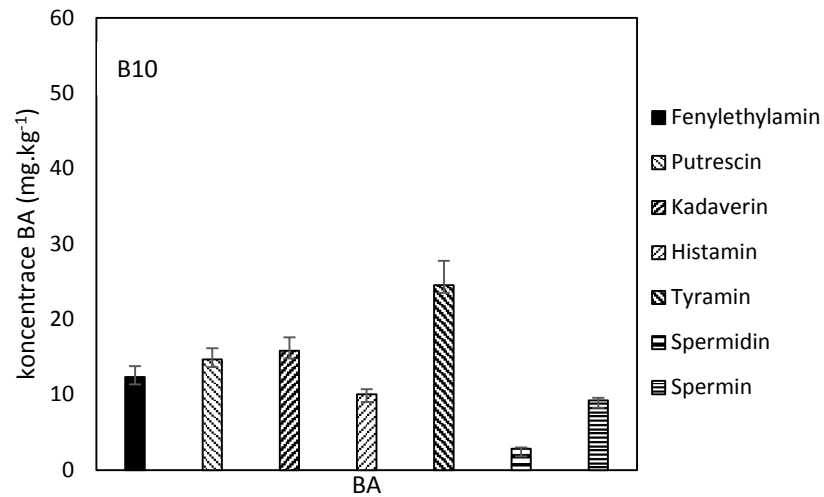
Obrázek 7: Koncentrace biogenních aminů ve vzorku B7



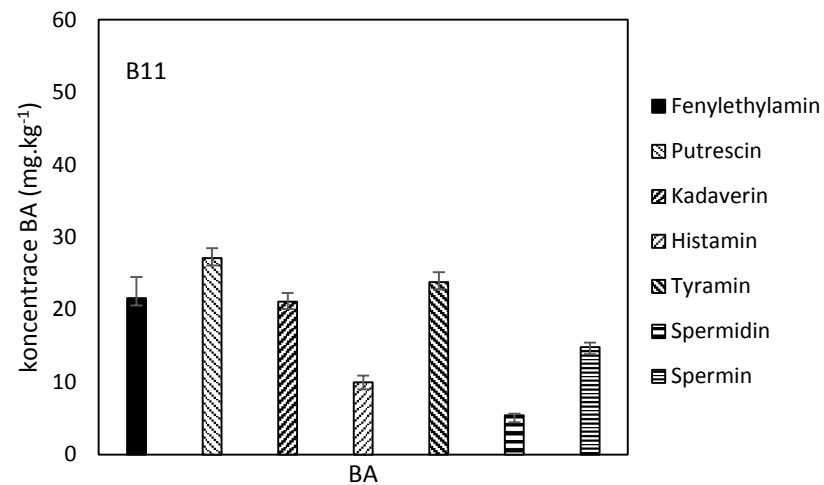
Obrázek 8: Koncentrace biogenních aminů ve vzorku B8



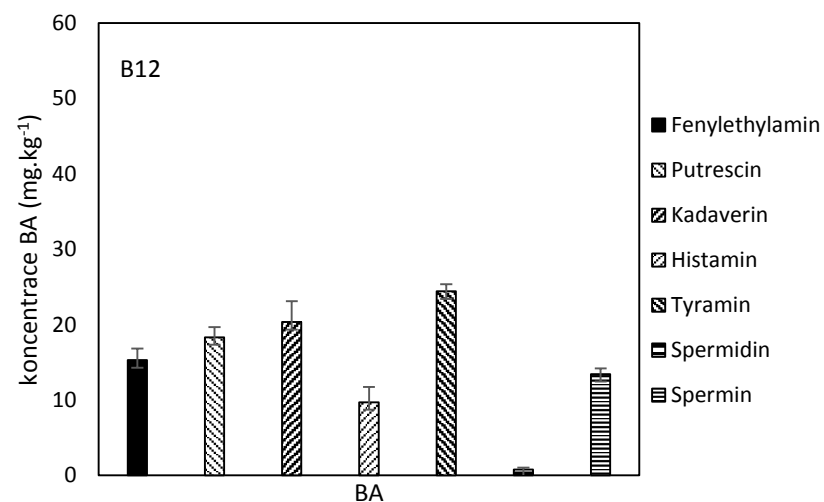
Obrázek 9: Koncentrace biogenních aminů ve vzorku B9



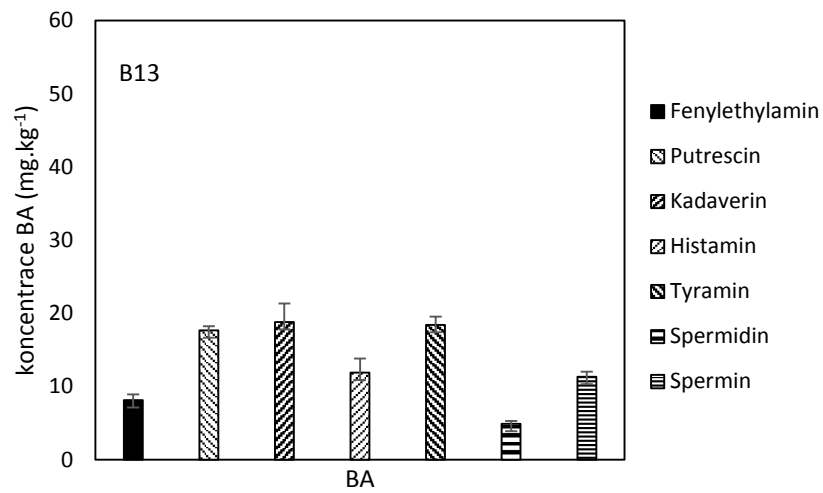
Obrázek 10: Koncentrace biogenních aminů ve vzorku B10



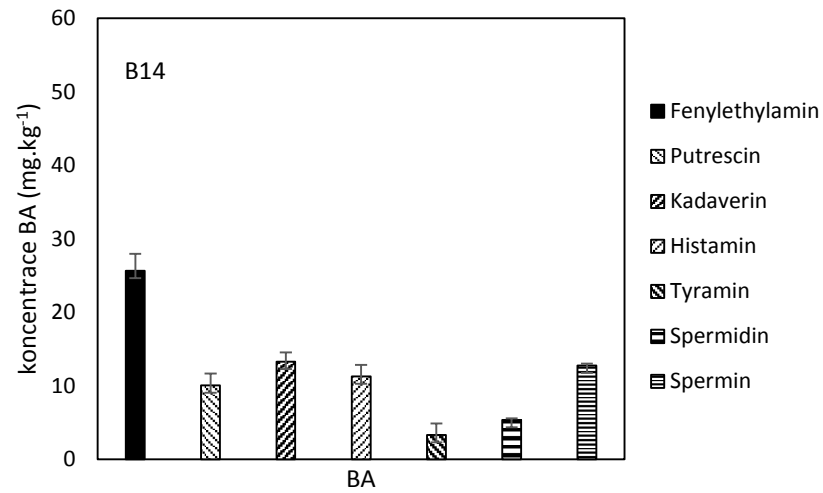
Obrázek 11: Koncentrace biogenních aminů ve vzorku B11



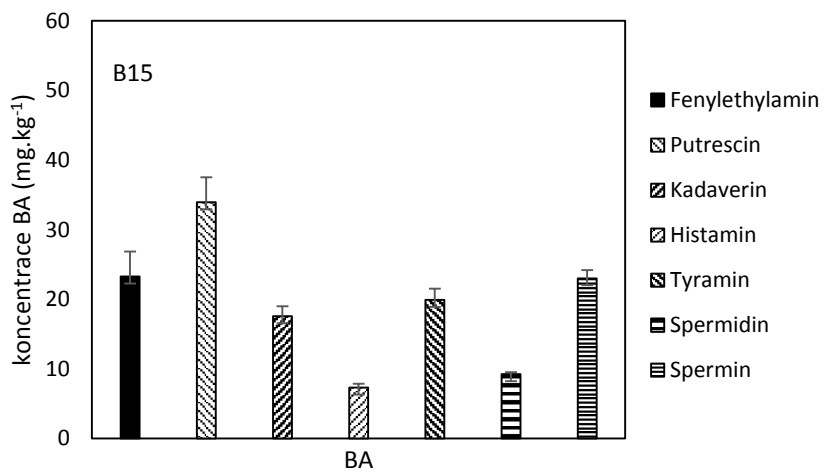
Obrázek 12: Koncentrace biogenních aminů ve vzorku B12



Obrázek 13: Koncentrace biogenních aminů ve vzorku B13

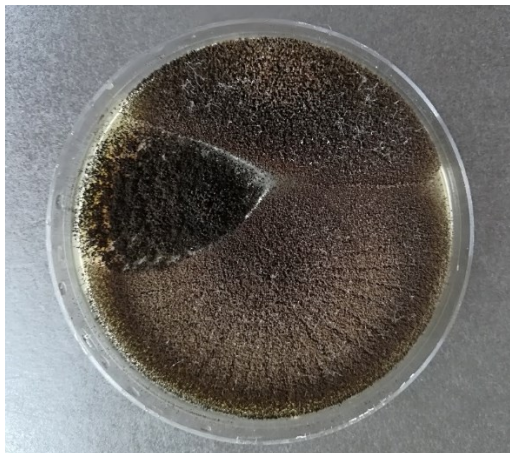
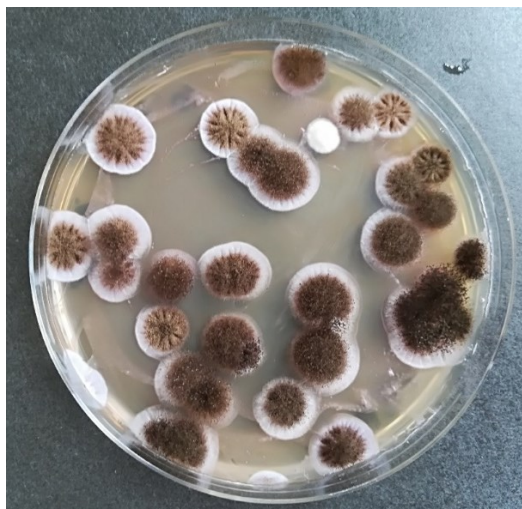


Obrázek 14: Koncentrace biogenních aminů ve vzorku B14



Obrázek 15: Koncentrace biogenních aminů ve vzorku B15

PŘÍLOHA III

Obrázek 1: plíseň rodu *Aspergillus* vyskytující se testovaném vzorku B9Obrázek 2: plíseň rodu *Aspergillus* vyskytující se testovaném vzorku B4Obrázek 3: plíseň rodu *Penicillium* vyskytující se testovaném vzorku B4